

# 低酸素反応性・可溶性VEGFレセプターを用いた 悪性グリオーマの抗血管新生療法

課題番号 14571299

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金

(基盤研究C(2)) 研究成果報告書

平成17年5月

研究代表者 高野 晋吾

(筑波大学大学院 人間総合科学研究科)

4914.627

To47

(40)

# 研 究 成 果 報 告 書

低酸素反応性・可溶性VEGFレセプターを用いた

悪性グリオーマの抗血管新生療法

課題番号 14571299

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究C(2))研究成果報告書

平成17年5月

研究代表者 高野晋吾  
(筑波大学 大学院人間総合科学研究科)

寄贈  
高野晋吾氏

05007210

## はしがき

血管新生抑制療法は固形腫瘍に対する新しい治療として、Folkman が 1971 年に”Tumor angiogenesis: Therapeutic implications”という標題で New England Journal of Medicine に提唱してから、最近になりようやく臨床での有効性が報告され、特に既存の化学療法あるいは放射線療法との併用療法による臨床試験が飛躍的に多く行われている。これらの臨床試験に基づき大腸がんでは術後のファーストラインの治療として用いられ、血管新生抑制の方法の展開とともに腫瘍に対する新しい治療法としてさらに有望である。

脳腫瘍のうちグリオーマは難治性であり、新生血管が豊富であることから血管新生抑制療法のよい標的と考えられている。特に悪性の膠芽腫では新生血管が豊富であるだけでなく、他の臓器の腫瘍には形態的あるいは機能的にみられない glomeruloid vessel および低酸素状態の結果として起こる広範な壊死が特徴的である。本研究では膠芽腫にみられる低酸素状態に注目し、低酸素状態で誘発される血管新生抑制因子を用いることによりどのようにグリオーマの増殖抑制がおこるかを目的とした基礎実験を行った。本研究の成果が、悪性グリオーマに対する血管新生抑制療法の臨床応用への橋渡しになることを期待する。

## 研究組織

研究代表者 : 高野 晋 吾 (筑波大学 大学院人間総合科学研究科 助教授)  
研究分担者 : 曾根 博 仁 (筑波大学 大学院人間総合科学研究科 講師)  
研究分担者 : 坪井 康 次 (筑波大学 大学院人間総合科学研究科 講師)  
研究分担者 : 三井 洋 司 (徳島文理大学 香川薬学部 教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	1100		1100
平成15年度	1000		1000
平成16年度	800		800
平成 年度			
平成 年度			
総計	2900		2900

## 研究発表

### 原著論文

1. 高野晋吾、曾根博仁、坪井康次、松村 明、能勢忠男：内因性血管新生抑制物質 Thrombospondin-1 による glioblastoma の増殖抑制。ニューロオンコロジー 12: 30-32, 2002.
2. Takano S, Tsuboi K, Matsumura A, Nose T: Anti-vascular endothelial growth factor antibody and nimustine as combined therapy: effects on tumor growth and angiogenesis in human glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncol* 5: 1-7, 2003.
3. Tsuboi K, Saijo K, Ishikawa E, Tsurushima H, Takano S, Morishita Y, Ohno T: Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 9: 3294-3302, 2003.
4. Ishikawa E, Tsuboi K, Takano S, Uchimura E, Nose T, Ohno T: Intratumoral injection of IL-2-activated NK cells enhances the antitumor effect of intradermally injected paraformaldehyde-fixed tumor vaccine in a rat intracranial brain tumor model. *Cancer Sci* 95: 98-103, 2004.
5. Ishikawa E, Tsuboi K, Takano S et al: Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 24: 1861-1871, 2004.
6. Ishikawa E, tsuboi K, Takano S et al: X-irradiation to human malignant glioma cells enhances the cytotoxicity of autologous killer lymphocytes under specific conditions. *Int J Radiat Biol Phys* 59: 1505-1512, 2004.
7. Shingo Takano, Hiroshi Kamiyama, Koji Tsuboi, Akira Matsumura: Angiogenesis and antiangiogenic therapy for malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* 21: 69-73, 2004.
8. kamiyama H, Takano S, Tsuboi K, Matsumura A: Anti-angiogenic effects of Sn38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor-1 / VEGF expression of glioma and growth of endothelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 205-213, 2005.

### 著書

1. 高野晋吾：Tumor angiogenesis 抑制療法－腫瘍に対する血管新生抑制療法。 *Clinical Neuroscience* 21: 554-556, 2003.
2. 高野晋吾：脳腫瘍に対する血管新生抑制療法。 *脳神経外科速報* 14: 354-362, 2004.
3. 高野晋吾：脳腫瘍に対する血管新生抑制療法：現状と展望。 *日本臨床*(2005 in press).

### 学会発表

1. 高野晋吾、坪井康次、松村 明、能勢忠男：Glioblastoma の invading front での血管構築と VEGF 発現－剖検脳での検討－。第20回日本脳腫瘍病理学会（5月10日、広島, 2002）
2. 高野晋吾、室井 愛、佐藤弘茂、能勢忠男：下垂体腺腫の VEGF 発現および血管新生能。第20回日本脳腫瘍病理学会（5月10日、広島, 2002）
3. 高野晋吾、坪井康次、松村 明、能勢忠男：内因性血管新生抑制物質、thrombospondin-1、によるグリオブラストーマの増殖抑制。第23回ニューロオンコロジーの会（4月13日、東京, 2002）
4. 高野晋吾、坪井康次、松村 明、石川栄一、能勢忠男：グリオーマにおける可溶性 VEGF レセプター (sFlt-1) の役割。第20回日本脳腫瘍学会（1月16日、熊本, 2002）
5. 高野晋吾、室井 愛、阿久津博義、佐藤弘茂、能勢忠男：下垂体腺腫の VEGF

- 発現および血管新生能。第13回日本間脳下垂体腫瘍学会（2月4日、島根, 2003）
6. 高野晋吾、室井 愛、坪井康次、松村 明、能勢忠男、野口雅之：  
Oligodendroglial tumor の grade と血管新生能・染色体解析。第21回日本脳腫瘍病理学会（5月1日、東京, 2003）
  7. Takano S, Muroi A, Tsuboi K, Matsumura A, Nose T: Angiogenesis and anti-angiogenic therapy for malignant gliomas. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Brain Tumor Pathology (Symposium, May 1, Tokyo, 2003)
  8. 高野晋吾、阿久津博義、室井 愛、井口雅博、坪井康次、松村 明：グリオーマにおける hypoxia inducible factor・angiopoietin の発現と血管新生。第62回日本脳神経外科学会総会（10月1日、仙台, 2003）
  9. 高野晋吾、神山 洋、阿久津博義、坪井康次、松村 明：悪性グリオーマに対する Irinotecan(CPT-11)の治療効果：基礎から臨床研究まで。第21回日本脳腫瘍学会（11月16日、淡路, 2003）
  10. 高野晋吾、神山 洋、井口雅博、坪井康次、山本哲哉、松村 明：悪性グリオーマに対する HIF-1 および VEGF を標的とした抗血管新生療法。第22回日本脳腫瘍学会（10月17日、松島, 2004）
  11. Kamiyama Hiroshi, Shingo Takano, Koji Tsuboi, Akira Matsumura: Anti-angiogenic effects of SN38 (Irinotecan): Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 $\alpha$ ) / vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells. 第1回日本血管生物医学会（11月4日、淡路, 2004）
  12. Shingo Takano, Hiroshi Kamiyama, Koji Tsuboi, Akira Matsumura: Angiosuppressive effect of irinotecan (CPT-11) against malignant glioma in vitro and in vivo. 3<sup>rd</sup> Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (Nov.18, Shanghai, 2004)
  13. 高野晋吾、坪井康次、山本哲哉、井口雅博、松村 明：腫瘍血管を標的とした悪性脳腫瘍の治療戦略。第14回茨城がん学会（1月30日、水戸, 2005）
  14. 高野晋吾、神山 洋、坪井康次、松村 明：グリオーマにおける hypoxia-inducible factor・angiopoietin の発現と血管新生。第2回がんとハイポキシア研究会（3月13日、つくば, 2005）

## 研究成果 目次

I グリオーマと可溶性 VEGF レセプター (sFlt-1)	
1. グリオーマにおける可溶性 VEGF レセプター (sFlt-1) の発現	p 1-2
2. sFlt-1 遺伝子の強制発現によるグリオーマの増殖抑制効果	p 2-3
II グリオーマと低酸素マーカーhypoxia inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ )	
1. グリオーマにおける HIF の発現	p 4-5
2. グリオーマにおける HIF-1 $\alpha$ を標的とした血管新生抑制療法	p 5-8
3. グリオーマの HIF-1 $\alpha$ 発現の抑制物質の探索	p 8-9
III 漢方薬：十全大補湯 (JTT) の血管新生抑制効果	p 10
IV 図表：図 1 - 3 3、表 1、2	p11-33
IV 結語	p 34
V 謝辞	p 34
VI 参考文献	p 35
1. J Cancer Res Clin Oncol 131: 205-213, 2005.	

## I グリオーマと可溶性 VEGF レセプター (sFlt-1)

### I-1 グリオーマにおける可溶性 VEGF レセプター (sFlt-1) の発現

#### 【目的】

VEGF レセプターである Flt-1 の細胞外領域部分は可溶性の形で生体内に存在し (sFlt-1)、内因性 VEGF 抑制因子として機能すると考えられている。VEGF 特異性から悪性グリオーマに対する抗血管新生療法の標的分子となりうる。グリオーマ組織における sFlt-1 の役割を検討した。

#### 【対象・方法】

52 例のグリオーマ (grade IV: glioblastoma 24 例, grade III: anaplastic astrocytoma 13 例, grade II: low grade astrocytoma 10 例, grade I: pilocytic astrocytoma 5 例) のパラフィン切片、凍結組織を用いた。凍結腫瘍組織のホモジネートで VEGF および sFlt-1 の蛋白濃度を ELISA (R&D system) で測定した。パラフィン切片では MIB-1 陽性率、CD34 染色で腫瘍血管密度を形態計測し、VEGF および Flt-1 染色でその分布を評価した。

#### 【結果】

VEGF 蛋白濃度は grade IV , grade III , grade II , grade I pg/mg protein で grade IV で他の grade に比べて有意に高かった (図 1)。sFlt-1 蛋白濃度は grade IV  $848.5 \pm 900.2$ , grade III  $465.4 \pm 232.5$ , grade II  $410.3 \pm 207.2$ , grade I  $317.7 \pm 137.1$  pg/mg protein で grade IV のばらつきが強く病理組織間での有意な差はみられなかった (図 2)。ただし、VEGF / sFlt-1 の蛋白濃度の比が 1 以上のグリオーマ (n = 25) は 1 未満のもの (n = 27) に比べて有意に (p < 0.0001) 生存率が低かった (図 3)。悪性グリオーマ (grade IV, III) 37 例だけに限っても同様で、比が 1 以上の悪性グリオーマの平均生存期間は 11 ヶ月であるのに対し、1 未満のものは 29 ヶ月で生存率に有意な (p < 0.0001) 違いがみられた (図

4)。sFlt-1 蛋白濃度は血管密度( $r=0.427$ ,  $p=0.0014$ )、腫瘍 MIB-1 値 ( $r = 0.349$ ,  $p=0.0108$ )、VEGF 蛋白濃度 ( $r=0.304$ ,  $p=0.0278$ ) と有意な相関がみられた (図 5)。Flt-1 蛋白、VEGF 蛋白ともにグリオーマ組織の血管壁・腫瘍細胞に陽性であった (図 6)。

#### 【結論】

sFlt-1 はグリオーマ組織の血管密度に関係し、VEGF / sFlt-1 濃度の比率が 1 未満でグリオーマの生存率は有意に高く、内因性血管新生抑制因子として機能している。また、sFlt-1 は悪性グリオーマの分子標的となりうると考えられた。以上の結果に基づき 1. sFlt-1 plasmid のグリオーマ細胞 (U87) への遺伝子導入実験を計画した。

#### I-2 sFlt-1 遺伝子の強制発現によるグリオーマの増殖抑制効果

##### 【目的】

グリオーマにおいて内因性血管新生抑制物質として機能している sFlt-1 の過剰発現によるグリオーマの血管新生抑制、増殖抑制効果を検討した。

##### 【対象・方法】

ヒト悪性グリオーマ細胞、U87 に内因性血管新生抑制因子である sFlt-1 遺伝子 (in vivo gene) をリポフェクション法で強制発現させた。

##### 【結果】

RT-PCR で sFlt-1 の強発現がみられたクローンが 2 個得られた (図 7)。細胞形態、増殖能力 (WST-8 アッセイ) に sFlt-1 発現クローン, empty vector 導入クローン、親クローンに違いは見られなかった (図 8)。SCID マウス皮下での sFlt-1 発現クローンの腫瘍増殖はコントロール (empty vector 導入クローン) に比べて、移植後 5 日目で 60%、7 日目で 50%、12 日目で 40%、18 日目で 30% の有意な増殖



抑制が見られた (図9)。しかし、免疫組織化学でみた VEGF 発現は、sFlt-1 導入クローンおよびコントロールクローンの腫瘍組織ともに強発現で差は見られなかった。

#### 【結論】

sFlt-1 の強制発現だけでは血管新生抑制効果が不十分であり、腫瘍の増殖抑制効果は30%にとどまった。

悪性グリオーマにみられる低酸素領域あるいは壊死に注目し、低酸素を誘導する hypoxia-inducible factor (HIF) を治療対象とするべく実験計画をたてた。

#### 【グリオーマと sFlt-1 : 総括】

グリオーマにおいて sFlt-1 は内因性血管新生抑制物質として作動しており、VEGF とともに血管新生の程度を調節し、予後因子となりうる。sFlt-1 の過剰発現でグリオーマの増殖抑制効果が30%みられた。

## II グリオーマと低酸素マーカーhypoxia inducible factor (HIF)

### II-1 グリオーマにおける HIF の発現

#### 【目的】

悪性グリオーマの組織学的特徴である壊死あるいは低酸素状態を表す因子の解析を試みた。Hypoxia inducible factor (HIF) -1 $\alpha$ 、2 $\alpha$ および血管新生の調節因子である angiopoietin (Ang) 1, 2 の蛋白発現をグリオーマ組織で検討した。

#### 【対象・方法】

52 例のグリオーマ (grade IV: glioblastoma 24 例, grade III: anaplastic astrocytoma 13 例, grade II: low grade astrocytoma 10 例, grade I: pilocytic astrocytoma 5 例) のパラフィン切片、凍結組織を用いた。パラフィン切片で HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、Ang1, Ang2 の抗体を用いて免疫染色を行った。さらに、MIB-1 陽性率、CD34 染色で腫瘍血管密度、血管面積を形態計測した。凍結腫瘍組織のホモジネートで VEGF の蛋白濃度を ELISA (R&D system) で測定した。

#### 【結果】

HIF-1 $\alpha$  は grade IV, III では grade I, II に比べて腫瘍細胞の核に有意に高くみられた。grade IV では血管から離れた部位あるいは壊死周囲に強く発現していた (図 1 0)。HIF2 $\alpha$  は腫瘍細胞質にみられたが grade による違いはみられなかった。HIF-1 $\alpha$  の発現は VEGF 濃度、MIB-1 陽性率、p53 陽性率、血管密度、血管面積と有意な相関がみられた (図 1 1)。HIF-1 $\alpha$  陽性症例の平均生存期間は 18.6 ヶ月、陰性症例は 30.1 ヶ月であり、HIF-1 $\alpha$  の陽性所見はグリオーマの患者の予後不良因子であった (図 1 2)。

Ang1 は腫瘍細胞質にみられたが grade I, II, III, IV の間に発現差はみられなかった。Ang2 は腫瘍細胞質、腫瘍血管内皮細胞に発現がみられた (図 1 3)。Ang2 の陽性症例の VEGF 濃度は陰性症例の VEGF 濃度に比べて有意に低かった (図

14)。さらに、Ang2 陽性症例の平均生存期間は 33.4 ヶ月、陰性症例は 19.2 ヶ月であり、Ang2 の陽性所見はグリオーマの患者の予後良好因子であった (図 15)。

#### [結論]

今回の検討からグリオーマの grade に伴う血管変化の模式図を図 16 に示す (Brat et al. Am J Pathol 2002 より改変)。grade の低い low grade astrocytoma では血管の sprouting に関与すると考えられる Ang2 の発現が高く、低酸素のマーカーである HIF-1 $\alpha$  の発現が低い。grade の高い glioblastoma では Ang2 の発現が低く、HIF-1 $\alpha$  の発現がたかくい。HIF1 $\alpha$  と Ang2 は VEGF 発現と関連してグリオーマの血管新生・臨床予後を調節し分子標的となりうると考えられた。

次に、HIF-1 $\alpha$  を標的とした血管新生抑制療法を考案すべく、HIF-1 $\alpha$  の発現を抑制する物質の検討を計画した。

## II-2 グリオーマにおける CPT-11 による HIF-1 $\alpha$ を標的とした血管新生抑制療法

### [目的]

HIF-1 $\alpha$  の発現を抑制する物質のスクリーニングで CPT-11 アナログがあげられた報告 (Rapsida et al. Cancer Res 2002) に注目した。CPT-11 によるグリオーマの HIF-1 $\alpha$  抑制、それに続く血管新生、増殖抑制効果を in vitro, in vivo で検討した。

### [対象・方法・結果]

#### 1) CPT-11 の抗血管新生作用・グリオーマの増殖抑制の機序 (in vitro)

CPT-11 の細胞増殖抑制効果を WST-8 アッセイで評価した。グリオーマ細胞

(GL261, U87, U251) での  $IC_{50}$  は 38, 5, 30  $\mu$ M、内皮細胞 (TE1, CPAE) での  $IC_{50}$  は 0.001, 0.041 $\mu$ M であり、腫瘍細胞に比べ強い内皮細胞増殖抑制効果がみられた(図 1 7)。

CPT-11 による HIF-1 $\alpha$ 、VEGF の mRNA 発現変化はリアルタイム RT-PCR で、蛋白発現変化はウェスタンブロットおよび ELISA で評価した。p53 が mutant タイプの U251 細胞および p53 が wild タイプの U87 細胞の 2 種類を用いた。ガスパックパウチ内での細胞培養により低酸素状態を獲得した。

HIF1- $\alpha$  の mRNA 発現は U87 細胞では低酸素状態で著明に亢進した。VEGF の mRNA 発現は U87, U251 細胞ともに低酸素状態で著明に亢進した。CPT-11 は濃度、時間依存的にグリオーマ細胞の正常酸素状態および低酸素状態での HIF-1 $\alpha$  および VEGF の mRNA 発現を抑制した (図 1 8)。

HIF1 $\alpha$  の蛋白発現は U87 および U251 細胞で低酸素状態 (8 から 24 時間) で著明に亢進した。CPT-11 は濃度、時間依存的に HIF1 $\alpha$  の蛋白発現を抑制した (図 1 9)。さらに CPT-11 は U87 細胞の培養上清中への VEGF 蛋白分泌を、正常酸素状態、低酸素状態ともに有意に抑制した (図 2 0)。

CPT-11 の直接の血管新生抑制効果を評価するために、血管内皮細胞の VEGF による管腔形成に対する効果を血管新生キット (クラボウ) で評価した。図 2 1 に示すように、CPT-11 の代謝物である SN38 は血管内皮細胞の管腔形成を 0.01 $\mu$ M で抑制した。他のグリオーマ治療に用いられる抗腫瘍剤 (ACNU, etoposide, cisplatin) では管腔形成の抑制は 10 $\mu$ M でもみられなかった。血管新生キットで形成された管腔を画像解析装置 Winroof を用いて、管腔の長さおよび血管が分岐する数を測定することにより血管新生抑制効果を定量化した (図 2 2)。CPT-11 は 0.01  $\mu$ M 以上で有意に VEGF 誘発の血管新生を抑制することが明らかにされた。他の抗腫瘍剤では etoposide に軽度の血管新生抑制効果がみられた。

## 2) CPT-11 の抗血管新生作用・グリオーマの増殖抑制の機序 (in vivo)

CPT-11 の in vitro での強い血管新生抑制作用から、SCID マウスを用いたヒトグリオーマの皮下腫瘍モデルで CPT-11 の抗腫瘍効果および血管新生抑制効果を評価した。

### 1) ACNU 耐性株に対する効果

臨床使用を考え、ACNU 耐性株 (U87AR) を作成した。U87AR は U87 細胞の培養を ACNU 10  $\mu$ M で数代継続したクローンである。U87AR は U87 細胞に比べて ACNU に対して約 10 倍耐性であったが、CPT-11 の増殖抑制効果は同様であった (図 2 3)。次に U87AR の SCID マウス皮下腫瘍モデルで CPT-11 と ACNU の効果を検討した。CPT-11 の投与は低用量 (10 mg/kg) を移植後 1-5 日および 8-12 日に腹腔内投与した。ACNU の投与は x mg/kg を移植後 1, 5, 8 日目に腹腔内投与した。

U87AR の皮下腫瘍は ACNU 投与ではまったく増殖抑制されなかったが、CPT-11 投与で有意に抑制された (図 2 4)。得られた腫瘍組織の VEGF 発現は免疫染色で見ると、コントロールでは強発現 (図 2 5 A) であったが、CPT-11 投与群では殆ど発現が見られなかった (図 2 5 B)。腫瘍組織の VEGF 値を ELISA で定量してみると CPT-11 投与群ではコントロールの 5% 以下に抑制されていた (図 2 5 C)。さらにパラフィン切片で CD34 陽性の血管密度、MIB-1 陽性率、apoptosis index を測定した。CPT-11 投与により血管密度は有意に低下し、MIB-1 陽性率は有意に低下し、apoptosis index は有意に増加した (図 2 6)。CPT-11 は ACNU 耐性株に対しても、腫瘍細胞の増殖抑制、アポトーシスの増強に加えて、強力に VEGF 発現、血管新生を抑制し腫瘍の増殖を著明に抑制することが明らかにされた。この結果は悪性グリオーマで化学療法剤として現時点でもっとも効果的であり、多く用いられている ACNU 治療後の再発症例に対しても著明な効果を期待できる。

### 2) CPT-11 の低用量持続投与方法 (メトロノーミック・スケジュール) の開発

CPT-11 の *in vitro* での血管新生抑制効果の結果にもとつき、CPT-11 の血管新生抑制効果を最も有効に活用できる低用量・持続投与方法（メトロノーミック スケジュール）の開発を試みた。CPT-11 の投与方法は中等量を短期間に投与（10mg/kg[A 群], 40 mg/kg[B 群]の腹腔内投与を移植後 1-5 日, 8-12 日）と低用量持続投与（1mg/kg[C 群], 4mg/kg[D 群]の腹腔内投与を 21 日間連日）に分けて行なった。コントロールに比べ CPT-11 投与ではいずれの群でも腫瘍抑制効果がみられた（図 2 7）。抑制効果は A = B = D > C であった。移植後 21 日目に半数のマウスから腫瘍を摘出した。CPT-11 投与群の腫瘍組織では VEGF の発現、血管密度が全群とも有意に低かった（図 2 8）。C 群、D 群では 1 週間の休薬のあと、再び 21 日間の投与を 2 コース行った。休薬期間には腫瘍増殖がみられるが、治療開始に伴い再び増殖の休止が得られた（図 2 9）。メトロノーミック・スケジュールにより合計 7 7 日間の治療、CPT-11 の総投与量は C 群で 63 mg/kg、D 群で 252 mg/kg になるが体重減少もなく、体調は良好で明らかな副作用はみられなかった。一方、B 群では 21 日間の治療、CPT-11 の総投与量は 400 mg/kg となり、腫瘍の増殖抑制は著明にみられたが、体重減少もみられ全身への副作用が考えられた。

#### 【結論】

CPT-11 のメトロノーミック・スケジュール（低用量持続投与；4mg/kg 3 週間投与、1 週間休薬を 1 コースとして、3 コース）によるグリオーマの血管新生抑制および増殖抑制効果を明らかにした。

### II-3 グリオーマの HIF-1 $\alpha$ 発現の抑制物質の探索

#### 【目的】

CPT-11 の HIF1 $\alpha$ 、VEGF 発現抑制による血管新生抑制・腫瘍増殖抑制効果か

ら考え、CPT-11 以外に HIF1 $\alpha$  の発現を抑制する物質の探索を行い、グリオーマの治療への展開を目的とした。

#### [対象・方法]

2-methoxyestradiol、YC1、Resveraltol の U87 および U251 悪性グリオーマ細胞に対する HIF1 $\alpha$  および VEGF 発現の効果をリアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロットで、内皮細胞の管腔形成能に対する効果を血管新生キットで評価した。

#### [結果]

2ME および resveraltol は濃度・時間依存性にグリオーマ細胞の HIF1 $\alpha$  の mRNA および蛋白発現を抑制した。YC1 では抑制効果はみられなかった(図 3 0)。

#### [結論]

2ME, resveraltol はグリオーマの HIF1 $\alpha$  抑制物質としての効果が期待できる。

#### [グリオーマと HIF: 総括]

1. CPT-11 には *in vitro* で、1) グリオーマ細胞の HIF-1, VEGF の発現抑制、  
2) 強力な血管内皮細胞増殖抑制および管腔形成抑制効果がみられた。
2. CPT-11 には *in vivo* でグリオーマの増殖抑制、血管新生抑制がみられた。  
特にメトロノーミック・スケジュール（低用量持続投与）は中等量短期間投与の効果と同様であり、血管新生抑制作用が主体となる治療法であり、体重減少という副作用を軽減できる点で重要である。また、ACNU 耐性の腫瘍細胞の増殖抑制効果が期待できる。
3. 2-ME および resveratol は HIF-1 $\alpha$  の抑制物質として有望である。

### III 漢方薬：十全大補湯（JTT）のグリオーマ増殖抑制および血管新生抑制効果

#### 【目的】

漢方薬である JTT は免疫能を高めることにより抗腫瘍効果がみられることが知られている。近年、血管新生因子である VEGF のレセプターに対するワクチン療法の動物実験での効果、腫瘍細胞からの VEGF が免疫担当細胞である樹状細胞の成熟を阻害することなどから免疫能と血管新生の関係が注目されている。臨床的に JTT を含めた漢方薬は副作用なく長期間経口で服用できる。そこで、JTT の血管新生抑制効果をグリオーマモデルで検討した。

#### 【対象・方法】

JTT の低濃度、高濃度混合飼料をマウス（若齢 6 週、老齢 4 3 週）に摂取させることにより、グリオーマ皮下腫瘍の増殖抑制を検討した。

#### 【結果】

JTT 高濃度摂取した老齢マウスで脾臓リンパ球サブセットの NK 細胞比率 (Table1) および NK 活性 (図 31) が有意に増強され、腫瘍の血管面積が有意に抑制された (図 3 2、Table 2)。腫瘍の増殖能、腫瘍の増大には違いがみられなかった (図 3 3))。

#### 【結論】

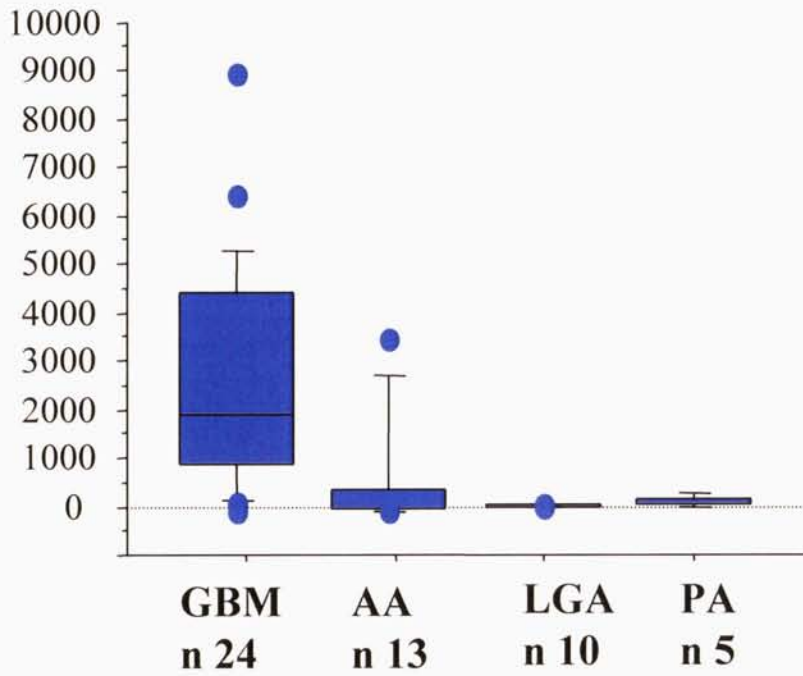
JTT の老齢マウスに対する免疫賦活作用に加えて、血管新生抑制効果が明らかにされた。

臨床的にも JTT は免疫能の低下している高齢者のグリオーマ患者に血管新生抑制効果の面からも有用な補材と考えられた。



☒ 1 VEGF concentration in glioma tissues

pg/mg protein



☒ 2 sFlt-1 concentration in glioma tissues

pg/mg protein

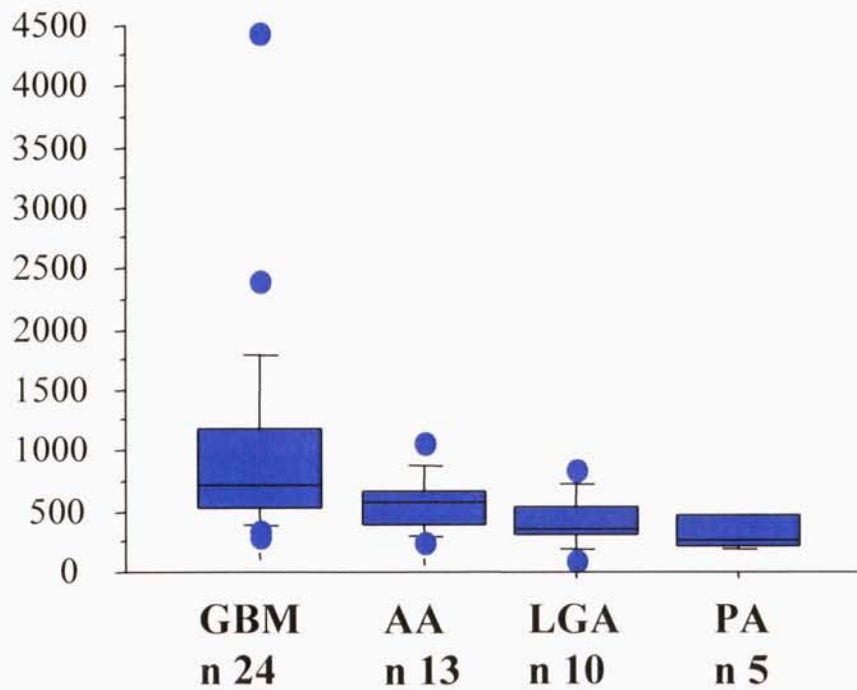


图 3 VEGF / sFlt1 ratio predicts prognosis in patients with gliomas

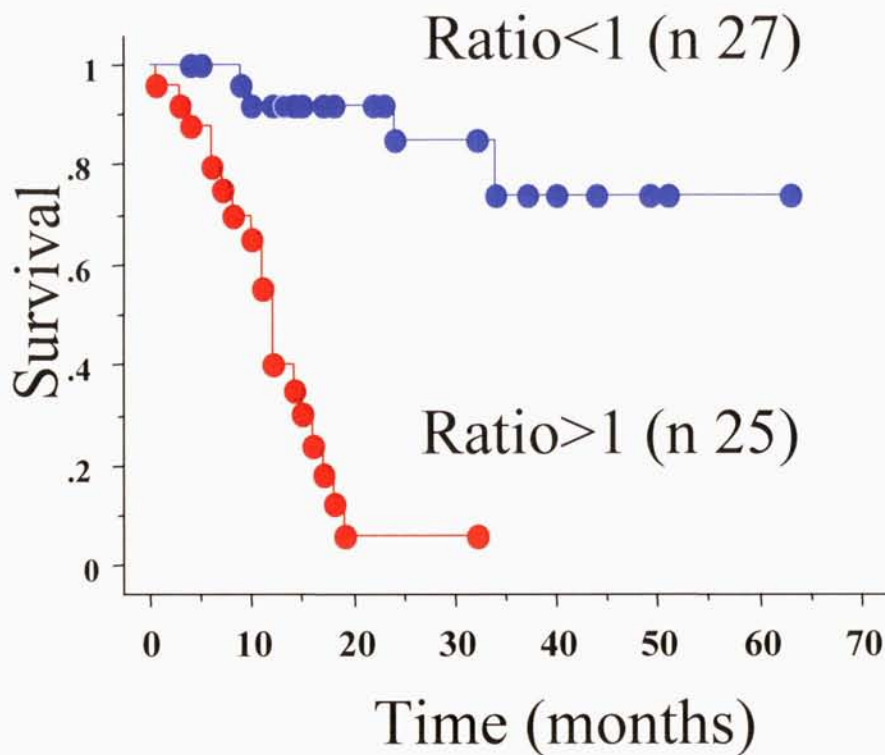
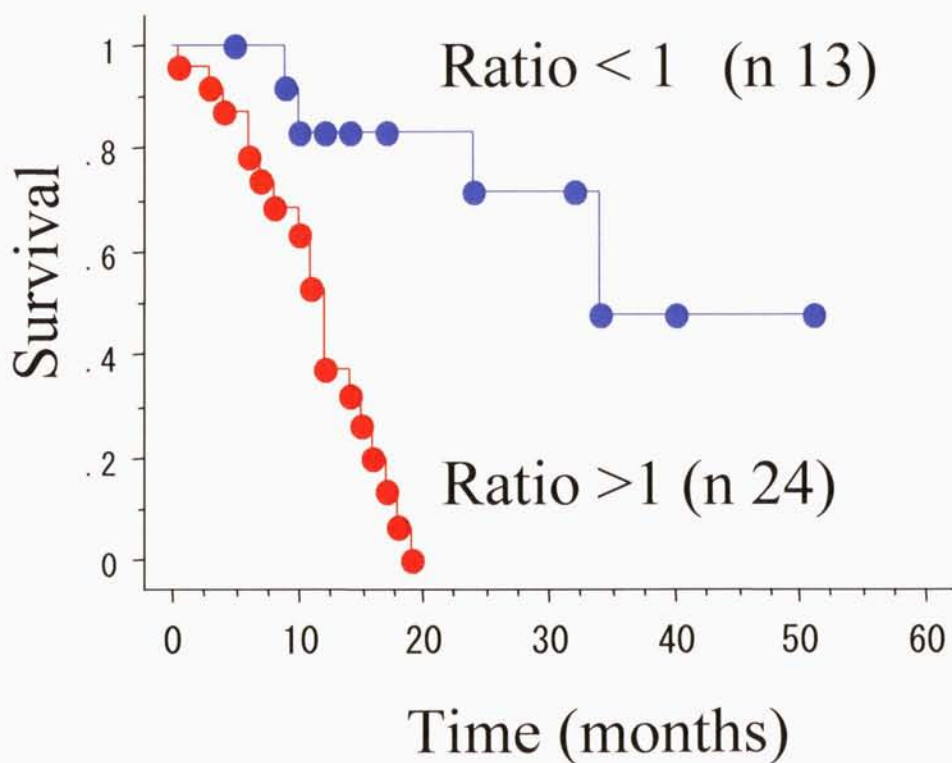


图 4 VEGF / sFlt1 ratio predicts prognosis in patients with malignant liomas



☒ 5 sFlt-1 correlation between other parameters

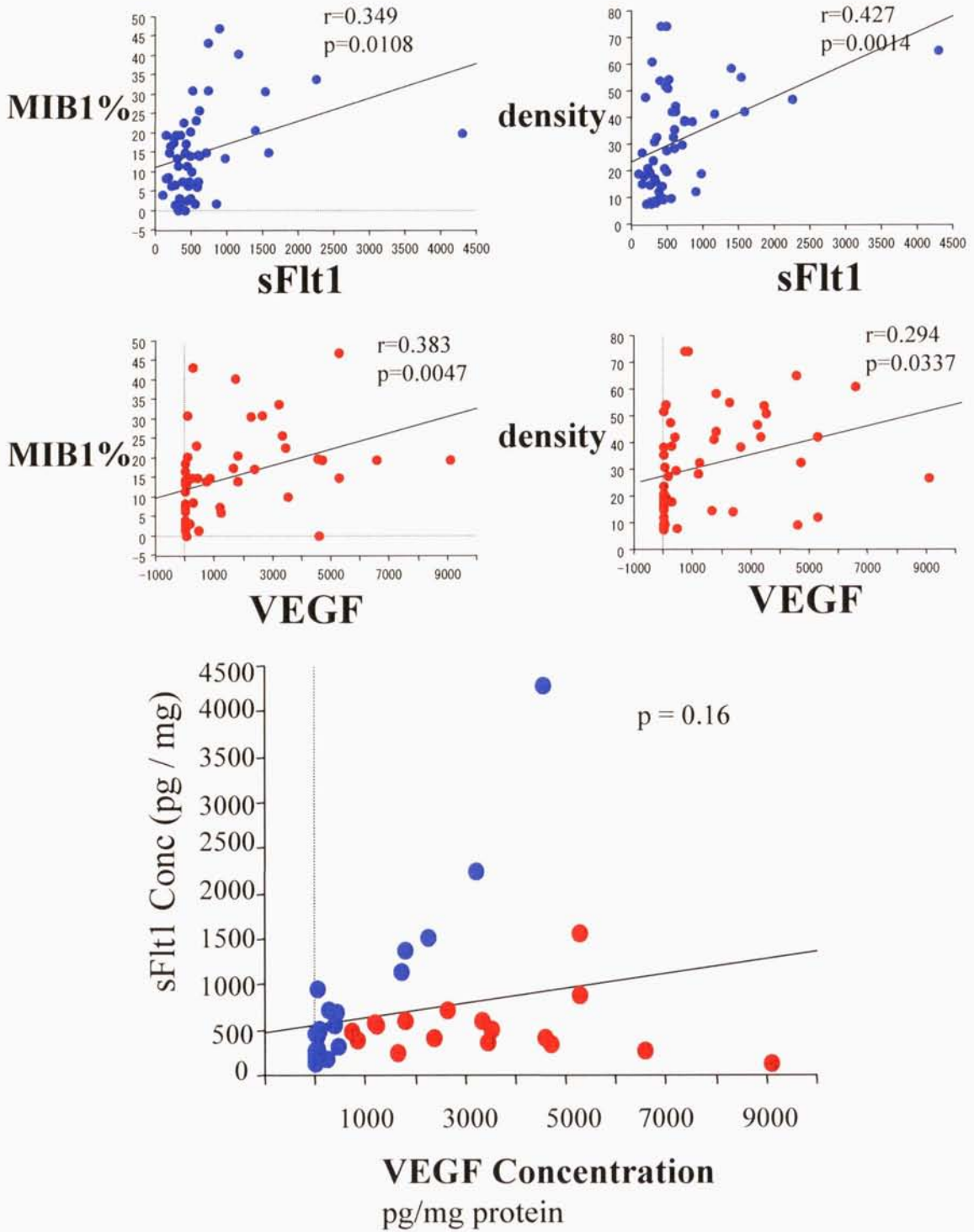
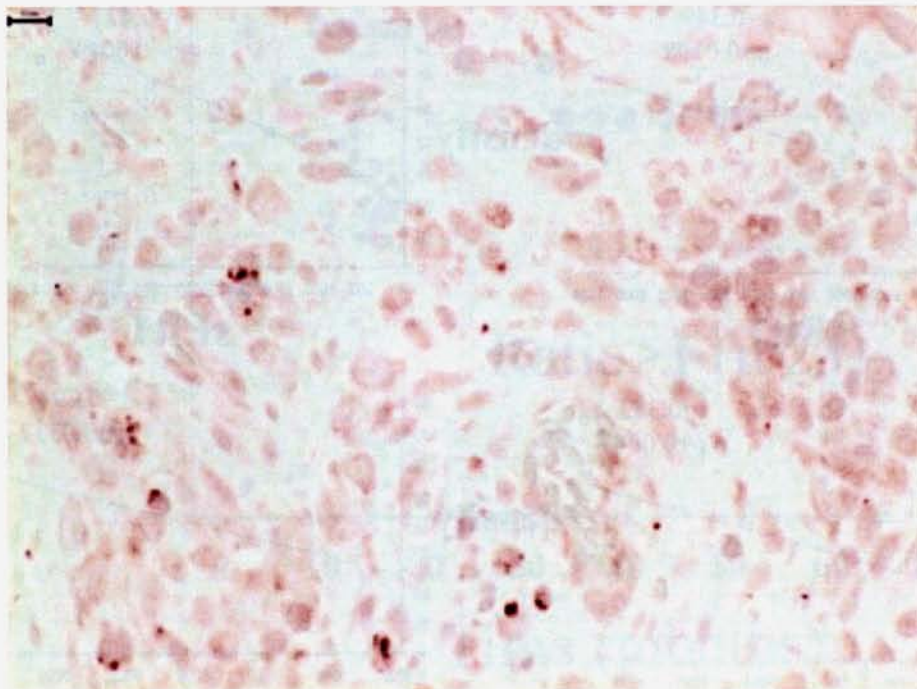


图 6 VEGF and Flt-1 免疫组化在恶性胶质瘤

VEGF



Flt-1

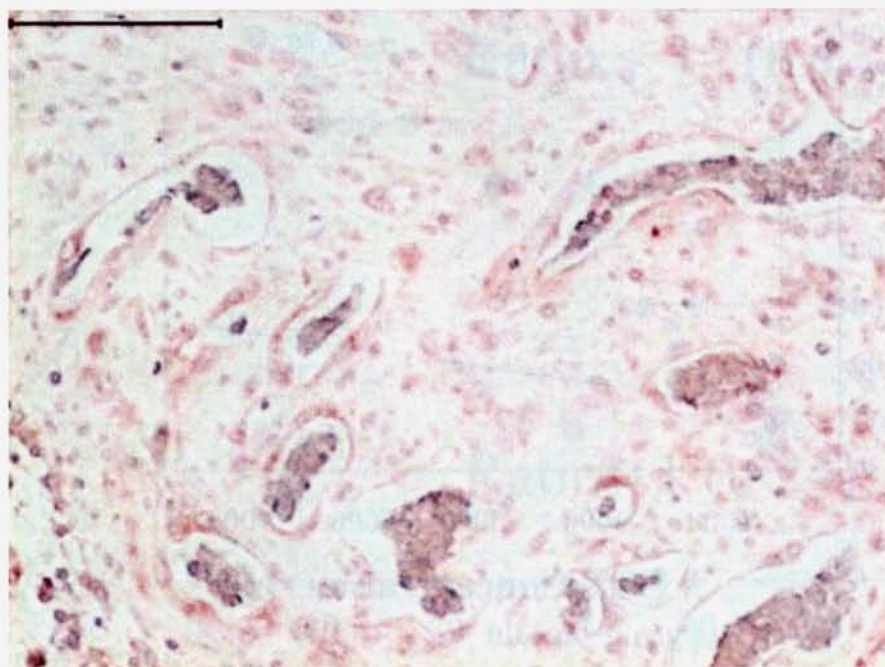


图 7 sFlt-1 transfection into U87 glioma cells: RT-PCR analysis

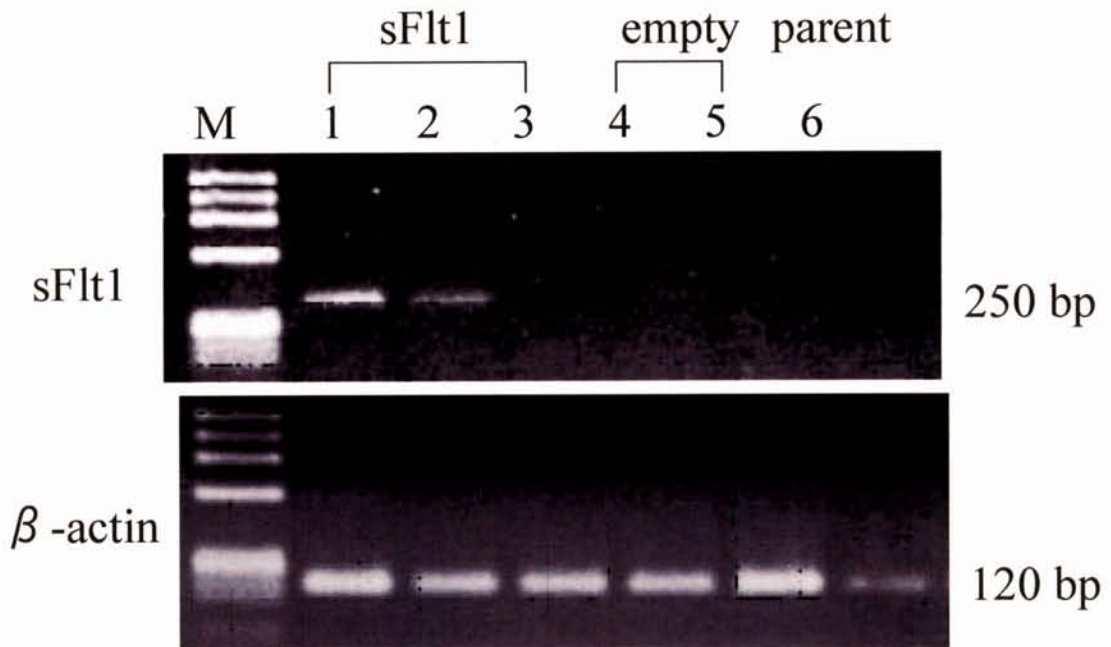


图 8 sFlt-1 transfectant cell proliferation: WST8 assay

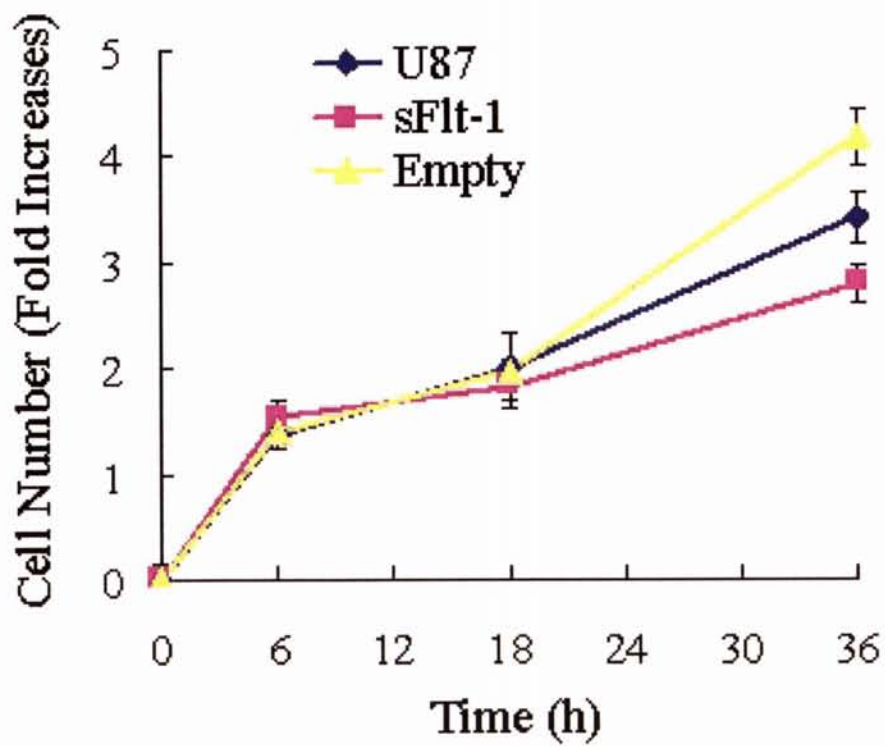
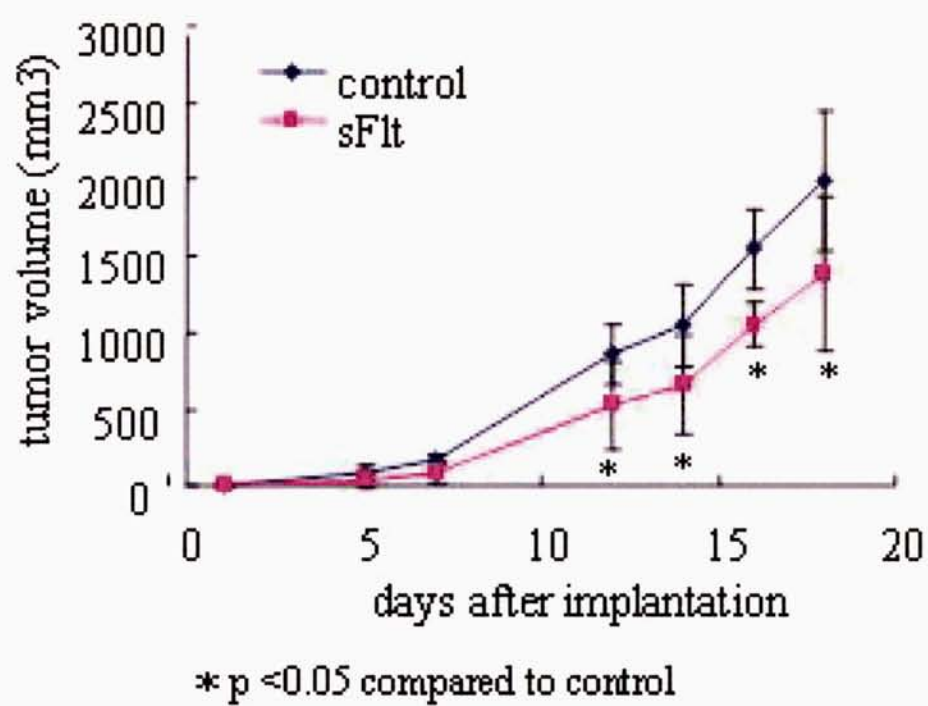


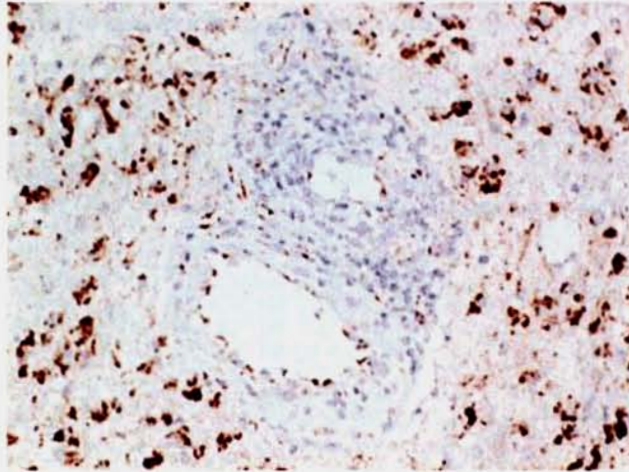


Figure 9 sFlt-1 transfectant in vivo growth

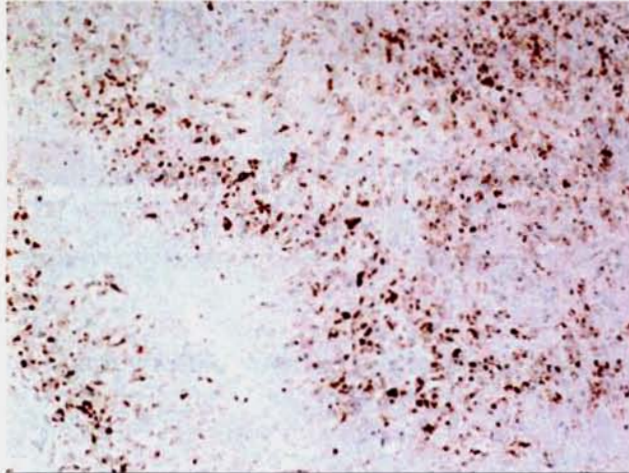


☒ 1 0 **Hypoxia-inducible factor expression in gliomas**

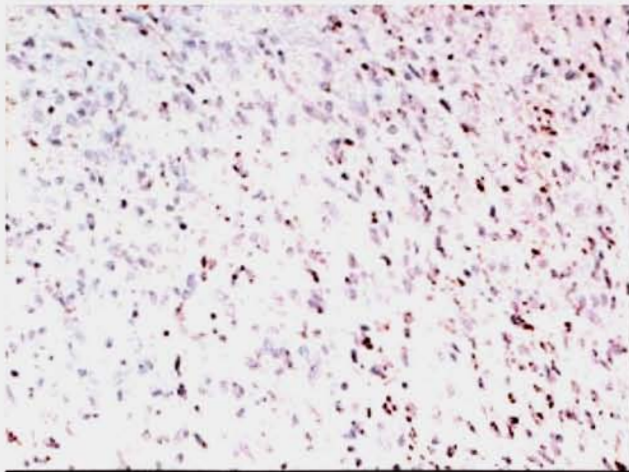
HIF-1 $\alpha$  expression in glioblastoma: note staining in the distant area from vessels



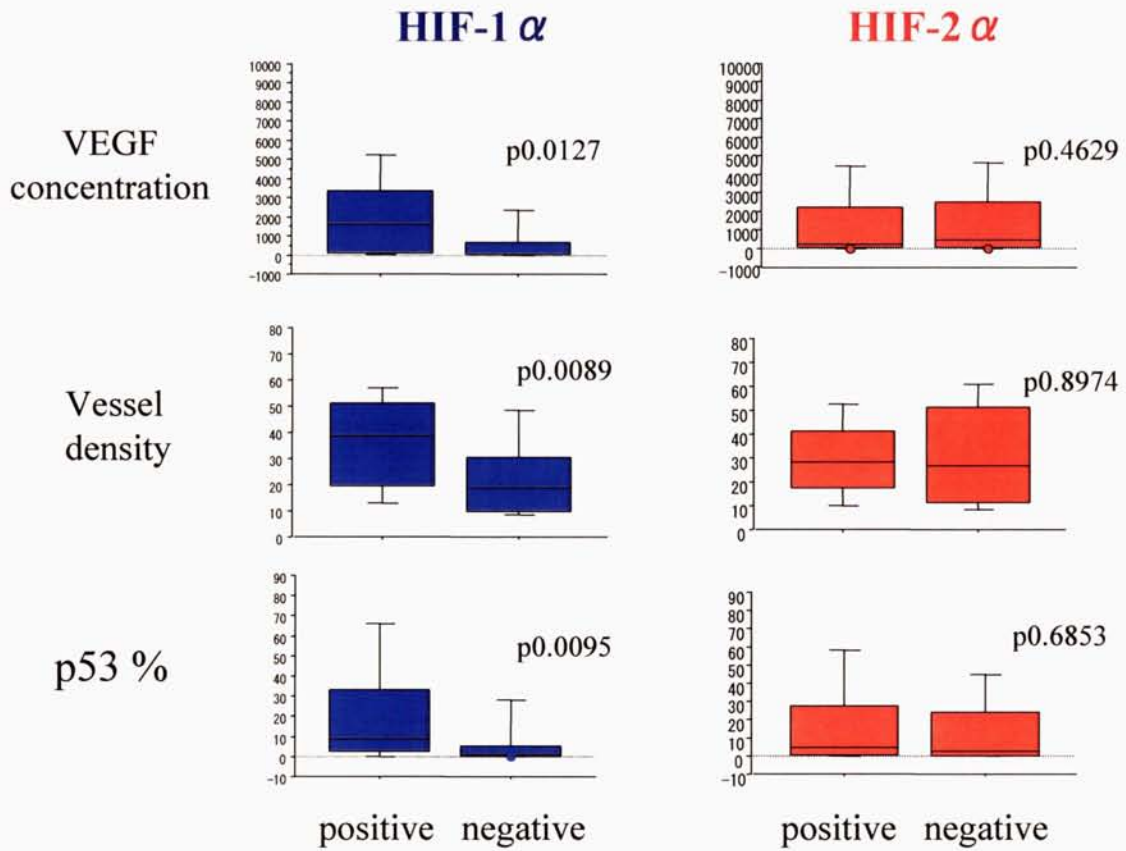
HIF-1 $\alpha$  expression in glioblastoma: note staining in the peri-necrosis



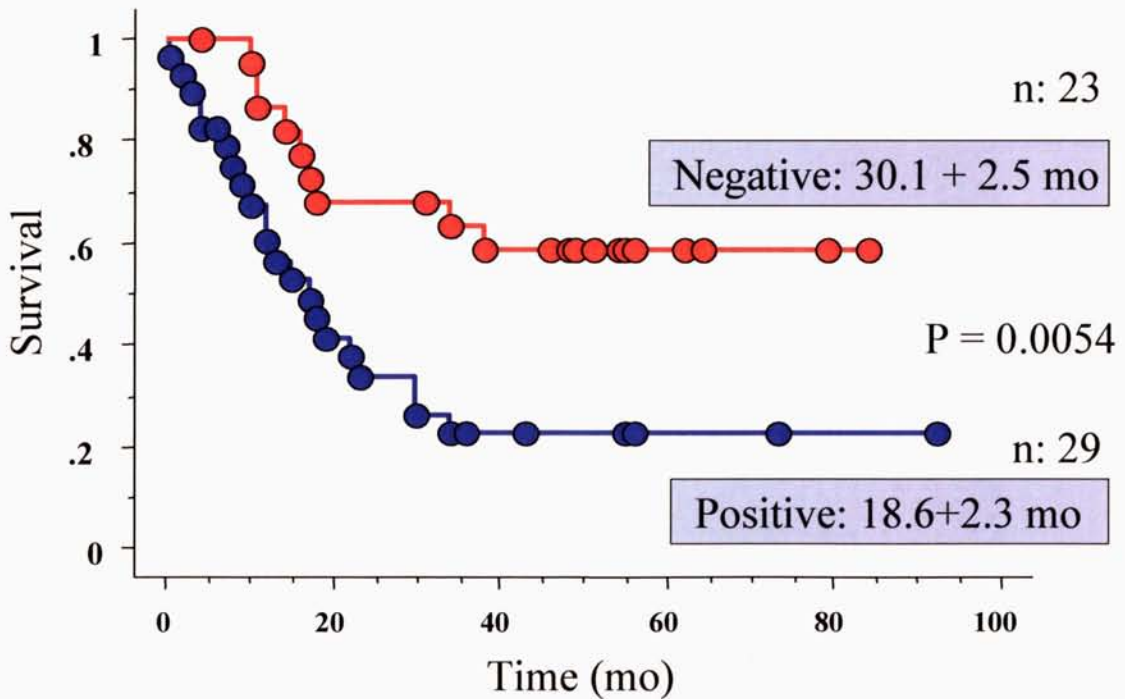
HIF-2 $\alpha$  expression in low grade astrocytoma



☒ 1 1 Relationship between HIF expression and angiogenesis



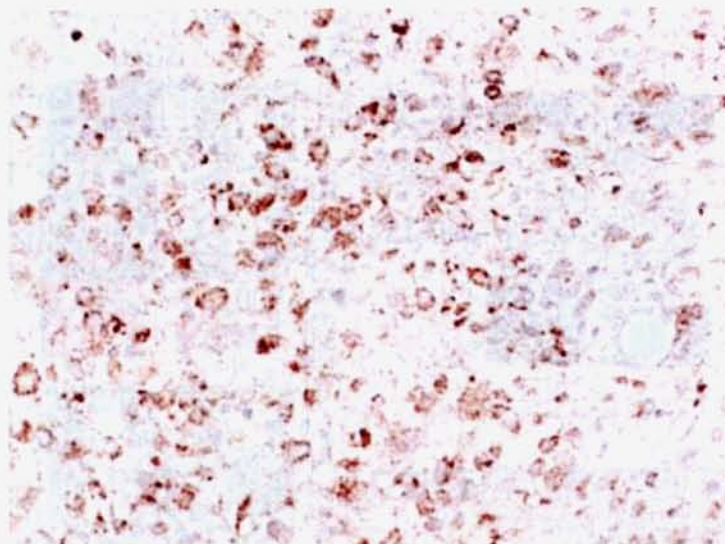
☒ 1 2 HIF1 $\alpha$  is a bad prognostic factor in the patients with gliomas





☒ 1 3 **Angiopoietin expression in gliomas**

Angiopoietin-1 expression in glioblastoma



Angiopoietin-2 expression in low grade astrocytoma

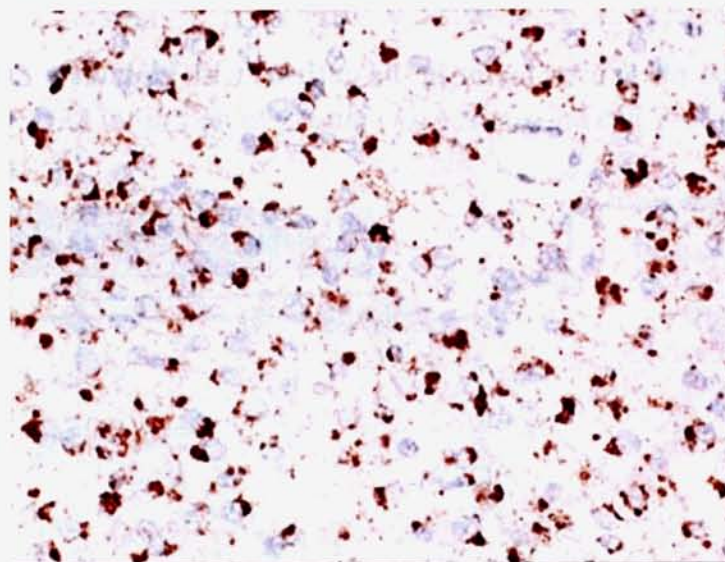


图 1 4 Relationship between angiopoietin expression and angiogenesis

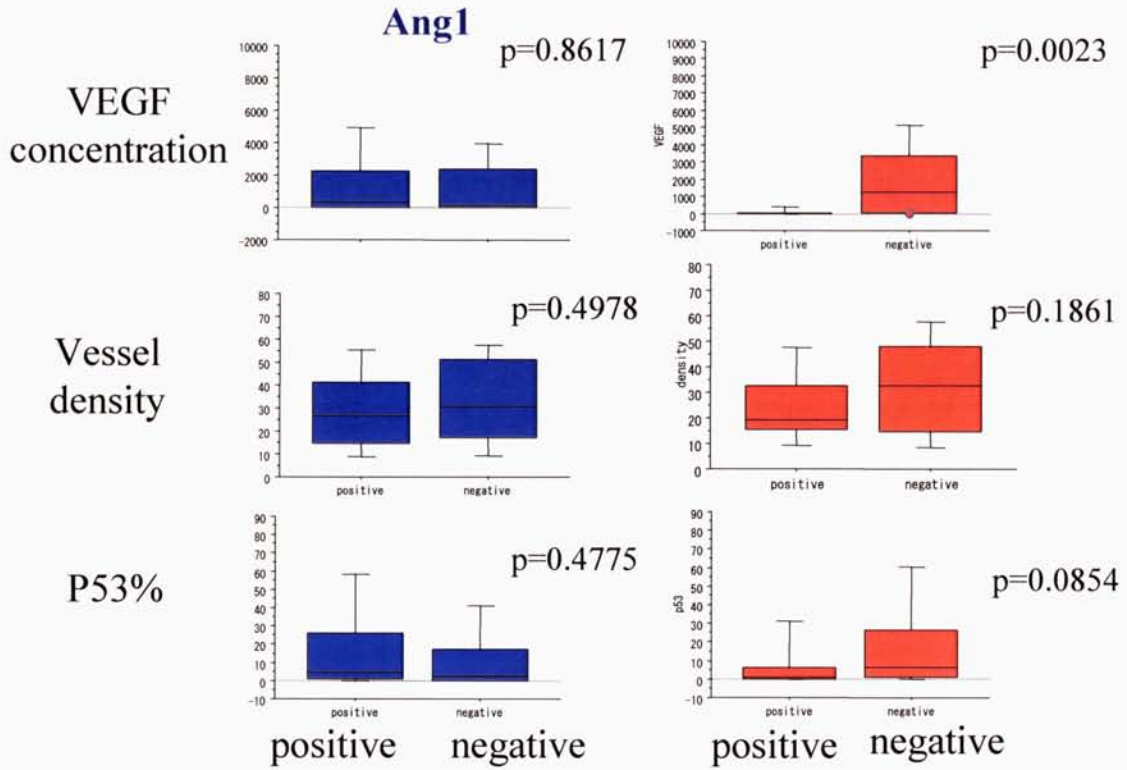


图 1 5 Ang2 is a good prognostic factor in the patients with gliomas

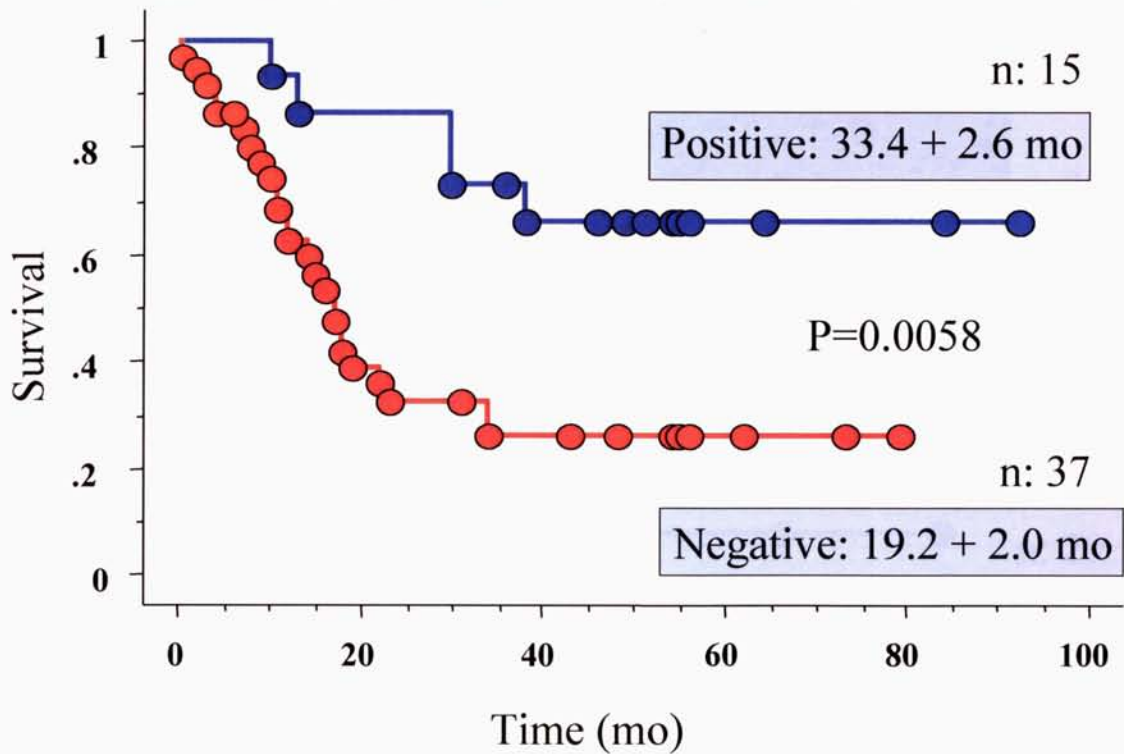


图 1 6 血管改变 of gliomas and HIF / Ang 表达

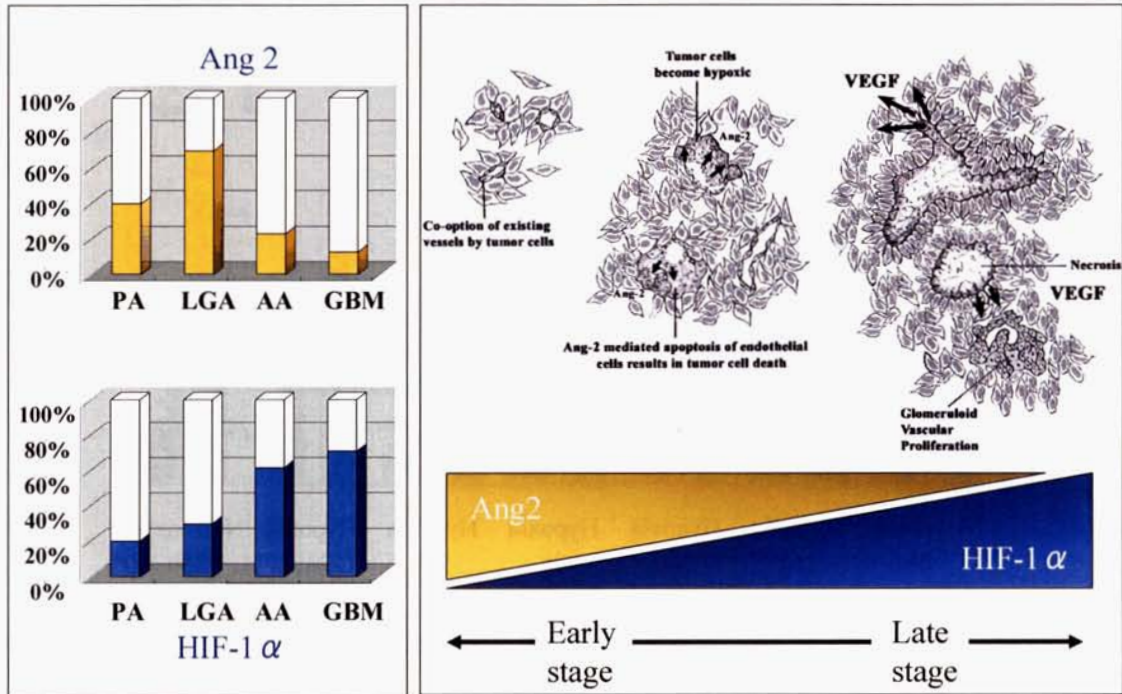


图 1 7 SN38 inhibition of glioma and endothelial cell proliferation (WST8 assay)

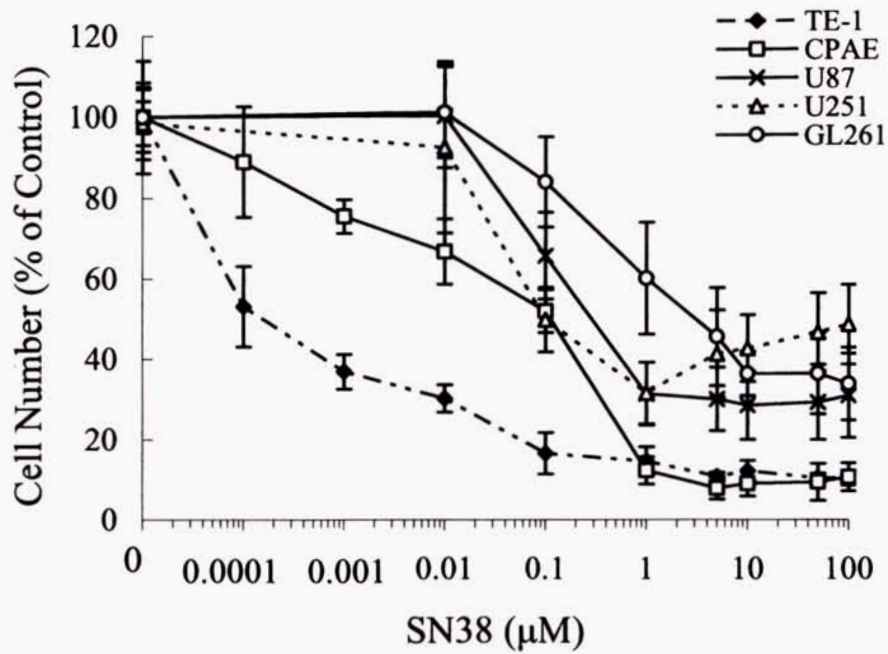


图 1 8 SN38 抑制 HIF1- $\alpha$  / VEGF mRNA 表达

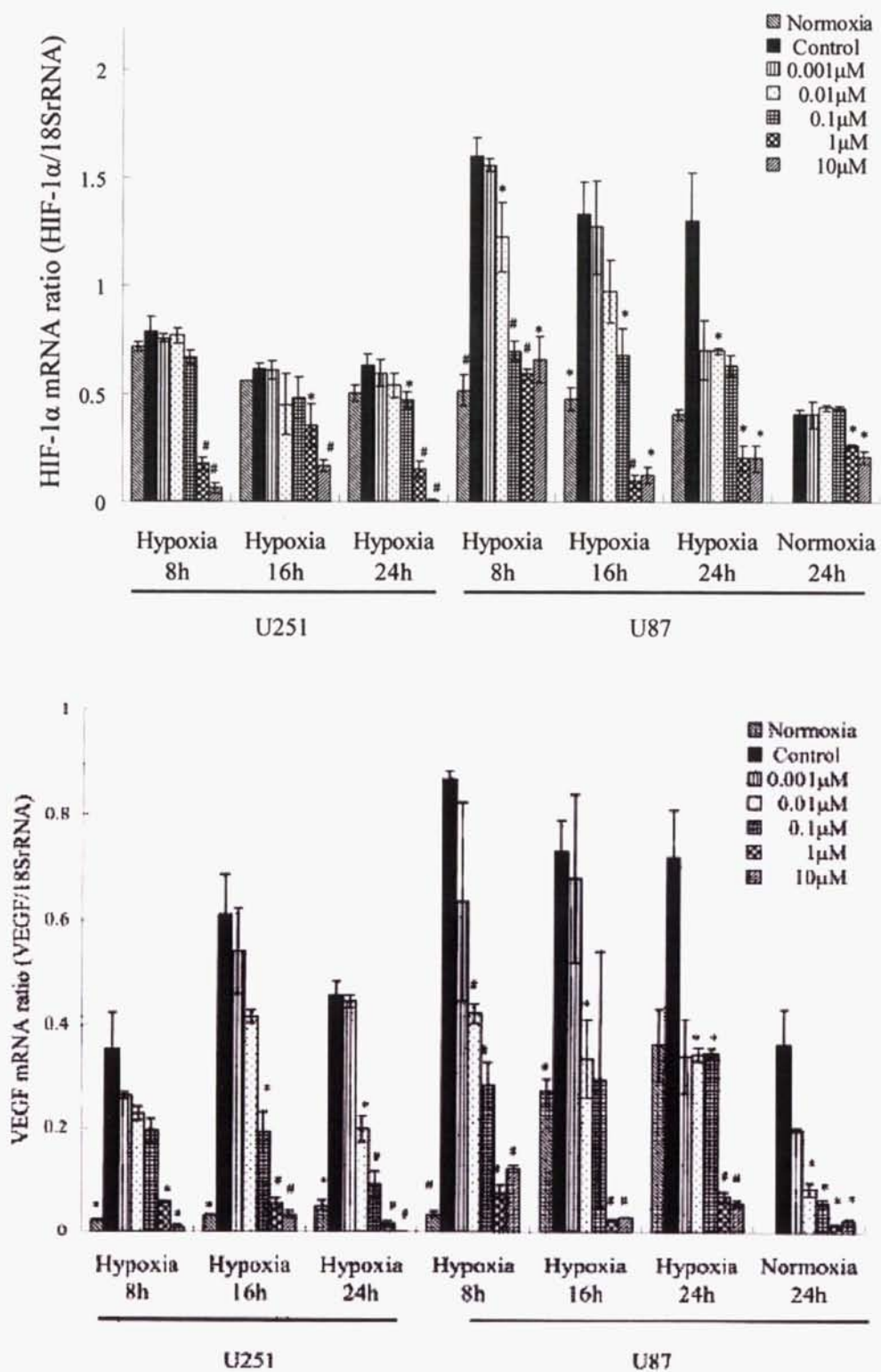




图 1 9 Western blot analysis of HIF1- $\alpha$  expression

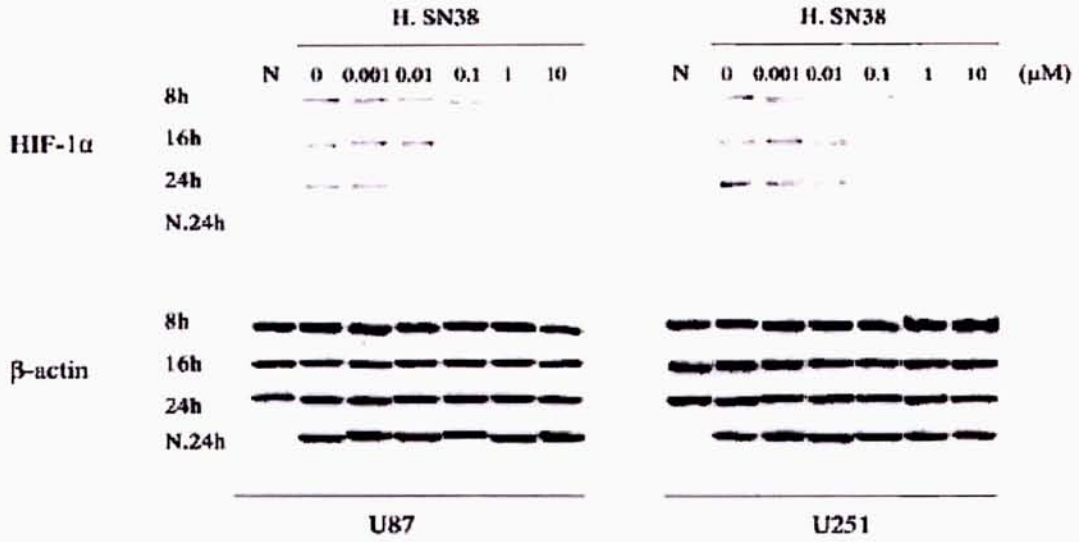


图 2 0 SN38 inhibition of VEGF secretion

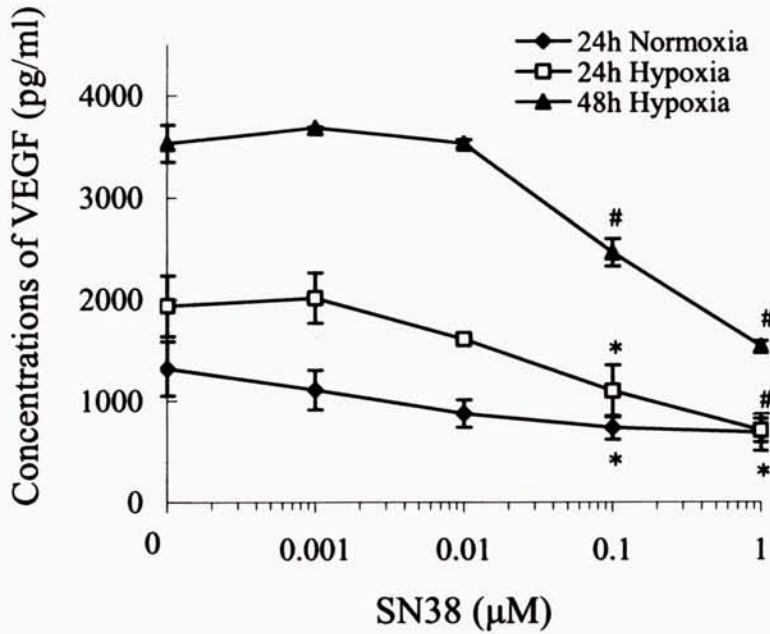


图 2 1 SN38 inhibition of endothelial cell tube formation

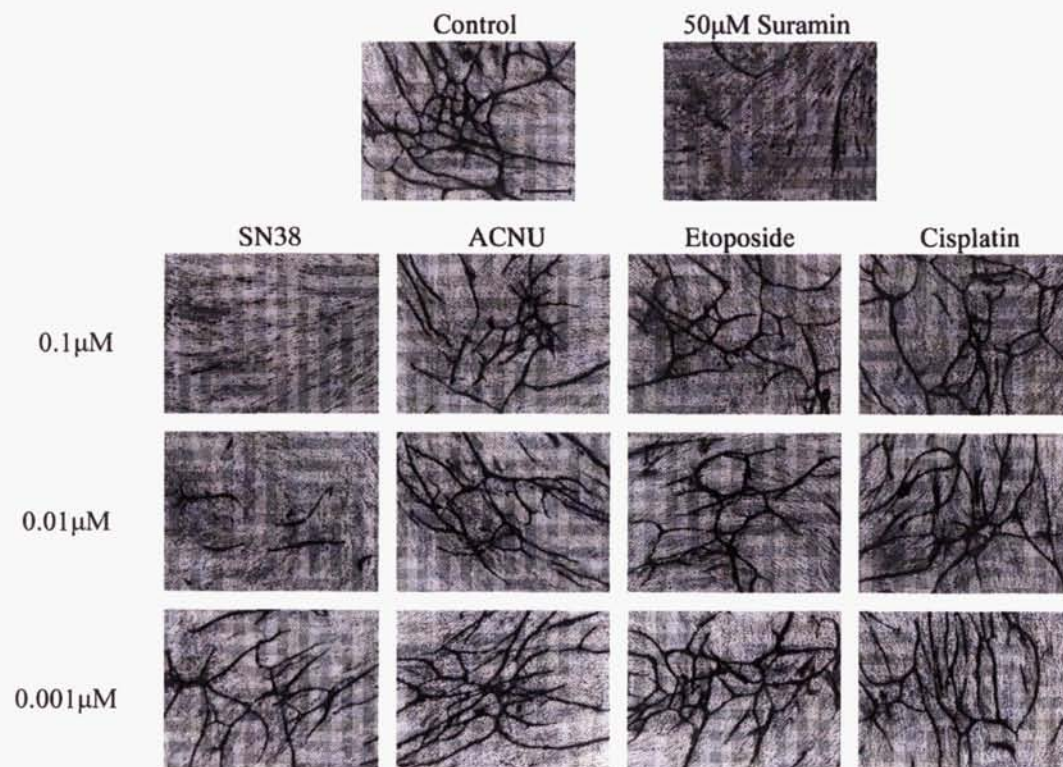


图 2 2 Quantitation of SN38 inhibition of endothelial cell tube formation

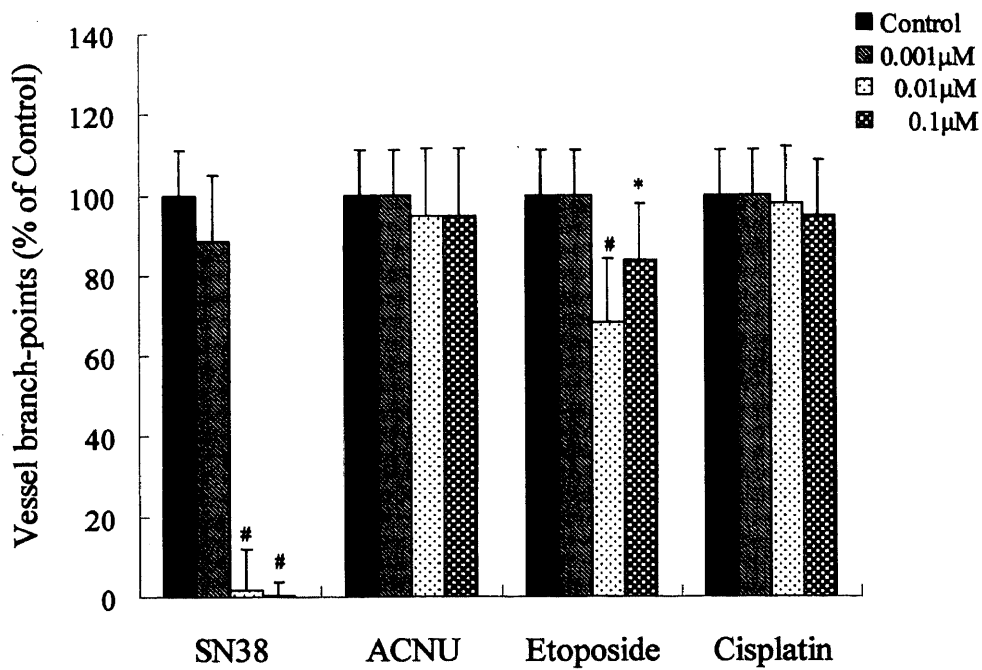
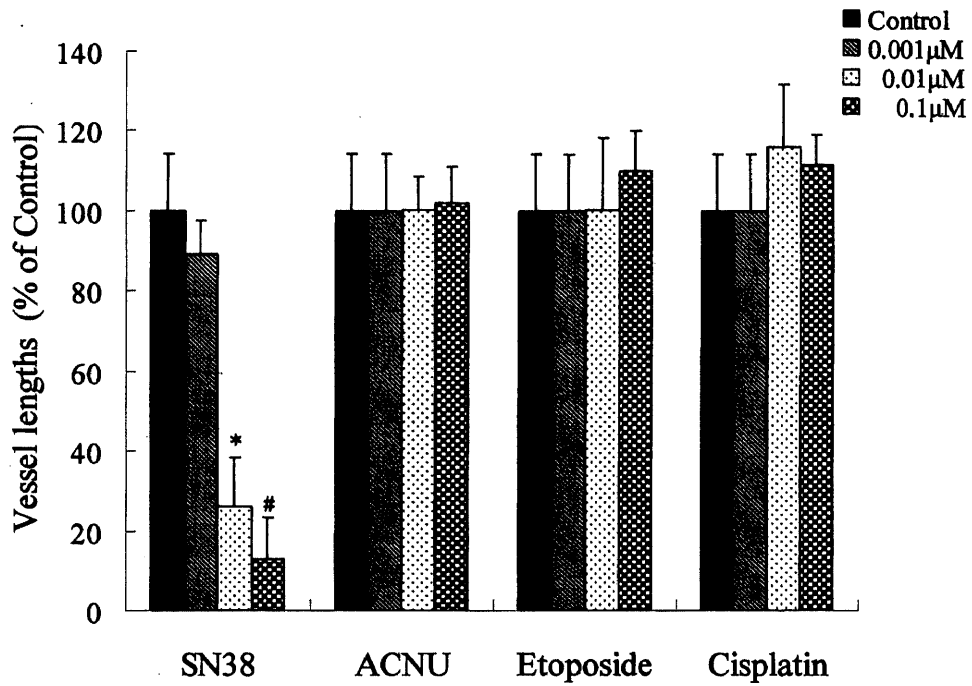


图 2 3 CPT-11 is effective even for ACNU resistant clone U87-AR

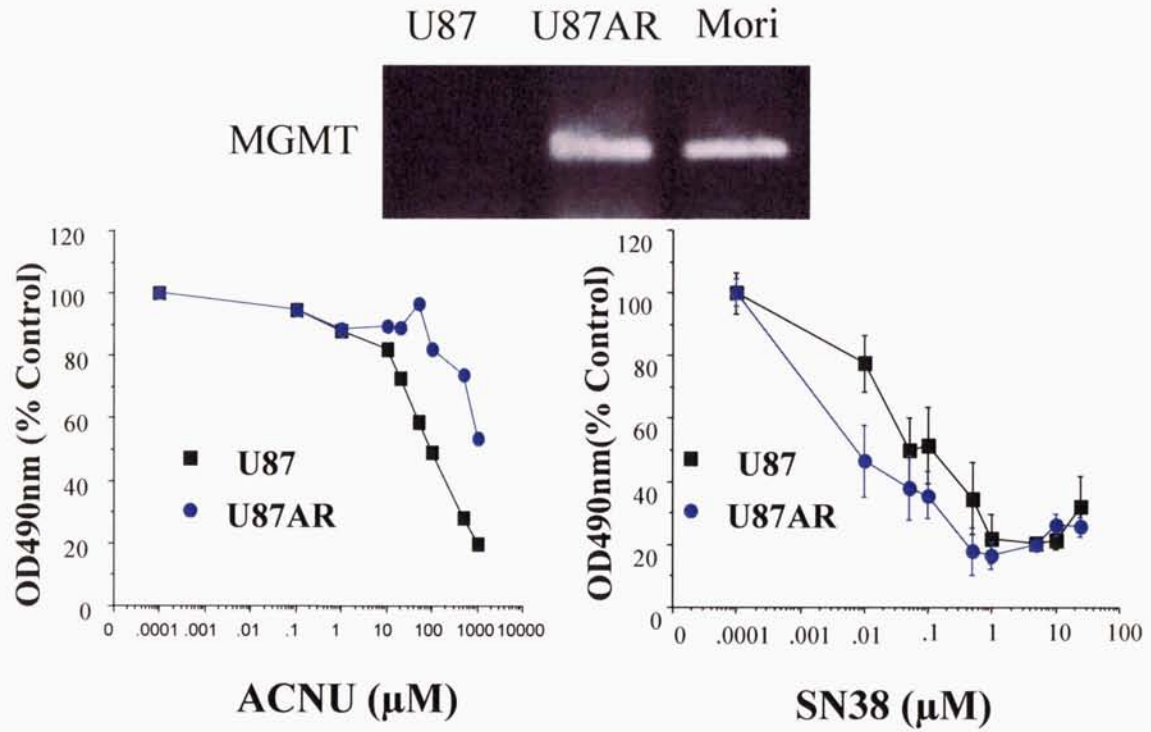
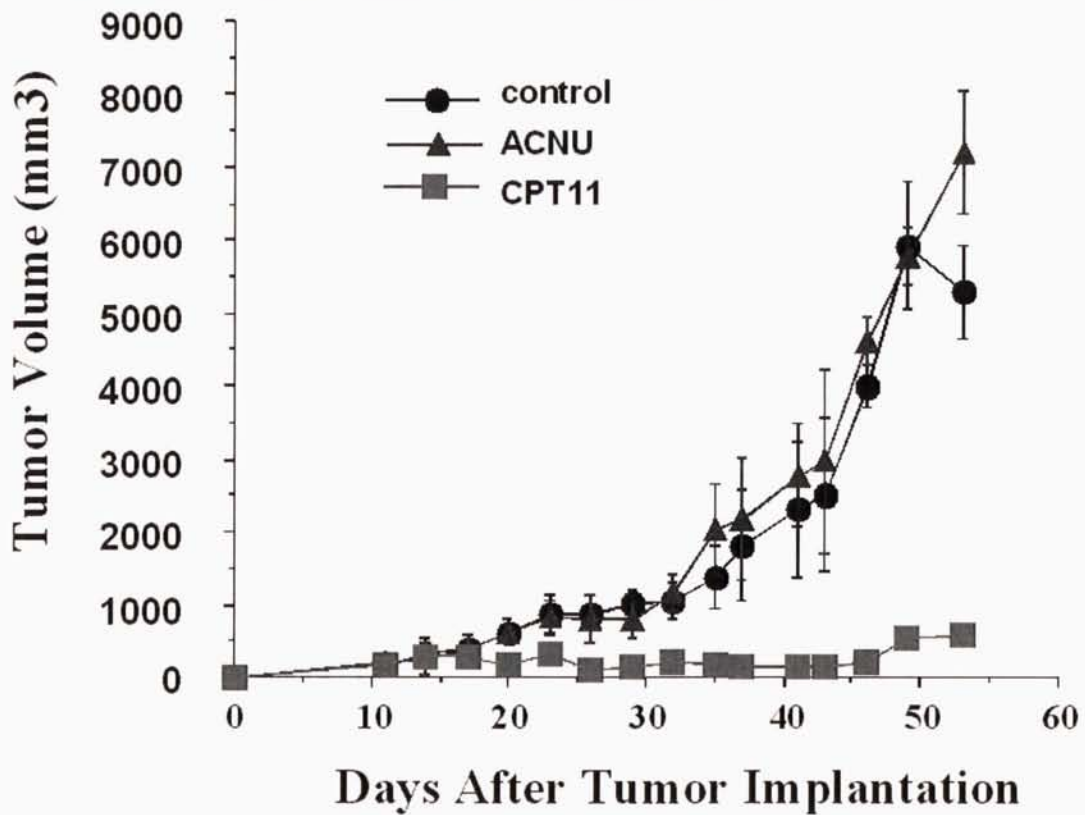


图 2 4 CPT-11 inhibits ACNU resistant clone growth





☒ 25 VEGF expression. A: control, B: CPT-11 treatment, C: VEGF ELISA of tumor tissues

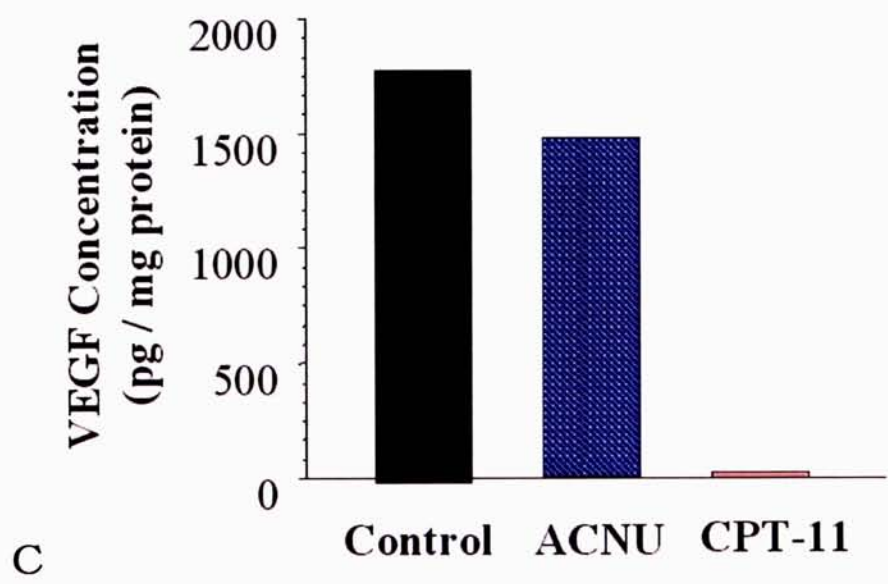
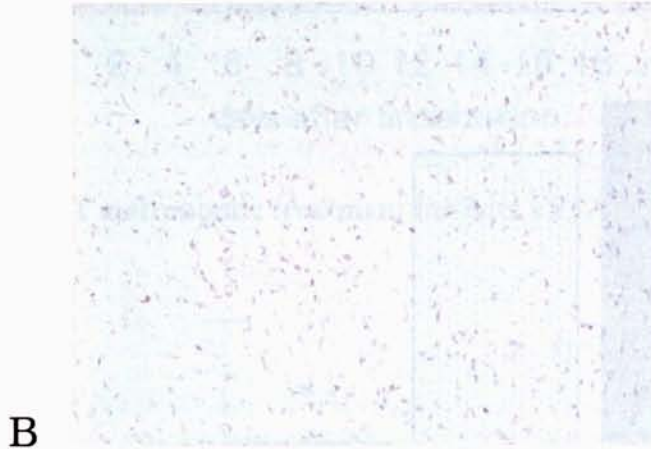
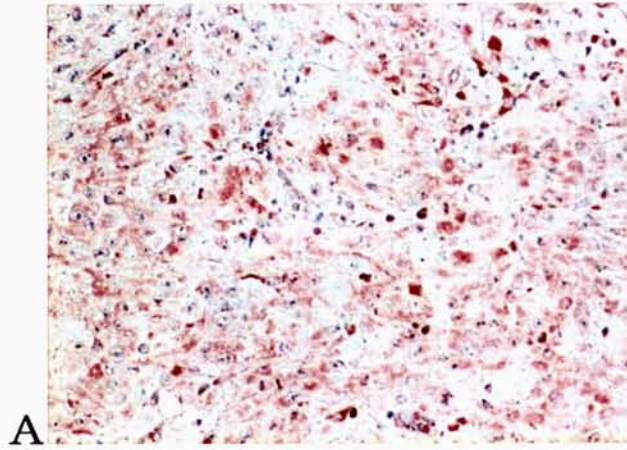


图 2 6 CPT-11 treatment inhibits angiogenesis (A), tumor cell proliferation (B) and enhance tumor cell apoptosis (C)

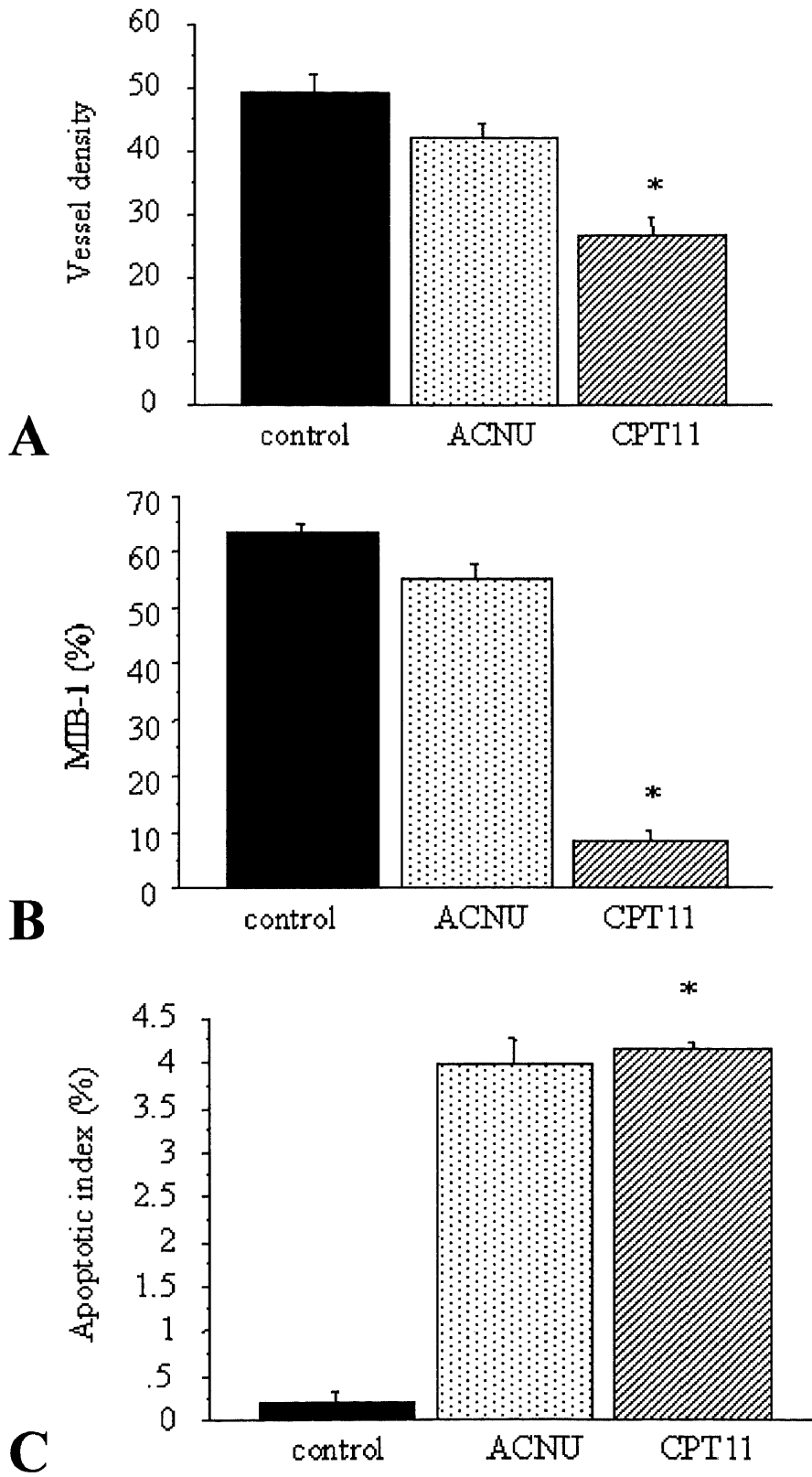


图 2 7 CPT-11 metronomic treatment inhibits U87 glioma growth

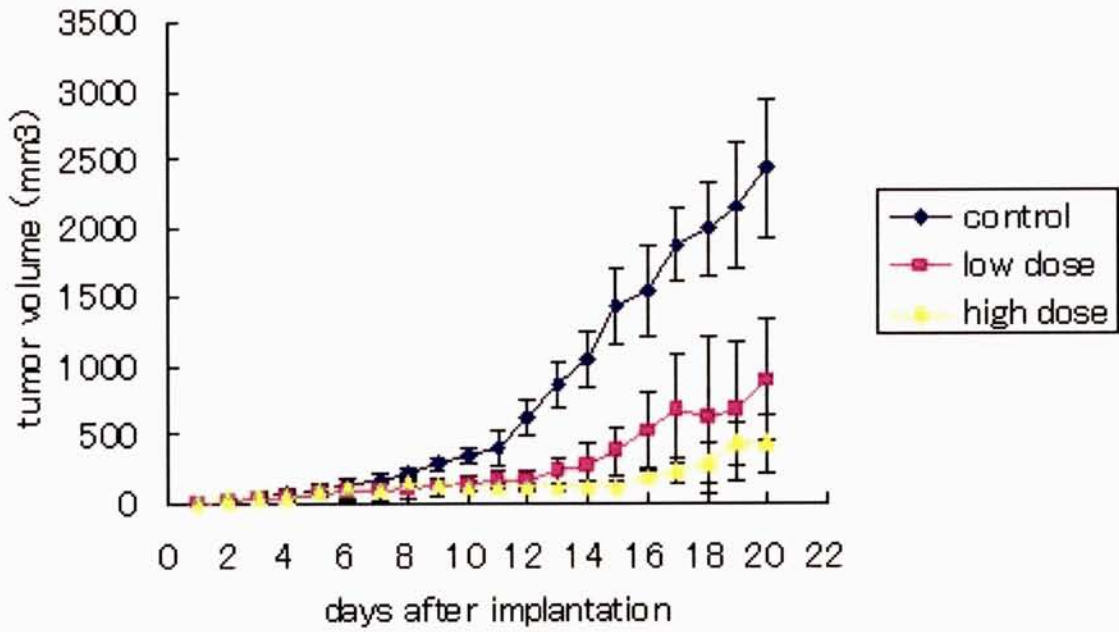
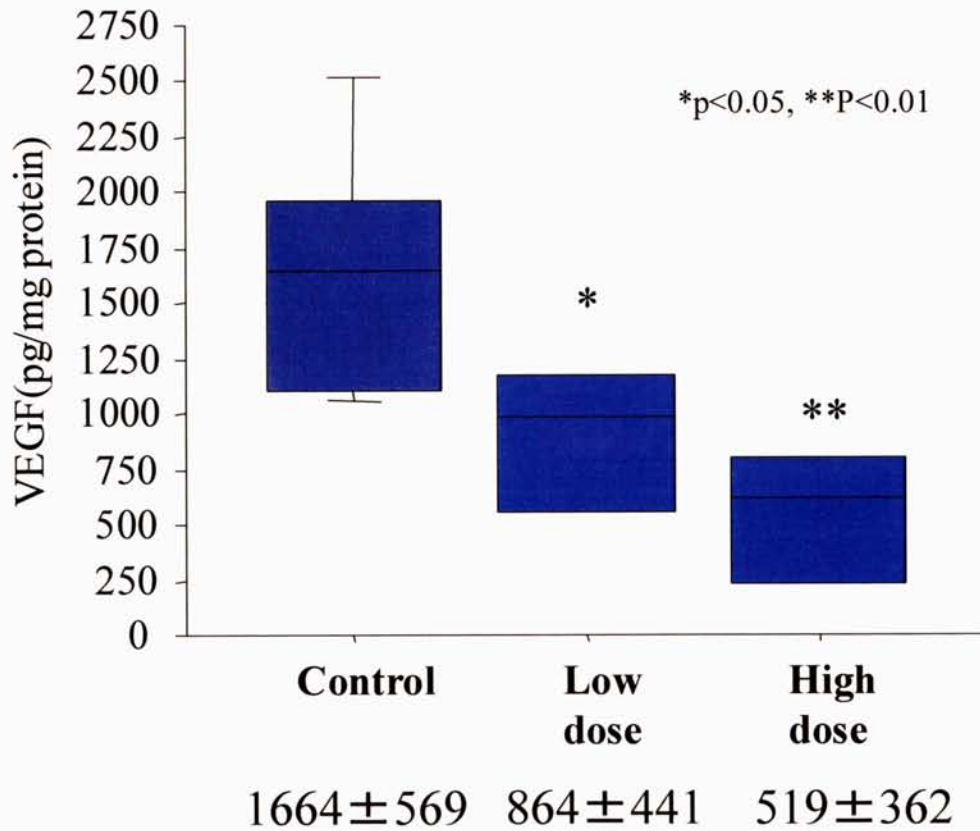
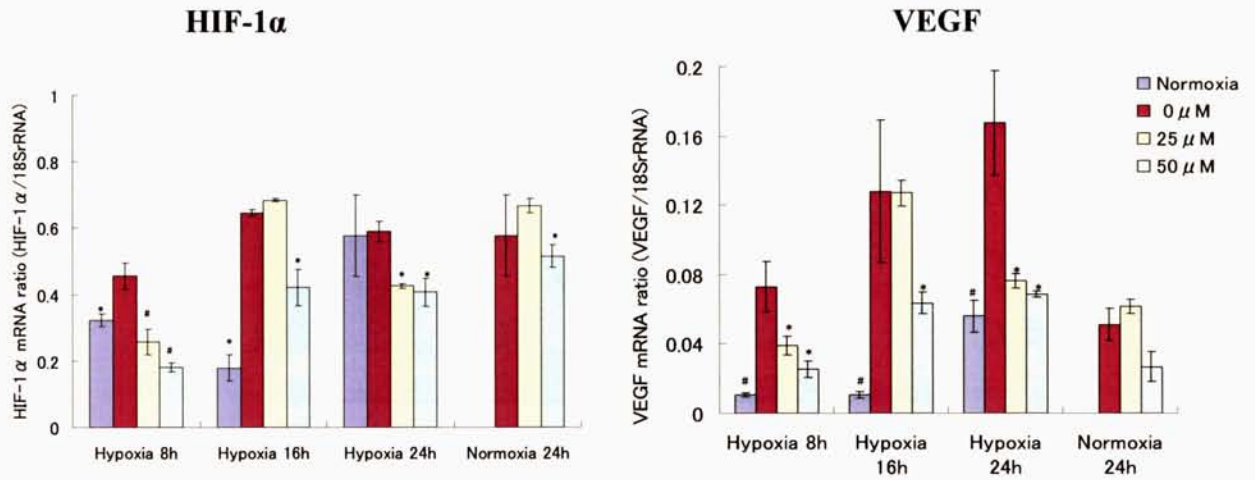


图 2 8 CPT-11 metronomic treatment inhibits VEGF expression in glioma tissues



**3 0 2ME inhibits HIF1- $\alpha$  expression of glioma cells: real time RT-PCR analysis**

**U87 glioma cell**



**U251 glioma cells**

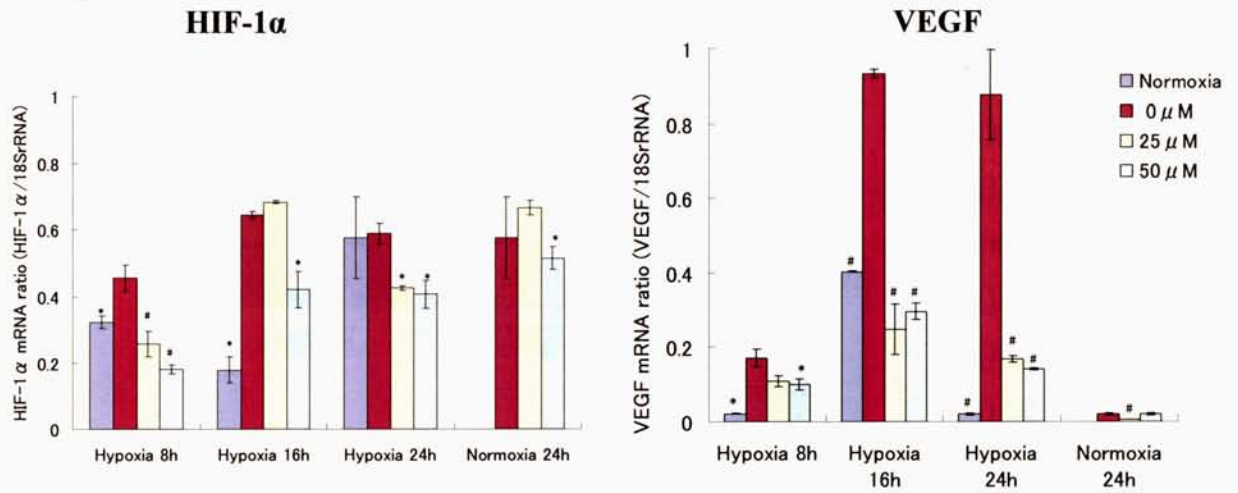


图 3 1 Elevation of NK cell ratio with JTT treatment on old mice

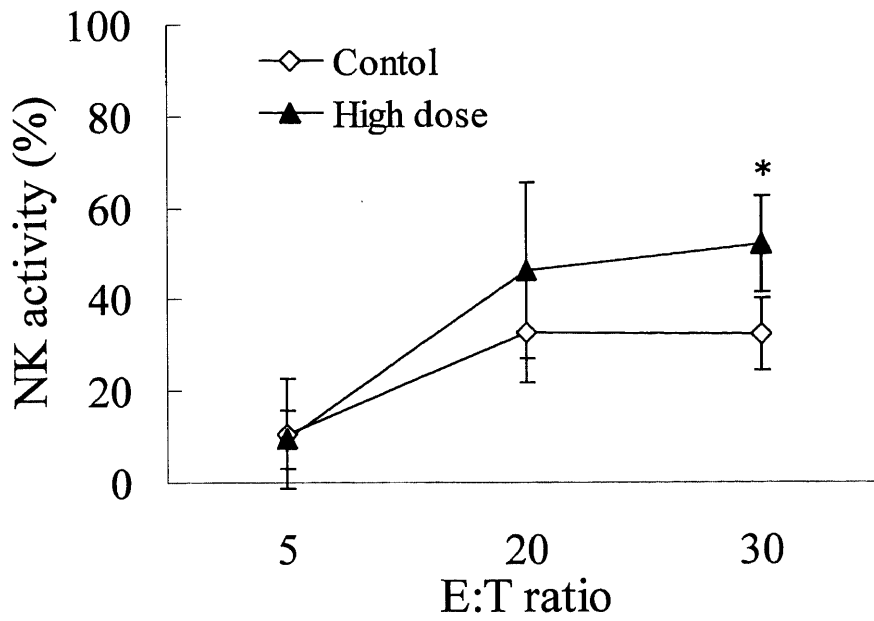


图 3 2 JTT treatment decreased vessel area in glioma tissues on old mouse

A: old control mouse

B: Old mouse JTT high dose treatment

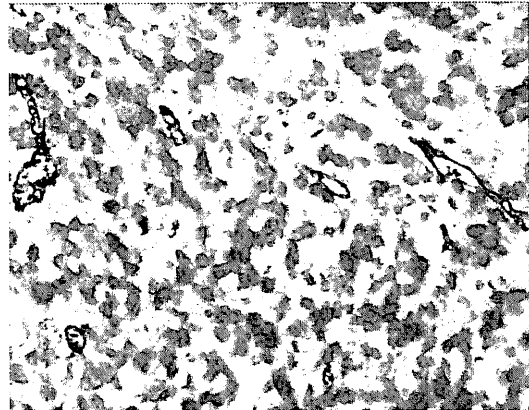
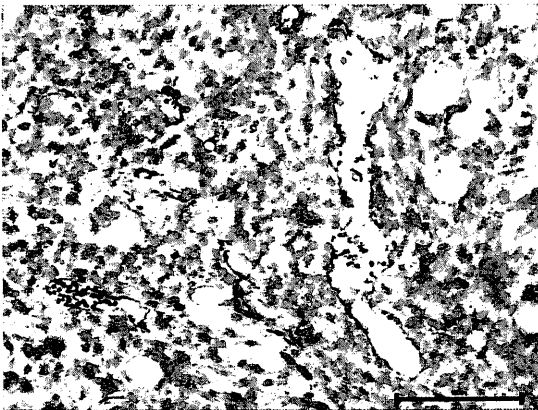
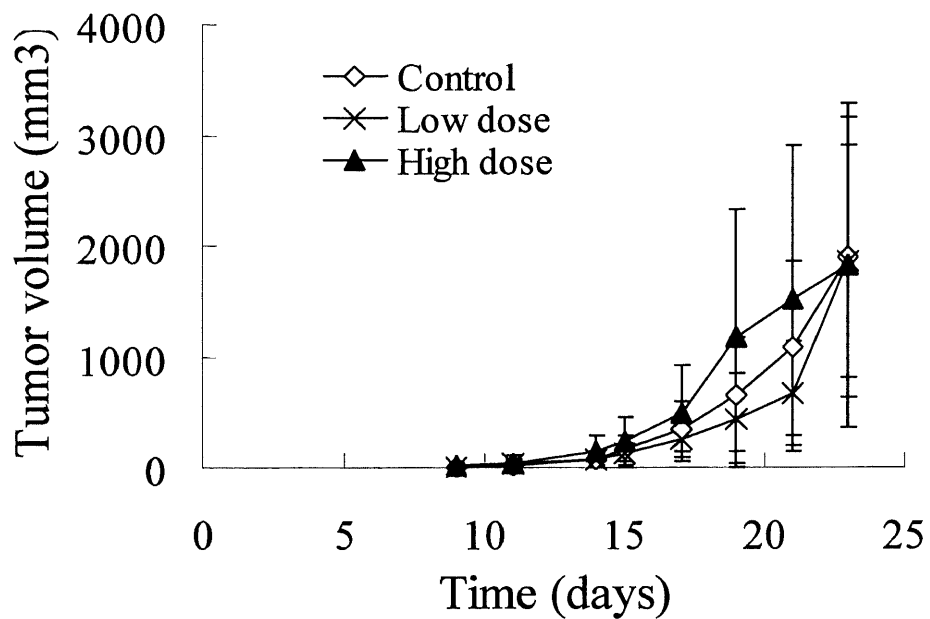
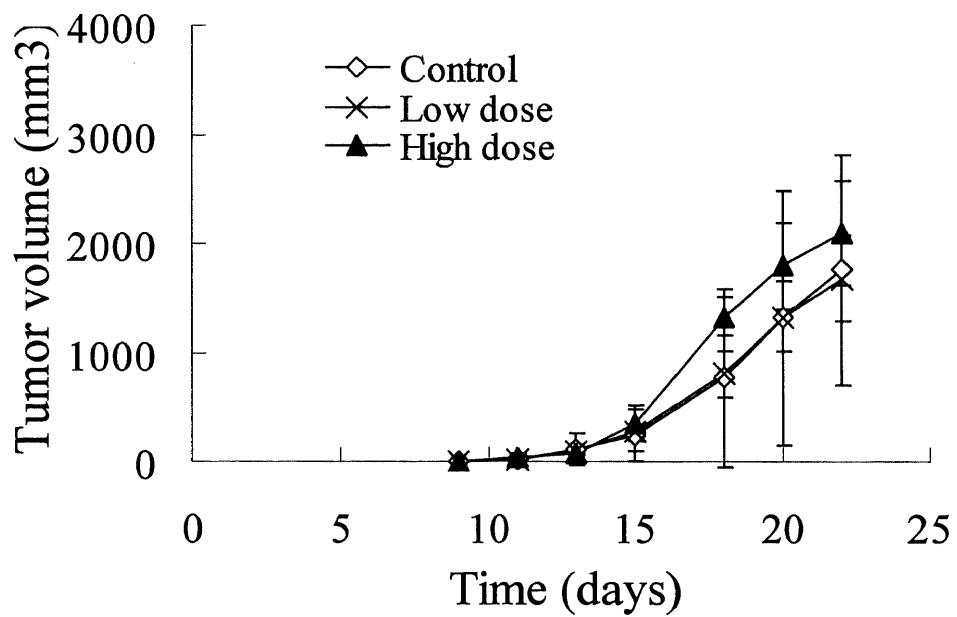


图 3 3 GL261 glioma growth with JTT treatment

A: Young mouse



B Old mouse



**Table 1** Surface phenotypic analysis of spleen lymphocytes with/without JTT treatment

	Groups	NK cells (%)	NKT cells (%)	T cells (%)	CD4/CD8a ratio
Young	Control n=4	1.97 ± 0.52	0.95 ± 0.23	29.3 ± 0.86	1.59 ± 0.19
	Low dose n=4	2.12 ± 0.46	0.91 ± 0.42	30.3 ± 2.69	1.45 ± 0.13
	High dose n=4	2.06 ± 0.42	0.96 ± 0.25	31.2 ± 2.95	1.39 ± 0.14
Old	Control n=4	1.88 ± 0.14	1.88 ± 0.34	28.1 ± 2.65	2.12 ± 0.59
	Low dose n=4	2.26 ± 0.42	1.24 ± 0.30	24.7 ± 5.09	2.11 ± 0.36
	High dose n=4	2.46 ± 0.34*	1.58 ± 0.36	23.4 ± 1.38	2.40 ± 0.13

**Table 2** Vascular and proliferative characteristics of tumors with/without JTT treatment

	Groups	Vessel numbers / 0.13 mm <sup>2</sup>	Vessel area (%)	Ki-67 Positivities (%)	VEGF Positivities
Young	Control n=9	13.7 ± 2.75	5.71 ± 2.33	71.2 ± 5.40	++
	Low dose n=5	13.9 ± 7.65	3.13 ± 1.31	74.1 ± 7.43	++
	High dose n=5	13.2 ± 4.75	2.84 ± 0.85	72.0 ± 2.78	++
Old	Control n=9	13.1 ± 4.60	4.38 ± 1.24	74.4 ± 4.01	++
	Low dose n=4	12.5 ± 2.27	2.72 ± 0.82*	72.8 ± 2.75	++
	High dose n=5	11.7 ± 4.29	1.89 ± 0.44*	70.8 ± 1.84	++

#### IV 結語

脳腫瘍、特に悪性グリオーマに対する血管新生抑制療法はようやく臨床の効果が明らかとなる臨床試験の結果が出てきたばかりである。MRI による血管新生の抑制効果と臨床データとの比較によりさらなる臨床試験が必要とされる。他臓器の腫瘍で効果がみられている抗 VEGF 抗体の悪性グリオーマに対する臨床効果は現在のところ不明であるが、動物実験では単独使用で著明な腫瘍縮小効果がみられ、化学療法剤との併用で相加効果が見られていることから、適応症例を選択しながら臨床試験を行なっていくべきであろう。今後は局所療法と全身療法との比較、化学療法との併用、違った作用機序の血管新生抑制剤の併用、放射線療法との併用、免疫療法との併用が有望な治療方法と考えられる。特に、グリオーマの組織でみられる低酸素状態は、腫瘍の悪性化への血管新生のスイッチでもあり、悪性グリオーマに対する血管新生抑制療法あるいは低酸素を標的とした治療は今後極めて重要になってくると考えられる。本研究の成果が悪性グリオーマ患者の予後向上にささやかながら貢献することを期待している。

#### V 謝辞

本研究は筑波大学大学院修士課程の神山洋君、筑波大学技官の宮川牧子さん、塚田喜子さん、ツムラ医薬評価研究所の金子 篤先生、木戸敏孝先生、第一製薬（株）の市川 豊さん、中井康文さん、筑波大学脳神経外科の先生方のお力添えにより成果を得ることができました。ここに研究にご協力いただきました方々に深謝致します。



著作権の制約により、報告書に掲載のある以下の論文はオンラインでは公開していません。

Kamiyama H, Takano S, Tsuboi K, Matsumura A. Anti-angiogenic effects of SN38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1a)/vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Apr;131(4):205-13.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00432-004-0642-z>