

博士論文

腫瘍血管の透過性を規定する因子についての研究

坂井 慧

目次	
本文中に登場する主な略語一覧.....	6
要旨.....	7
序章.....	8
第1章 線維化の顕著な新規動物腫瘍モデルにおける高分子薬剤の分布.....	10
序文.....	10
化学療法における高分子薬剤の優位性について.....	10
膵臓癌・線維化・腫瘍間質について.....	11
方法.....	14
細胞.....	14
動物.....	14
移植.....	14
組織染色.....	15
免疫組織化学.....	15
ヒアルロナン染色.....	17
FITC-dextran 分布評価.....	18
ヒドロキシプロリン定量.....	18
RNA 抽出および定量的 RT-PCR.....	19

統計解析.....	20
結果	21
FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて線維化を亢進させる	21
FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて FITC-dextran の腫瘍内分布を阻害する.....	23
FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいてコラーゲンの発現を上昇させる ..	23
FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいてヒアルロナンの蓄積に影響を与えない.....	26
FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて腫瘍血管の血管密度および壁細胞被覆率に影響を与えない.....	26
FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて腫瘍リンパ管新生を促進する	28
考察	32
腫瘍組織におけるコラーゲン発現に対する腫瘍実質 (BxPC-3)および間質 (マウス由来細胞)の寄与について	32
本研究における間質圧の影響について.....	33
リンパ管新生の FITC-dextran 腫瘍内分布に対する影響について.....	34
FGF-2 の作用メカニズムについて	35
FGF-2 以外の線維化促進因子の影響について	35

今後の展開について.....	36
本研究の有用性.....	37
第2章 正常脳組織および脳腫瘍における PDPN の血管透過性に対する作用	38
序文.....	38
星細胞 (アストロサイト astrocyte)系腫瘍について.....	38
BBB および BTB について.....	39
血小板における ITAM シグナリングによる血管安定性の維持について.....	41
PDPN について.....	43
BMP シグナルと PDPN の発現を制御する因子について.....	44
方法.....	46
使用細胞.....	46
増殖因子と阻害剤などの薬剤およびそれらの細胞に対する処置.....	47
動物.....	47
免疫組織染色.....	48
フローサイトメトリーによる PDPN 発現解析.....	49
一過性前脳 (全脳) 虚血モデル.....	49
脳腫瘍細胞頭蓋内移植.....	50
RNA 抽出および定量的 RT-PCR.....	51

統計解析.....	52
結果	53
PDPN はマウス正常脳組織において主に血管周囲のアストロサイトに強く発現している.....	53
一過性前脳 (全脳)虚血モデルに対する PDPN 中和抗体の投与は血管の透過性を高める.....	53
PDPN は膠芽腫由来細胞 (in vitro)およびその同所移植モデル (in vivo)の双方に発現している.....	57
BMP シグナルの活性化は PDPN の発現を低下させる	59
考察	64
GPVI の関与について	65
PDPN 中和の実用化に向けた課題	65
PDPN のバリア機能について	66
PDPN の BBB における血管安定性維持のメカニズムについて	67
PDPN の BTB における役割について.....	67
今後の展開について.....	68
結語	70
引用文献	72

謝辭 83

本文中に登場する主な略語一覧

第 1 章

ECM: extracellular matrix

FGF-2: fibroblast growth factor-2

FITC: fluorescein isothiocyanate

HABP: hyaluronan binding protein

HE: hematoxylin-eosin

LYVE1: lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1

PECAM1: platelet endothelial cell adhesion molecule-1

α -SMA: α -smooth muscle actin

第 2 章

BBB: blood-brain barrier

BMP: bone morphogenetic protein

BTB: blood-tumor barrier

CLEC2: C-type lectin 2

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GPVI: Glycoprotein VI

ID1: inhibitor of DNA binding 1

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

mAC: mouse astrocyte

PDPN: podoplanin

要旨

膵臓癌や膠芽腫の難治性の原因の一つに、腫瘍組織に対する薬剤送達性の低下が考えられる。そこで本研究では、第 1 章では膵臓癌の間質における薬剤の拡散に影響する因子について、第 2 章では膠芽腫の腫瘍血管漏出性に影響する因子についてそれぞれ検討した。

第 1 章では、ヒト膵臓癌細胞株皮下移植モデルにおいて、FGF-2 の添加が線維化を亢進させること、および FITC-dextran の腫瘍内分布を阻害することを示した。

第 2 章では、PDPN が正常脳組織において血管の安定性を維持しており、BMP シグナルが PDPN の発現を制御することを見出した。

本研究の成果は抗癌剤を用いた腫瘍治療のさらなる進展に寄与すると思われる。

序章

抗癌剤が抗腫瘍効果を発揮するには、薬剤投与後腫瘍血管から腫瘍組織へと移行したのち、腫瘍間質を通過して腫瘍実質にまで到達する必要がある (図 1)[1]。従って、抗癌剤の血管から腫瘍組織への漏出および間質における拡散に影響する因子を研究することは、抗癌剤を用いた腫瘍治療のさらなる進展に寄与しうる。

そこで本研究においては、難治性で予後が悪い膵臓癌および膠芽腫に着目し、第 1 章では膵臓癌の間質における薬剤の拡散に影響を与える因子について、第 2 章では膠芽腫の腫瘍血管における血管から組織への薬剤の漏出に影響を与える因子についてそれぞれ検討した。

図 1

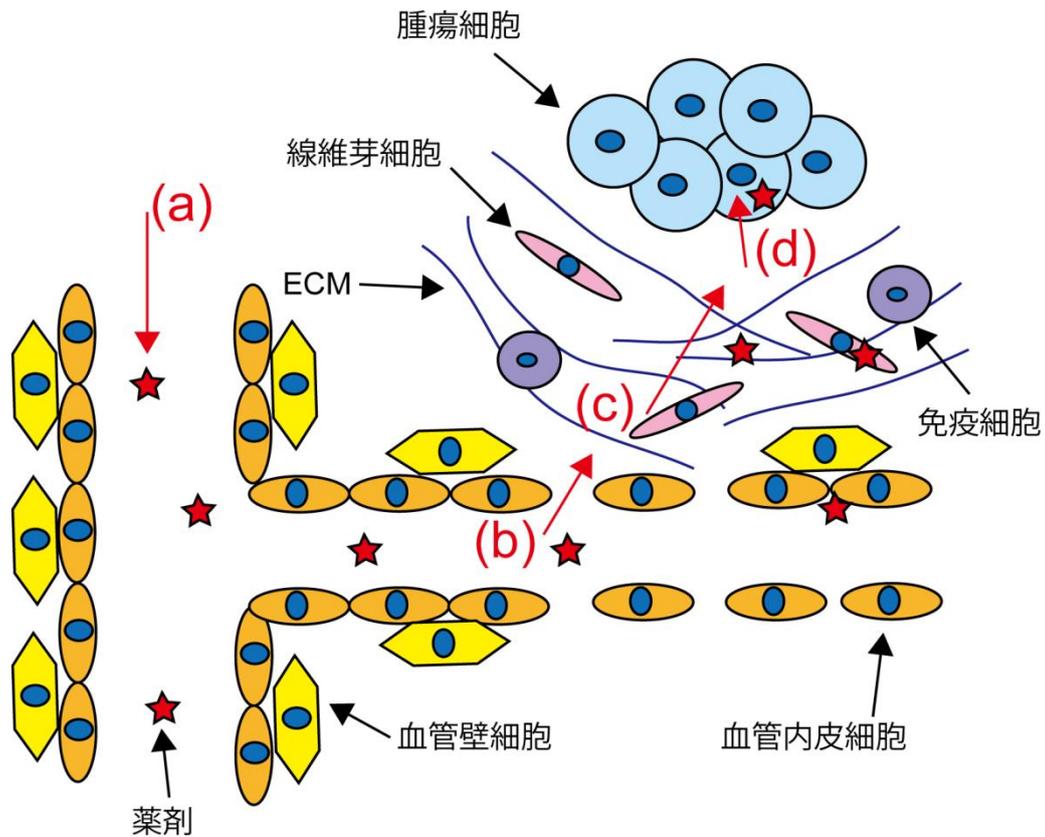


図 1 抗癌剤の血管内投与から腫瘍細胞到達までの模式図

血中投与後、順に(a)から(d)までの過程を経て腫瘍細胞内に到達する。(a)血液中を拡散し血管内に分布。投与した抗癌剤の一部が腫瘍血管に分布する。(b)腫瘍血管壁の通過。組織に移行できる抗癌剤の量は血管壁の漏出性に依存する。(c)腫瘍間質領域を拡散により通過。間質成分の性状は薬剤の拡散に影響する。(d)腫瘍細胞内への到達。第 1 章では(c)、第 2 章では(b)の過程にそれぞれ着目している。

第1章 線維化の顕著な新規動物腫瘍モデルにおける高分子薬剤の分布

序文

化学療法における高分子薬剤の優位性について

従来から腫瘍の治療に用いられる抗癌剤には低分子薬剤が多い。低分子薬剤は抗腫瘍効果を発揮させるために可能な限り高用量からの投与になる。しかし、抗癌剤は腫瘍細胞のほか、腸管上皮細胞や骨髄細胞といった増殖の速い正常細胞にもダメージを与えるため、しばしば嘔吐・下痢や骨髄抑制などの副作用を伴う[2]。

このような副作用を回避しつつ薬効を高めるため、腫瘍特異的に抗癌剤を送達する drug delivery system (DDS)が盛んに研究されている[2]。DDS 技術の中にミセルやリポソームに代表される高分子薬剤がある。高分子薬剤は低分子薬剤と比較して血中滞留性が高い[2,3]。また、一般に腫瘍は血管が豊富な組織である。腫瘍血管は正常血管と比較して血管内皮細胞間に間隙が多く、血管内皮細胞を支持する血管壁細胞が少ないため、正常血管からは漏出しにくい高分子薬剤が漏出しやすい[4]。一方で腫瘍組織内のリンパ管は正常組織と比較して数が少なく、かつ機能的なリンパ管の割合も減少しているため、組織間質に到達した薬剤の排出が遅延する[5,6]。その結果、全身投与された高分子薬剤は腫瘍組織へと集積しやすくなる。これは **enhanced permeability and retention effect** と呼ば

れ、これを利用して高分子薬剤を腫瘍選択的に集積させることができる[7]。従って、高分子薬剤は従来の低分子薬剤と比較して投与量を抑えることができ、副作用が低減する。このため、高分子薬剤は新たな腫瘍治療法として期待されている。

膵臓癌・線維化・腫瘍間質について

膵臓癌は日本人の悪性腫瘍死亡者数の第5位である。膵臓癌の80%から90%は浸潤性膵管癌であり、浸潤性膵管癌は世界的にみても5年生存率が6%以下という難治性の高い腫瘍である[8,9]。浸潤性膵管癌の特徴の一つに腫瘍組織の著明な線維化(腫瘍間質の増生)が知られており、時には腫瘍重量の80%にもなることがある[8]。

腫瘍間質は腫瘍実質以外のすべての成分を指し、細胞成分として線維芽細胞、マクロファージやリンパ球といった免疫細胞、血管内皮細胞などを含む。また、細胞以外の成分としてコラーゲン、ヒアルロナン、フィブロネクチンといった種々の extracellular matrix (ECM)がある[10]。ECMは薬剤の腫瘍内分布に影響を与えることが知られている。たとえば、間質を構成する主要なECMのひとつであるヒアルロナンの除去は低分子薬剤および高分子薬剤の分布を促進する[11,12]。また、コラーゲンも腫瘍間質に豊富に含まれるが、担癌マウスへのコ

ラゲナーゼの全身投与は腫瘍組織のコラーゲンを分解し、抗体およびリポソームの腫瘍内分布を改善する[13,14]。また、Florescent Recovery After Photobleachingを用いた研究により、腫瘍間質において血管から漏出した後の蛍光ラベル IgGの拡散速度はコラーゲン含有量と負の相関があること[15]、および *in vitro* において腫瘍細胞のスフェロイドに対するコラゲナーゼ処置がポリスチレンナノ粒子のスフェロイドへの浸透を促進することが報告されている[16]。これらのことから、腫瘍の線維化は腫瘍血管から漏れ出した薬剤の拡散を阻害し、治療抵抗性を高めている可能性がある。

しかしながら、現状では薬剤分布に対する線維化の影響を適切に評価することが難しい。これは強い線維化を伴う動物腫瘍モデルがほとんど存在しないことが原因の一つである。ヌードマウスをはじめとした免疫不全動物に臨床検体から樹立したヒト腫瘍細胞株を移植し腫瘍を形成させることは広く行われているが、この場合腫瘍間質量がもとの腫瘍組織と比較して減少してしまうことが多い[17,18]。一方で、遺伝子改変により自然発癌する動物腫瘍モデルの中には間質量が多いものが存在するが、一般に発症までに 6 か月から 9 か月かかるため、表現型を解析するのに時間を要する[8]。近年、私の所属する研究室において、新規の線維芽細胞立体培養モデルという *in vitro* 実験系により、線維化が腫瘍に対する薬剤送達を阻害している可能性が示唆された[19]。しかし、*in vivo*

において腫瘍組織の線維化を亢進させる方法についてはほとんど報告がない。

そこでこの章では、ヒト膵臓癌細胞株のヌードマウス皮下移植モデルに対して線維化を亢進させる新規手法を創出すること、および線維化の亢進が高分子薬剤の腫瘍内分布に与える影響について検討することを目的とした。

方法

細胞

ヒト膵臓癌由来細胞株 BxPC-3 (ATCC)は 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone)および 1% penicillin/streptomycin (Gibco)を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 (Gibco)を用いて維持し、37°C、CO₂濃度 5%のインキュベーター内で培養した。

動物

4-6 週齢オスの BALB/c nu/nu マウスを三協ラボサービス株式会社、日本クレア株式会社および日本チャールズ・リバー株式会社から購入して実験に用いた。動物の取り扱いにあたっては東京大学動物実験実施規則に従った。

移植

BxPC-3 を 50% Matrigel (BD bioscience)溶液、すなわち Matrigel と phosphate buffered saline (PBS)の等量混合液に懸濁して 5×10^6 /ml とし、200 μ l をマウスの左腹部皮下に移植した。線維化を誘導するためには、細胞懸濁液に 1 μ g/ml の fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Peprotech)および 100 μ g/ml のヘパリン (持田製薬)を添加した。これらのマウスを評価のため移植 3 から 4 週間後に犠牲

死させ、腫瘍組織を回収した。

組織染色

hematoxylin-eosin (HE)染色および AZAN 染色には、マイルドホルム (和光純薬工業)で固定したのちパラフィン包埋したサンプルを 4 μm に薄切して用いた。切片の観察および画像の撮影には BZ-9000 (Keyence)を用いた。

AZAN 陽性領域の定量には、拡大率 40 倍で撮影された画像を BZ analyzer (Keyence)を用いて連結したのち、Adobe Photoshop Elements (Adobe)および ImageJ (NIH)を使用して腫瘍の最大断面全体の面積に対する AZAN 陽性領域の割合を算出した。

免疫組織化学

マウスから腫瘍組織を回収し、未固定で Optimal Cutting Temperature (OCT) compound (サクラファインテック)に包埋して -80°C で急速凍結した。凍結したサンプルをクライオスタットで 10 μm に薄切し、マイルドホルムで軽く固定したのち洗浄した。洗浄後風乾し、Blocking One (ナカライテスク)で 30 分間ブロッキングしたのち一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、洗浄後対応する二次抗体を 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で室温で 1 時間反応させた。二次抗体は anti-rat

Alexa 488、anti-rat Alexa 594、anti-rabbit Alexa 488 および anti-rabbit Alexa 594 (すべて goat 由来) (Life Technologies)の中から適切なものが選択された。洗浄後、核を 1 $\mu\text{g/ml}$ の 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Life Technologies)で染色して BZ-9000 または DMI6000 B AFC (Leica)を用いて観察した。使用した一次抗体の一覧を表 1 にまとめている。

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1)陽性領域および PECAM1/ α -smooth muscle actin (α -SMA)共陽性領域の定量には、BZ-9000 を用いて拡大率 100 倍で撮影した画像を BZ analyzer を用いて連結したのち、ImageJ を使用して腫瘍の最大断面全体に対する PECAM1 陽性領域の割合、および腫瘍領域全体における PECAM1 陽性領域に対する PECAM1/ α -SMA 共陽性領域の割合を算出した。

Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE1)陽性リンパ管の定量には、DMI6000 B AFC を用いて 1 サンプルあたり拡大率 200 倍で画像を撮影し、それぞれの画像に含まれるリンパ管の個数をカウントし、サンプルごとに 10 視野の平均を算出した。内腔を持つリンパ管の頻度の定量には、同様に撮影した画像におけるリンパ管の個数および内腔を持つリンパ管の個数をカウントし、サンプルごとに全リンパ管の個数に対する内腔を持つリンパ管の個数の割合の平均を算出した。

表 1 使用した一次抗体のリスト

抗原	由来種	使用濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	メーカー
PECAM1	Rat	2.5	BD Pharmingen
α -SMA (Cy3 conjugated)	Mouse	7	Sigma-Aldrich
LYVE1	Rabbit	5	Abcam

ヒアルロナン染色

マイルドホルムで固定したのちパラフィン包埋したサンプルを 4 μm に薄切し、脱パラフィン後に PBS で洗浄し、風乾した。その後 Blocking One で 30 分間ブロッキングしたのち 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の biotinylated hyaluronan binding protein (biotin-HABP) (HOKUDO)を 4°C で一晩反応させた。翌日、洗浄後 5 $\mu\text{g/ml}$ の streptavidin Alexa 488 (Life Technologies)を室温で 1 時間反応させたのち、核を 1 $\mu\text{g/ml}$ の DAPI で染色して観察した。一部のサンプルについては、ブロッキングの直後に PBS (pH 5.5)で洗浄したのち、PBS (pH 5.5)で 400 U/ml に調製したウシ精巢由来ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich)を 37°C で 2 時間反応させた。観察には BZ-9000 を使用した。腫瘍におけるヒアルロナン蓄積量の定量には拡大率 100 倍で撮影した画像を BZ analyzer を用いて連結し、得られた画像の腫瘍最大断面全体の面積における Alexa 488 の蛍光輝度の平均を算出した。

FITC-dextran 分布評価

生理食塩水で 10 mg/ml に調製した fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (分子量 2 MDa、直径 50 nm 相当[3]) (Sigma-Aldrich)をマウスの尾静脈から 200 μ l 投与した。投与後 6 時間でマウスを犠牲死させて腫瘍組織を回収し、OCT compound に包埋し、-80°C で急速凍結した。これらのサンプルを凍結マイクロトームで 10 μ m に薄切した後、マイルドホルムで 5 分間固定し、核を 1 μ g/ml の DAPI で染色した。切片の観察には BZ-9000 を用いた。

FITC-dextran 分布の定量には、拡大率 100 倍で撮影した画像を BZ analyzer を用いて連結し、得られた画像の腫瘍全体の面積における FITC 蛍光輝度の平均を算出した。

ヒドロキシプロリン定量

サンプルの湿重量を測定したのち、バイオマッシャー (ニッピ)内で湿重量の 10 倍量の超純水を加えてホモジナイズした。その後、加えた超純水と等量の 12 規定塩酸 (和光純薬工業)を添加しポリプロピレン製スクリューキャップ付き 2.0 ml チューブ (アシスト)に移した。チューブをシリコンオイルバス内で 121°C に保ち、一晩加水分解を行った。加水分解後、Amicon Ultra (10 kDa)

(Millipore)を用いて残滓を除去した。そののち、ヒドロキシプロリンアッセイキット (BioVision)を用いて、プロトコルに従い組織に含まれるヒドロキシプロリン量を定量した。概略は以下のとおりである。まず 96-well plate (Nunc)にサンプルを 10 μ l ずつ添加し風乾させた。次に perchloric acid 溶液を添加して溶液を強酸条件にし、chloramine T 溶液を添加して室温で 5 分間静置しヒドロキシプロリンを酸化させた。ここに p-dimethylaminobenzaldehyde 溶液を添加し 60°C で 90 分間発色させ、プレートリーダー (Bio-Rad)で 570 nm の吸光度を測定した。

RNA 抽出および定量的 RT-PCR

腫瘍組織を摘出後トリミングして皮膚や皮下組織を除去したのち数個の薄片に切り分けて RNAlater (Qiagen)に浸した。RNA を抽出する際、まずこれらの組織を Medimachine (Syntec International)を使用して Isogen (Nippon Gene)液中で粉砕し、Isogen のプロトコルに従って RNA を単離した。次に Nucleospin (MACHEREY-NAGEL)を用いて、プロトコルに従い RNA のさらなる精製およびゲノム DNA の除去を行った。cDNA 合成は Primescript Reverse Transcriptase (Takara)を用いて行い、1 μ g の RNA を鋳型とした。

定量的 RT-PCR には Faststart Universal SYBR green master (Roche)および Step One Plus (Life Technologies)を用いた。使用したプライマーを表 2 に示した。

表 2 使用したプライマーのリスト

標的	Forward	Reverse
hGAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
hCOL1A1	AGCCAGCAGATCGAGAACAT	TCTTGTCCTTGGGGTTCTTG
mGapdh	TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT	TGCCGTTGAATTTGCCGT
mCol1a1	AACCCGAGGTATGCTTGATCT	CCAGTTCCTTCATTGCATTGC

統計解析

2 群間の比較においては Microsoft Excel を使用し、unpaired Student's t-test を用いて両側有意差検定を行った。p < 0.05 となる場合、統計的に有意であるとした。

結果

FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて線維化を亢進させる

私の所属する研究室におけるこれまでの研究から、BxPC-3 皮下移植モデルが線維化を伴うこと、およびモデルにおいては血管が間質領域に存在し腫瘍細胞巣の中にはほとんど存在しないことが知られており、難治性腫瘍の形態学的特徴を備えた腫瘍モデルとして適切である[20]。また、FGF-2 の発現が膵臓癌の臨床検体における線維化の強さと正の相関があること[21]、および FGF-2 はマウス皮下に線維化を誘導することが知られている[22]。そこで私は BxPC-3 皮下移植モデルをベースに、FGF-2 を添加することでより線維化の強い新規モデルを生み出そうと考えた。BxPC-3 細胞懸濁液に FGF-2 を添加してヌードマウス皮下に移植し、3 週間後に腫瘍組織を回収して HE 染色および AZAN 染色 (膠原線維染色)を行ったところ、FGF-2 添加群において無添加群と比較して線維化が亢進していたほか、腫瘍実質細胞巣の大きさが小さくなっていた (図 2 A)。腫瘍の最大断面全体に対する AZAN 陽性面積の割合を算出したところ、FGF-2 添加群において有意に増加していた (図 2 B)。これらのことから、FGF-2 の添加が BxPC-3 皮下移植モデルにおいても線維化を亢進させることが示された。

図 2

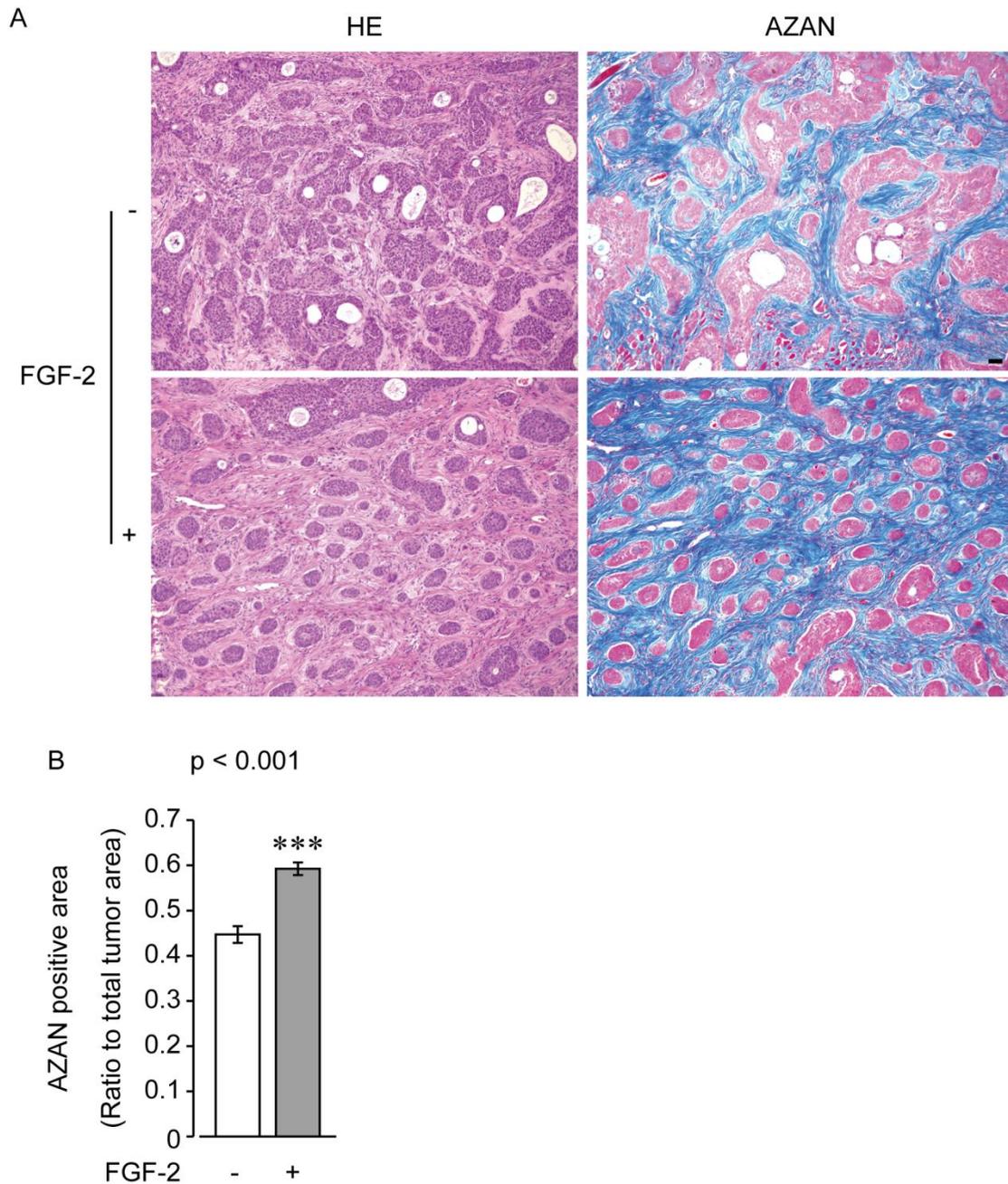


図 2 FGF-2 の添加は BxPC-3 皮下移植モデルにおける腫瘍間質の割合を増大させる

A FGF-2 添加群および無添加群の HE および AZAN 染色像。FGF-2 の添加は AZAN 陽性領域 (青色)の割合を増大させた。scale bar: 50 μ m

B 各群における腫瘍最大断面における AZAN 陽性間質面積の割合の定量。FGF-2 の添加は AZAN 陽性領域の割合を有意に増大させた。error bars: mean \pm SE、各 n =11、***: $p < 0.001$

FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて FITC-dextran の腫瘍内分布を阻害する

線維化の亢進が高分子薬剤の分布に影響を与えるか調べるため、高分子薬剤の動態を模したトレーサーとして FITC-dextran を静脈内投与し、FITC-dextran の腫瘍内における分布を観察した。FITC-dextran 投与後 6 時間で腫瘍組織を回収し切片を観察したところ、FGF-2 添加群では無添加群に比べて FITC-dextran の分布が減少している様子が観察された (図 3 A)。切片における腫瘍最大断面の単位面積あたりの FITC-dextran の平均輝度を定量したところ、FGF-2 添加群において無添加群と比較して有意に低かった (図 3 B)。このことから、FGF-2 の添加が高分子薬剤トレーサーの腫瘍内分布を阻害することが示された。

FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいてコラーゲンの発現を上昇させる

コラーゲンは腫瘍間質を構成する代表的な ECM のひとつであり、高分子薬剤および高分子薬剤を模したトレーサーの腫瘍内分布を阻害することが知られている[13-16]。そこで FGF-2 添加群における FITC-dextran の分布減少にコラーゲンの増加が関与しているかどうか調べるため、組織に含まれるヒドロキシプロリン量を指標としてコラーゲン含有量を測定した。その結果、FGF-2 添加群において無添加群と比べてヒドロキシプロリン含有量が有意に増大していた。

図 4

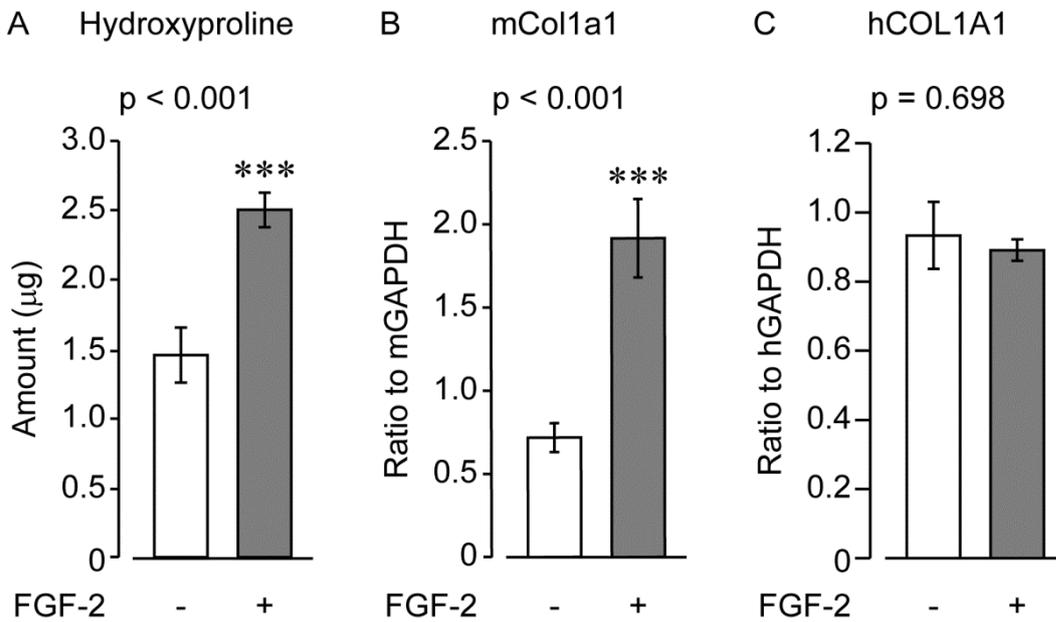


図 4 FGF-2 の添加は腫瘍組織のコラーゲン含有量を増加させる

A 腫瘍組織のヒドロキシプロリン含有量の定量。FGF-2 添加群において有意に高かった。error bars: mean ± SE、各 n = 6、***: p < 0.001

B マウス I 型コラーゲン mRNA の定量。FGF-2 添加群において有意に発現量が上昇していた。error bars: mean ± SE、それぞれ n = 11 および 9、***: p < 0.001

C ヒト I 型コラーゲン mRNA の定量。マウス I 型コラーゲンとは異なり有意な発現上昇はみられなかった。error bars: mean ± SE、各 n = 3

(図 4 A)。また、定量的 RT-PCR の結果から、マウス由来 I 型コラーゲンの発現量が FGF-2 添加群において有意に増大していた (図 4 B)。一方、ヒト由来 I 型コラーゲンの発現は、両群の間に有意な差はなかった (図 4 C)。これらの結果から、FGF-2 の添加が腫瘍組織の間質におけるコラーゲンの発現を増加させることが示された。

FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいてヒアルロナンの蓄積に影響を与えない

ヒアルロナンの除去は腫瘍組織内の薬剤分布を促進することが知られている[11,12]。そこで FGF-2 の添加が組織内ヒアルロナンの量に影響を与えるかどうか検討した。ヒアルロナンは腫瘍間質に加えて腫瘍実質においても蓄積がみられた (図 5 A)。腫瘍単位面積当たりの蛍光輝度を定量したところ、FGF-2 無添加群および添加群の間に有意な差は見られなかった (図 5 B)。このことから、FGF-2 の添加はヒアルロナンの腫瘍内蓄積に大きな影響を及ぼさないことが示された。

FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて腫瘍血管の血管密度および壁細胞被覆率に影響を与えない

私の所属する研究室から、BxPC-3 皮下移植モデルにおいて腫瘍血管壁

細胞の被覆が高分子ミセルの腫瘍内分布を阻害していることが報告されている [20]。そこで FGF-2 添加群において血管内皮マーカーである PECAM1 および血管壁細胞マーカーである α -SMA を染色した (図 6 A)。腫瘍組織における血管密度の指標として腫瘍の最大断面全体に対する PECAM1 陽性領域の割合を、および血管壁細胞の被覆率の指標として PECAM1/ α -SMA 共陽性領域の PECAM1 陽性領域に対する割合を算出したところ、無添加群と比較して有意な差はなかった (図 6 B)。このことから、腫瘍血管の血管密度および壁細胞被覆率は FGF-2 の添加による FITC-dextran の腫瘍内分布の減少に対して大きな影響を与えていないことが示された。

FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいて腫瘍リンパ管新生を促進する

FGF-2 はリンパ管新生を亢進することが知られている [23]。リンパ管は組織間質液を組織外に排出する [6] ため、腫瘍組織における薬剤分布に影響を与える可能性がある。そこで、FGF-2 の添加が BxPC-3 皮下移植モデルにおいてリンパ管新生を促進するか検討するため、腫瘍組織をリンパ管内皮マーカーである LYVE1 で染色した (図 7 A)。FGF-2 の添加は腫瘍内におけるリンパ管密度を有意に増加させた (図 7 B)。一方、FGF-2 添加群においては、内腔が明らかに存在するリンパ管の割合が有意に減少していた (図 7 C)。これらのことから、FGF-2

の添加は BxPC-3 皮下移植モデルにおいてリンパ管新生を亢進するが、内腔が観察されないリンパ管の割合が増加していることが示された。

図 7

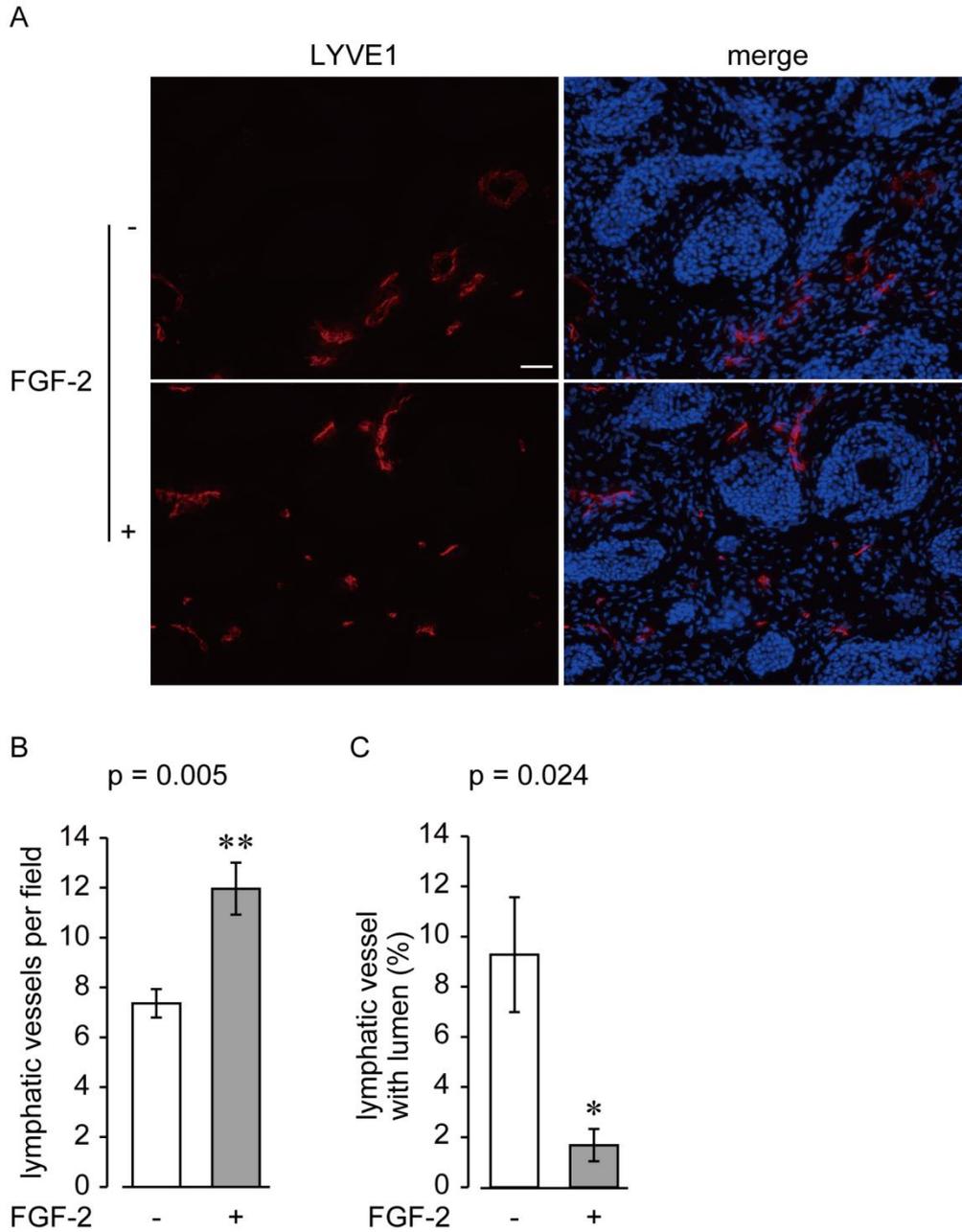


図 7 FGF-2 は BxPC-3 皮下移植モデルにおいてリンパ管新生を促進する

A LYVE1 の染色像。FGF-2 添加群では無添加群に比べてリンパ管の数は多かったが、内腔が観察されるリンパ管の数は少なかった。青は核 (DAPI)。scale bar: 50 μ m

B LYVE1 陽性リンパ管の 1 視野あたりの個数。FGF-2 添加群で有意に増加した。error bars: mean \pm SE、各 n = 5、** : p < 0.01

C 内腔が観察されるリンパ管個数の全リンパ管個数に対する割合。FGF-2 添加群において有意に減少した。error bars: mean \pm SE、各 n = 5、* : p < 0.05

考察

本研究において、私は BxPC-3 皮下移植モデルにおける FGF-2 の添加が線維化を亢進させることを見出し、線維化の亢進が高分子薬剤の動態を模したトレーサーである FITC-dextran の腫瘍内蓄積を阻害することを示した。また、FGF-2 の添加がヒアルロنانの腫瘍内蓄積や血管壁細胞の被覆率には影響を与えなかった一方で、腫瘍組織におけるコラーゲンの発現量を有意に増加させたことから、BxPC-3 皮下移植モデルに対する FGF-2 の添加は、コラーゲンの発現上昇を介して FITC-dextran の蓄積を阻害していることが示唆された。

腫瘍組織におけるコラーゲン発現に対する腫瘍実質 (BxPC-3) および間質 (マウス由来細胞) の寄与について

本研究においてはヒドロキシプロリン量を指標とした腫瘍組織のコラーゲン含有量の測定に加え、定量的 RT-PCR で FGF-2 の BxPC-3 およびマウス由来細胞のコラーゲン産生に対する影響を検討した。その結果、FGF-2 はマウス I 型コラーゲン mRNA の発現を有意に上昇させたが、ヒト I 型コラーゲン mRNA の発現には影響を及ぼさなかった。このことから、FGF-2 の添加により増生したコラーゲンは主としてマウス由来であることが示唆された。また、腫瘍組織に

におけるコラーゲンの蓄積に対する BxPC-3 およびマウス由来細胞の寄与の内訳を正確に比較することは困難であるが、目安のひとつとして定量的 RT-PCR においてヒトおよびマウスの I 型コラーゲンの Ct 値を比較すると、マウスの方が相対的に Ct 値が低かった (未公表データ)。このことから、BxPC-3 皮下移植モデルにおける線維化の亢進には、マウス I 型コラーゲンの寄与がヒト I 型コラーゲンと比較して相対的に高いことが考えられた。

本研究における間質圧の影響について

間質圧は薬剤の腫瘍内分布を阻害する一因であり、先行研究において、腫瘍においてはしばしば間質圧が増大していることが知られている[1,24,25]。また、担癌マウスに対するコラゲナーゼ投与が腫瘍間質圧を下げ、モノクローナル抗体やカチオニックリポソームの腫瘍内分布を改善することが報告されている[13,14]。このため、線維化の亢進は間質圧を増加させる可能性がある。一方、間質圧を考慮する必要のない *in vitro* において腫瘍細胞のスフェロイドに対するコラゲナーゼ処置がポリスチレンナノ粒子のスフェロイドへの浸透を促進することが報告されている[16]ことから、コラーゲンが高分子薬剤の拡散を物理的に阻害することも考えられる。従って、本研究において線維化の亢進が FITC-dextran の腫瘍内分布を阻害したのは、コラーゲン線維の増加による物理的

な障壁の増大に加えて間質圧の上昇も影響している可能性も排除できない。

リンパ管新生の FITC-dextran 腫瘍内分布に対する影響について

FGF-2 の添加は、BxPC-3 皮下移植モデルに対する線維化の亢進に加えて腫瘍内におけるリンパ管新生を促進した。リンパ管は組織間質液を排出する[6]ため、本研究において FITC-dextran の腫瘍内分布が減少したのは、先述のように FGF-2 の添加により腫瘍間質におけるコラーゲンの発現が上昇したことに加え、リンパ管の増加による FITC-dextran の腫瘍組織外への排出が高まったことも原因の一つとして考えられる。一方、固形腫瘍におけるリンパ管は機能不全に陥っているという報告がある[5,18]。また、FGF-2 添加群では無添加群と比較して明らかな内腔が観察されるリンパ管の割合が減少しており、腫瘍リンパ管が圧迫されて内腔がつぶれていると考えられる染色像が頻度高く観察された。このため、リンパ管数の増加が腫瘍組織からの FITC-dextran の排出増加に必ずしも貢献しているとは限らない。本モデルにおけるリンパ管新生の FITC-dextran 分布に対する影響を詳細に検討するならば、ferritin microlymphangiography[26]などの手法を用いてリンパ管の機能を直接評価する必要があると考える。

FGF-2 の作用メカニズムについて

FGF-2はin vivoマトリゲルプラグアッセイにおいて免疫細胞の浸潤を促進すること、およびC57BL/6新生マウス皮下においてmonocyte/macrophage chemoattractant protein-1の発現上昇およびマクロファージを始めとした免疫細胞の浸潤増加を介して線維化を亢進させることが報告されている[22,27,28]。また、マクロファージの浸潤は心臓や腎臓をはじめ複数の臓器の線維化を亢進させることが知られている[29]。このため、本モデルにおいてもFGF-2が類似のメカニズムを介して線維化を亢進させている可能性がある。

FGF-2以外の線維化促進因子の影響について

ヒト膵臓癌の臨床検体においては、FGF-2に加えてtransforming growth factor (TGF)- β およびconnective tissue growth factor (CTGF)がしばしば高発現していること、およびそれらの発現が腫瘍組織のコラーゲンの発現と正の相関があることが知られている[30,31]。実験的には、TGF- β をヒト膵臓癌由来細胞株PANC-1に強制発現させヌードマウスに同所移植すると線維化が亢進すること[32]、およびTGF- β やCTGFはFGF-2と協調してマウス皮下において線維化を増悪すること[22,33]が報告されている。これらのことから、本研究においてもこれらの因子がFGF-2の線維化亢進作用を助長している可能性がある。

今後の展開について

本研究をさらに発展させるにあたり、課題として考えられることが3つある。1つ目は FITC-dextran の腫瘍内分布の経時的な変化の検討である。本研究においては、先行研究[34]に従い FITC-dextran の腫瘍内分布を投与後6時間の1点のみにおいて評価した。今後、本モデルにおける高分子薬剤の動態をより詳細に解析するためには、FITC-dextran の腫瘍内分布を経時的に評価することが必要であると考えられる。

2つ目は FGF-2 の線維化に対する作用の詳細な検討である。私は FGF-2 が BxPC-3 皮下移植モデルにおいて腫瘍組織の線維化を亢進させることを見出したが、逆に FGF シグナルの阻害が線維化を抑制するかどうかについての検討を行っていない。BxPC-3 は *in vitro* においては FGF-2 を mRNA レベルにおいてほとんど発現していないという報告がある[35]。従って、今後 FGF シグナル阻害の線維化に対する影響をより適切に評価するには、BxPC-3 以外で FGF-2 を高発現する腫瘍細胞を用いて検討を行わなければならない。そのような細胞をヌードマウスの皮下に移植し、shRNA による FGF-2 のノックダウンなどで FGF シグナルを阻害した時に線維化が減弱するか検討する必要があると考えられる。

3つ目は他の動物モデルを用いた検討である。遺伝子改変脾臓癌自然発

症マウスモデルはヒト膵臓癌の発癌過程をよく模倣することが知られている[17]。特に、膵臓上皮特異的に活性型の *Kras* を発現させ、かつ *TGF-β* の II 型受容体をノックダウンした *Ptf1a^{cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{lox/lox}* マウスモデルは、生存期間中央値が約 59 日と病勢の進行が速く、かつ病変の線維化も顕著であることが報告されており[36]、薬剤分布の評価に適すると考えられる。上記のようなモデルを用いて、高分子薬剤の腫瘍内分布に対する線維化の影響や高分子薬剤の治療効果、さらには線維化における *FGF-2* の役割をより詳細に検討することは、本研究で得られた知見をさらに広げていくうえで重要である。

本研究の有用性

in vivo の皮下腫瘍移植モデルにおいて線維化を亢進させる方法はこれまでに報告がなく、しかも *FGF-2* の添加という簡便な方法で可能であることは新規性が高い。私が確立した新規モデルは、間質の多い腫瘍における高分子薬剤の分布予測および腫瘍間質を標的とした薬剤の治療実験において有用となりうる。

第2章 正常脳組織および脳腫瘍における PDPN の血管透過性に対する作用

序文

星細胞 (アストロサイト astrocyte)系腫瘍について

星細胞 (アストロサイト; astrocyte)系腫瘍は脳実質内腫瘍の中で最も発生頻度が高く、その大半が浸潤性星細胞腫 (infiltrative astrocytoma)である。浸潤性星細胞腫は、びまん性星細胞腫 (diffuse astrocytoma; WHO grade II)、退形成性星細胞腫 (anaplastic astrocytoma; WHO grade III)、大脳膠腫症 (gliomatosis cerebri; 通常は WHO grade III)および膠芽腫 (glioblastoma; WHO grade IV)の4種類に分類され、全体の約8割を膠芽腫が占める。膠芽腫に対しては外科療法、放射線療法および化学療法が集学的に行われているが、依然として予後が悪く、生存期間中央値は約15か月である[37-39]。膠芽腫の化学療法には分子量が小さく中枢神経への分布が良好なテモゾロミド (TMZ)が標準治療薬として用いられる。TMZはDNAアルキル化剤であり、DNA中のグアニン残基O⁶部位にメチル基を付加することでDNAの誤複製を引き起こし、腫瘍細胞に細胞死を誘導する[2]。しかしながら、一部の膠芽腫はDNA修復酵素の一種であるO⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)を発現しており、MGMTの発現する膠芽腫に対してはTMZの治療効果が低いことが知られている[2,37]。しかし、TMZ以外の抗癌剤は中枢神経への移行が悪いため、現状では膠芽腫に対し

て TMZ の代替となりうる抗癌剤がない[2]。このため、膠芽腫に対する薬剤送達を高めることは、膠芽腫の化学療法を改善するうえで重要である。

BBB および BTB について

中枢神経における血管の透過性が低いことは、血管内投与した色素の分布を検討した研究により 19 世紀後半から知られていた。このため、中枢神経と循環の間に物質の移動を妨げる障壁が存在することが示唆され、**blood-brain barrier (BBB)**と呼ばれていたが、その後の研究からこの障壁の本質は中枢神経における血管の構造及び機能の特殊性によることが解明されてきた[40]。BBB は血管内皮細胞、血管壁細胞およびアストロサイトの **end feet** から構成される。BBB を構成する血管は以下のような特性を持つため、中枢神経組織における血管の透過性は非常に低いことが知られている。まず、血管内皮細胞間の **tight junction** が末梢組織におけるものよりも発達しているため極性分子の **paracellular pathway** による中枢神経への拡散がほとんど起こらない。次に、脳血管内皮細胞は無窓性でありピノサイトーシス活性も低いことから **transcellular pathway** による物質の移行も限られる。さらに内皮細胞の細胞膜表面が負に帯電しており、負に帯電した物質を遠ざける、異物を排出および分解するための薬剤トランスポーターおよび薬物代謝酵素のエネルギーを生み出すミトコンドリアを細胞質

に多く含むことが報告されており、物質を中枢神経組織に近づけない、もしくは中枢神経組織から積極的に排除する機能が備わっている[40]。

一方、星細胞系腫瘍をはじめとした脳腫瘍においても腫瘍と血液の間に障壁が存在していると考えられており、**blood-tumor barrier (BTB)**と呼ばれている。**BTB** は脳腫瘍に対する薬剤の送達を低下させて治療を妨げていると言われている[41,42]。**BTB** の存在を具体的に表す例として、膠芽腫の **magnetic resonance imaging (MRI)**画像がある。膠芽腫の造影 **MRI** では **T1** 強調画像において、典型的には不規則なリング状の増強効果を示す。リングの内側の低信号領域には壊死部位が含まれると考えられてきたが、血管の血流を示す **flow void** (**T1** 強調画像でも **T2** 強調画像でもシグナルが検出されない領域)も観察される[38]ため、リング内側の腫瘍がすべて壊死していると考えることには疑問が残り、むしろリングの内側には造影剤をはじめとした物質の送達が著しく低下している領域が存在すると考えられる。また、このような障壁を乗り越えるため、脳腫瘍に対する効果的な薬剤送達を目指した研究が盛んに行われている[43]。ここまでのことを総合して、私は **BBB** と **BTB** における血管の安定化に共通したメカニズムがあるのではないかと想定した。

血小板における ITAM シグナリングによる血管安定性の維持について

血小板は(a)血管内皮細胞間の間隙の物理的封鎖、(b)血管内皮細胞の増殖促進、(c)血管内皮細胞の微小構造の維持および(d)液性因子を介しての内皮バリア機能の維持という少なくとも 4 つのメカニズムを介して正常血管の安定化に寄与していることが知られてきた[44]。また、炎症状態下で白血球が血管外に遊出するような血管において、血小板は血管の安定化を促進することが知られている[45]。さらに血小板は腫瘍血管においても血管の安定化を促進しており[46]、血小板の中和は腫瘍血管の透過性を高め抗癌剤の腫瘍内分布を改善すること[47]や、血小板除去処置によりに血管から腫瘍組織への白血球の移行に伴って出血が促進されること[48]が示されてきた。近年になって、これらの血小板の血管安定化促進作用は immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)シグナルの活性化を介していることが明らかになった[49,50]。ITAM シグナルは thrombin、adenosine diphosphate (ADP)およびトロンボキサン A2 (TxA2)といった G protein-coupled receptor (GPCR)を介する経路とは異なり、血小板膜表面の Glycoprotein VI (GPVI)および C-type lectin 2 (CLEC2)がそれぞれのリガンドであるコラーゲンまたは podoplanin (PDPN)と相互作用することで血小板を活性化させるシグナル経路である (図 8)[50]。

一方、膠芽腫をはじめとした浸潤性星細胞腫において、免疫細胞の浸

図 8

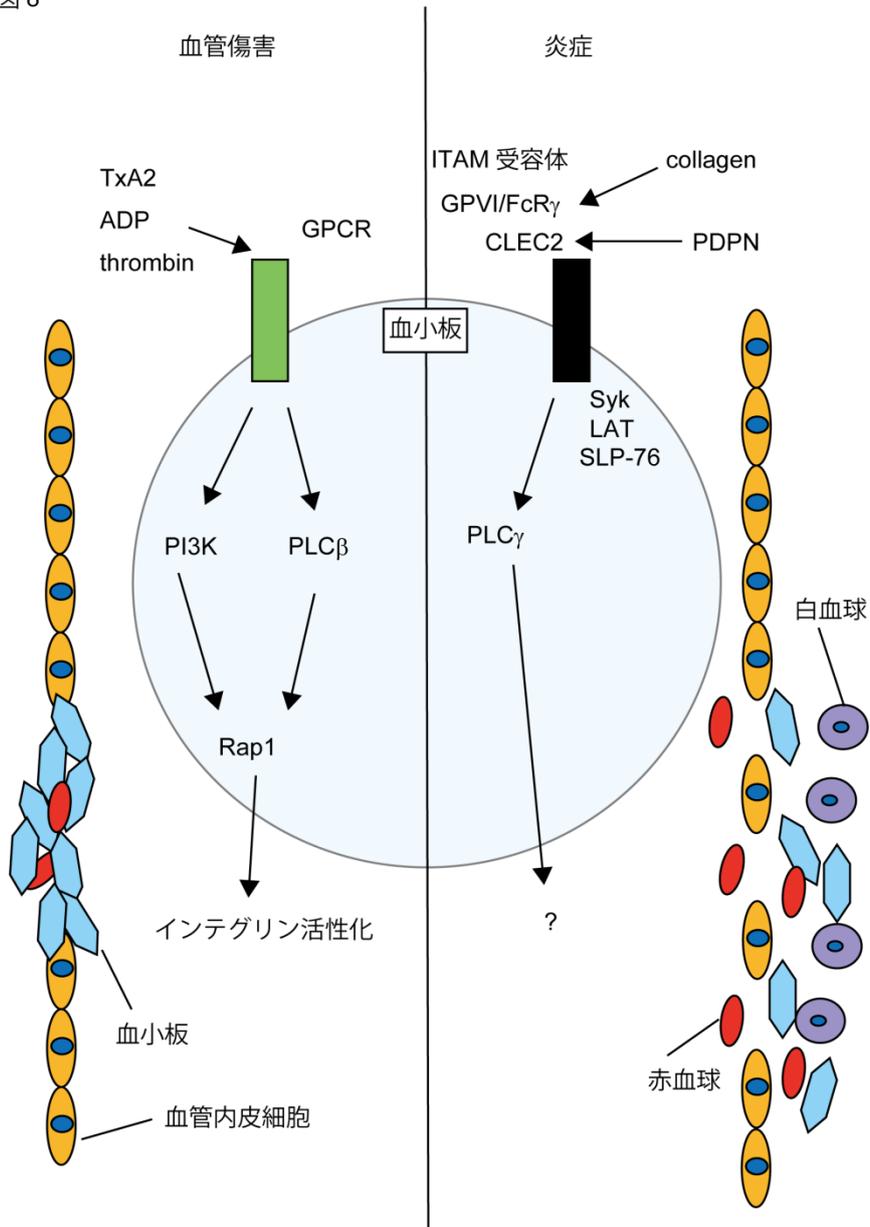


図 8 血小板依存性の止血機構の模式図

血管が傷害を受けたときには、thrombin、thromboxane A2 (TxA2)およびADPが血小板膜表面にあるそれぞれのGPCRを介してシグナルを伝達し、インテグリンの活性化を介して血小板を活性化させ凝集を促進する。このとき、ITAMシグナリングの血小板凝集に対する寄与は小さい。一方、炎症における止血はITAMシグナリングに大きく依存する。ITAMシグナリングは血小板膜表面のGPVI/FcR γ 複合体およびCLEC2にそれぞれのリガンドであるコラーゲンまたはPDPNが結合すると、PLC γ を介して血小板凝集を促進する。PLC γ の下流は不明である。Boulaftali et al., *Circ Res* 2014 [50]の図を改変して作成した。

潤がみられること[51-53]、および浸潤性星細胞腫のグレードと相関して PDPN 陽性症例の頻度が増えることが報告されている[54]。これらのことから、私は正常脳組織の BBB と膠芽腫の BTB に共通して、血小板が ITAM シグナルを介して血管安定性を維持している可能性を考えた。

PDPN について

前述の通り PDPN は ITAM シグナルにおけるリガンドのひとつである。PDPN は 36-43 kDa のムチン型 1 回膜貫通タンパクであり、成体においてはリンパ管内皮細胞、リンパ節 T 細胞領域の fibroblastic reticular cell、肺の I 型肺胞上皮、腎臓のポドサイト、中枢神経の上皮細胞などいくつかの正常臓器に発現している[55]。近年ではアストロサイトに発現しているという免疫染色の報告もある[56]。

PDPN は膠芽腫をはじめ肺および頭頸部の扁平上皮癌、悪性中皮腫といった悪性腫瘍においてしばしば高発現している[57-59]。PDPN を発現する腫瘍細胞が血液循環に侵入すると、ITAM シグナルを介した血小板凝集促進作用により血小板が腫瘍細胞表面に凝集する。これは腫瘍細胞が免疫機構による監視から逃れて血行性転移を引き起す原因の一つと考えられており、mPDPN に対する中和抗体 (8F11)は血行性転移を抑制することが実験的に知られている[60,61]。

一方、正常組織における PDPN の生理的な機能はこれまで不明であったが、近年になって炎症状態にあるリンパ節の血管の安定性を向上させていることが報告された[62]。この報告の中で、リンパ節の high endothelial venule における PDPN の機能抑制あるいは血小板における CLEC2 の機能抑制が、白血球の high endothelial venule からリンパ節実質に遊出する際の血小板凝集を抑制し出血を引き起こすことが示され、PDPN の ITAM リガンドとしての重要性が明らかになった[62]。

BMP シグナルと PDPN の発現を制御する因子について

Bone morphogenetic protein (BMP)は transforming growth factor (TGF)- β ファミリーに属するサイトカインの一種であり、細胞膜表面上の I 型受容体と II 型受容体に結合する。BMP がこれらの受容体に結合すると、各受容体 2 つずつからなるヘテロ 4 量体を形成し、II 型受容体が I 型受容体をリン酸化 (活性化)する。リン酸化された I 型受容体は Smad1、Smad5 および Smad8 をリン酸化 (活性化)することで下流にシグナルを伝達し、inhibitor of DNA binding 1 (ID1)をはじめとした標的遺伝子の転写を制御する[63,64]。

前項で述べたように、PDPN は一部の正常組織および腫瘍に発現している。しかし、PDPN の発現を制御する因子については情報が少ない。PDPN は炎

症部位において発現が亢進することと関連して、炎症性サイトカインである interferon (IFN)- γ 、interleukin (IL)-6、IL-22、TGF- β 、 tumor necrosis factor (TNF)- α および IL-1 β が PDPN の発現を上昇させることが知られている[55]。また、転写因子 activator protein (AP)-1 が PDPN の発現を上昇させることが知られており[55]、膠芽腫細胞においても PI3K-AKT-AP1 シグナル経路が PDPN の発現を正に制御している[65]。一方、PDPN の発現を抑制する因子については、リンパ管内皮細胞において BMP9 がリンパ管のマスター転写因子 prospero homeobox 1 (PROX1) の発現抑制を介して PDPN の発現を減少させるという報告がある[66]ものの、リンパ管内皮細胞以外に対する BMP の作用については調べられていない。近年、私の所属する研究室では膠芽腫由来細胞を用いて RNA シーケンスによる網羅的な mRNA 発現解析を行い、BMP4 刺激が膠芽腫由来細胞における PDPN の発現を顕著に抑制することを見出していた (未公表データ)。このことから、BMP が PDPN の発現を制御している可能性があるのではないかと考えられた。

上記すべてを考え合わせ、PDPN が炎症状態にある正常脳組織および膠芽腫において共通して血管の安定化を促進しており、さらに BMP シグナルの活性が膠芽腫細胞やアストロサイトにおいて PDPN 発現を制御しているという仮説をたてて以下の検討を行った。

方法

使用細胞

膠芽腫の異なる臨床検体から得られた5種類の脳腫瘍細胞TGSシリーズ (TGS-01、TGS-02、TGS-03、TGS-04 および TGS-05)は藤堂具紀博士および稲生靖博士 (いずれも東京大学医科学研究所)より供与を受けた。TGS-01 にレンチウイルスを用いて firefly luciferase 遺伝子 (pGL4-luc2)を安定的に導入した株である TGS-01-luc は古室暁義博士 (東京大学大学院医学系研究科分子病理学)より供与を受けた。TGS シリーズおよび TGS-01-luc は B27 (Gibco)、2 mM L-glutamine (Gibco)、15 µg/ml Insulin (Gibco)、0.0063% D-glucose (Sigma-Aldrich)、20 ng/ml FGF-2 および 20 ng/ml EGF (いずれも Peprotec)を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (Gibco)を用い sphere culture で維持した。ヒト膠芽腫由来細胞株 U87MG (ATCC)は、10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-glutamine を添加した DMEM (Gibco)を用いて維持された。ICR マウス大脳由来 primary astrocyte (mAC) (ScienCell)は、2 µg/cm² poly-L-lysine (ScienCell)でコートされた培養容器およびメーカーの推奨培地 Astrocyte Medium-animal (ScienCell)を用いて維持され、継代数3から6の細胞を実験に使用した。すべての細胞は 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養された

増殖因子と阻害剤などの薬剤およびそれらの細胞に対する処置

BMP4 (R&D Systems)は 1 mg/mL の bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)を含む 4 mM HCl に溶解して使用された。BMP の I 型受容体阻害剤である LDN193189 (LDN) (Stemgent)は dimethyl sulfoxide (DMSO) (ナカライテスク)に溶解して使用された。

TGS-01、TGS-04 は 1.5×10^4 /cm² で、TGS-02、TGS-03 は 3×10^4 /cm² の密度で播種され、播種と同時に BMP4 を処置したのち実験に使用された。U87MG は 2×10^4 /cm² で播種され、翌日に 1% FBS を含む培地に交換したのち 18 時間後に BMP4 を処置し、2 日おきに培地交換を行いながら維持され、実験に使用された。mAC は密度 5×10^3 /cm² で播種され、播種翌日に培地交換と同時に BMP4 または LDN を添加したのち実験に使用された。

動物

5-6 週齢メスの BALB/c nu/nu マウスは日本クレア株式会社から、6 週齢オスの C57B6/J マウスは三協ラボサービス株式会社から購入して実験に用いた。

動物の取り扱いにあたっては東京大学動物実験実施規則に従った。

免疫組織染色

OCT compound に包埋し凍結したサンプルを 10 μm に薄切し、0.1% Triton-X 100 で5分間脱膜化した。スライドを洗浄したのち乾燥させ、Blocking One (ナカライテスク)でブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体を室温で2時間 (mPDPN 抗体)または 4°C で一晩 (mPDPN 抗体以外)反応させた。PECAM1 を染色する際には、脱膜化し洗浄した後に HistoVT One (ナカライテスク)を用いて 70°C、20 分間抗原賦活化を行った。翌日、洗浄後対応する二次抗体を室温で 2-3 時間反応させた。二次抗体は anti-rabbit Alexa 488、594、647、anti-rat Alexa 488、594、anti-hamster Alexa 488、594 (いずれも goat 由来) (Life Technologies)、anti-sheep Alexa 594 (donkey 由来) (Life Technologies)の中から適切な組み合わせで使用された。核を 2 μM の TO-PRO3 (Life Technologies)で染色し、mounting medium (DAKO)を用いて封入した。使用した一次抗体の一覧を表 3 にまとめている。

表 3 使用した一次抗体リスト

抗原	由来種	使用濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	メーカー
PECAM1	Rabbit	2	Abcam
Fibrinogen	Sheep	50	Serotec
hPDPN (NZ-1.3)	Rat	10	eBioscience

mPDPN (RTD4E10)	Hamster	1	Abcam
GFAP	Rabbit	原液 (メーカー推奨)	ニチレイバイオサイエンス
α -SMA (Cy3 conjugated)	Mouse	7	Sigma-Aldrich
pSmad1/5	Rabbit	1	Life Technologies
CD45	Rat	0.625	BD Biosciences

フローサイトメトリーによる PDPN 発現解析

細胞懸濁液に一次抗体 (NZ-1.3 または RTD4E10)を室温で 30 分間反応させ、洗浄したのち二次抗体 (anti-rat Alexa 488 または anti-hamster Alexa 488)を室温で 30 分間反応させた。洗浄後 40 μ m のセルストレイナー (BD Falcon)に細胞液を通し、フローサイトメーターLSRII (BD)を用いて細胞集団の解析を行った。使用した一次抗体および二次抗体の濃度は免疫組織染色に用いたものと同じである。得られたデータの解析には FlowJo (FlowJo LLC)を使用した。

一過性前脳（全脳）虚血モデル

免疫正常マウス脳実質に炎症細胞を誘導するモデルとして、脳虚血モデルを採用した。脳虚血モデルの作成は既報[67]を参考に、下記の通りに行った。まず、C57BL/6J マウスをイソフルラン吸入麻酔下でヒーターを用いて体温を維

持した。この状態でマウスの両側総頸動脈を露出し、ヘモクリップ (夏目製作所) を 2 重にかけて阻血した。阻血中はイソフルランの吸入を停止した。20 分間の阻血の後にクリップを外して再灌流し、皮膚を縫合した。虚血部位への炎症細胞浸潤が高まる阻血後 2 日目に抗 mPDPN 中和抗体 8F11 (rat IgG2A; がん研究所 藤田直也博士より供与) または血小板除去作用をもつことが確認されている抗 glycoprotein Ib α (GPIb α) 中和抗体 (rat polyclonal IgG; Emfret)、あるいはそれぞれに対するコントロール IgG (rat IgG) を PBS で調製し、1 匹あたり 100 μ g を尾静脈投与した。抗体投与後 24 時間後に犠牲死させて脳を摘出し、マイルドホルムに浸して 4°C で一晩固定したのちスクロース置換し、OCT compound (サクラファインテック) に包埋し -80°C で急速凍結した。

fibrinogen の漏出頻度を定量するためには、脳の前額断面の切片を作成し、fibrinogen および PECAM1 を染色したのち LSM510 (Carl Zeiss) を用いて観察した。切片上でおおむね 20 μ m 以上の径を持つ全ての血管を拡大率 400 倍で撮影し、fibrinogen の漏出している血管数の全血管数に対する割合を算出し漏出頻度とした。カウントされた血管は 1 個体あたり 20 個から 61 個であった。

脳腫瘍細胞頭蓋内移植

TGS-01-luc を DMEM/F12 に懸濁して 1×10^7 /ml の濃度に調製し、脳定位

固定装置 (ナリシゲ)および容量 10 μ l の固定針型ハミルトンシリンジ (ハミルトン)を用いてイソフルラン (アボット)麻酔下にあるヌードマウスの右大脳半球 (冠状縫合の 1 mm 前方かつ前頭間縫合の 2 mm 右方、脳表から 3 mm の深さ)に 5 μ l を移植した。移植後は週 1 回、in vivo imaging を行い腫瘍の経時変化を観察した。in vivo imaging の際には Hank's balanced salt solution (Gibco)に溶解したトリプロモエタノール (Sigma-Aldrich)をマウスに 32.2 μ g/g の用量で腹腔内投与して麻酔を行った後、PBS で 12.5 mg/ml に調製した VivoGlo Luciferin (Promega)を 200 μ l 腹腔内投与し、LB983 NightOwl (Berthold Technologies)を用いて頭蓋内に移植された腫瘍の発光を測定した。マウスは移植 3 週目から 4 週目に実験に用いた。

RNA 抽出および定量的 RT-PCR

細胞からの RNA を抽出には Nucleospin (MACHEREY-NAGEL)を用い、プロトコルに従って RNA の単離およびゲノム DNA の除去を行った。cDNA 合成は Primescript Reverse Transcriptase (Takara)を用いて行い、1 μ g の RNA を鋳型とした。定量的 RT-PCR には Faststart Universal SYBR green master および LightCycler 480 (いずれも Roche)を用いた。使用したプライマーを表 4 に示した。

表 4 使用したプライマーのリスト

標的	Forward	Reverse
hGAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

hID1	ACTGCGCCCTTAACTGCAT	TGGAATCCCACCCCCTAAA
hPDPN	CAACTCAACGGGAACGATGTG	ACGCGCTTCCCAAAACG
mGapdh	TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT	TGCCGTTGAATTTGCCGT
mId1	AGGTGAACGTCCTGCTCTACGA	CAGGATCTCCACCTTGCTCACT
mPdpn	GCAACCTCAGACCATGATCACA	GCGTTTCATCCCCTGCATTA

統計解析

2群間の比較には Microsoft Excel を使用し、有意差検定には unpaired Student's t-test を使用した。3群間の比較には GraphPad Prism (GraphPad Software) を使用し、有意差検定には Turkey's test を用いた。p < 0.05 となる場合、統計的に有意であるとした。

結果

PDPN はマウス正常脳組織において主に血管周囲のアストロサイトに強く発現している

近年、マウス正常脳において mPDPN がアストロサイトに発現していることが報告された[56]。そこで、アストロサイトの mPDPN が血管透過性を制御している可能性があるかどうか検討するため、mPDPN の発現および血管との位置関係を知るべく免疫染色を行った。その結果、mPDPN は主に血管周囲に発現がみられ、血管内皮細胞および壁細胞を取り囲むように発現していた (図 9 A および B)。また、mPDPN は血管周囲においてアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) と共染色されており、アストロサイトの end feet と共局在している様子が観察された (図 9 C)。さらに、*in vitro* における mAC を用いたフローサイトメトリーによる解析により、mAC も mPDPN を発現していることが示された (図 9 D)。これらの結果から、mPDPN は血管周囲のアストロサイトに確かに発現していることが示された。

一過性前脳 (全脳) 虚血モデルに対する PDPN 中和抗体の投与は血管の透過性を高める

脳虚血再灌流は急性炎症を誘導し、血管から虚血部位への白血球の遊出

図 9

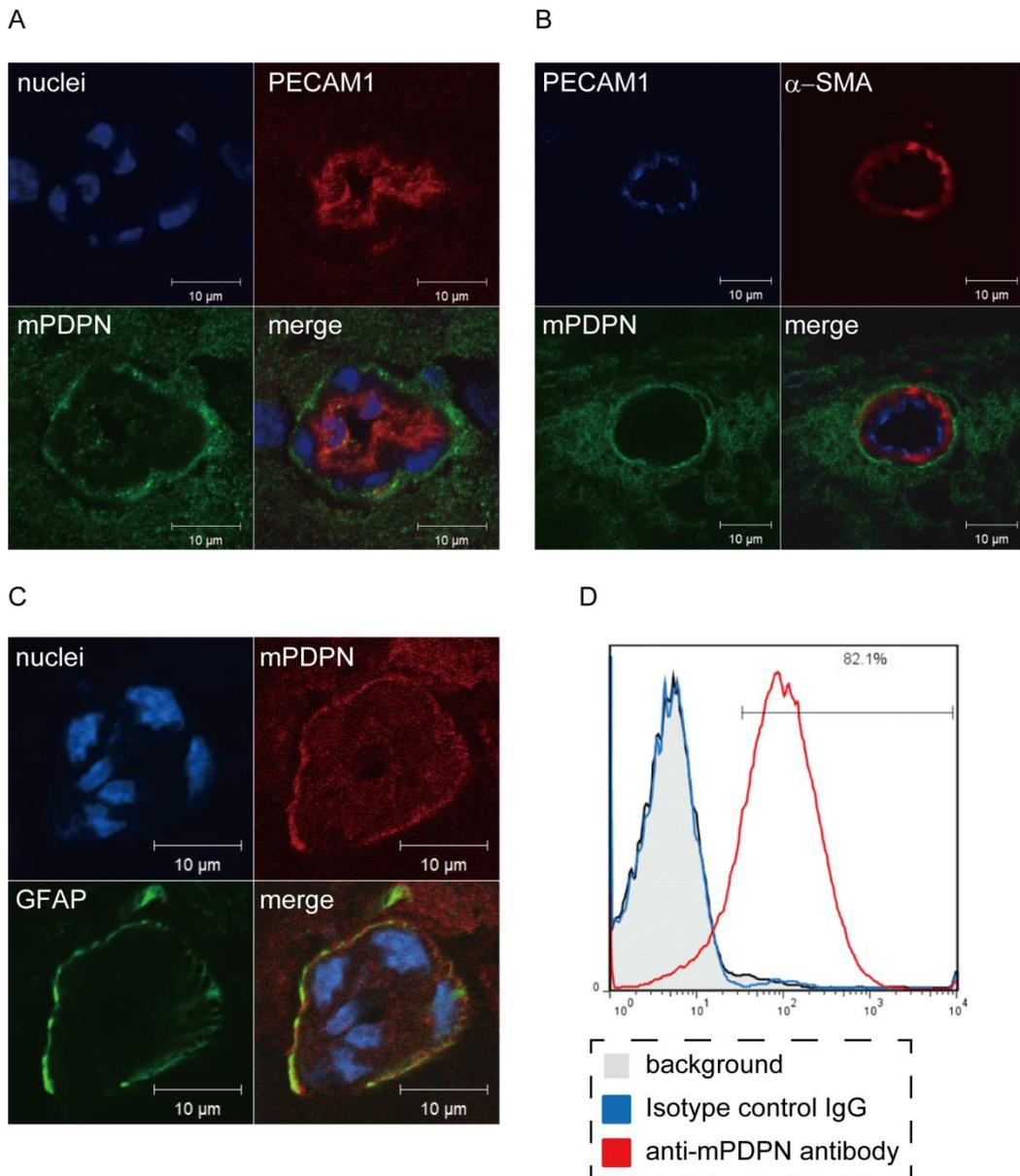


図 9 mPDPN はマウス正常脳において血管周囲に強く発現している

A-C マウス正常脳における血管断面の免疫染色。 scale bars: 10 μ m

A mPDPN は PECAM1 陽性血管内皮細胞周囲に発現していた。

B mPDPN は α -SMA 陽性壁細胞を覆うように発現していた。

C mPDPN は GFAP と共局在しており、血管周囲に存在するアストロサイトの end feet に強く発現していた。

D mAC を用いた *in vitro* における mPDPN の発現解析。mAC の 8 割強が mPDPN 陽性であった。

を促進することが知られている[68]。そこで、炎症状態にある BBB において PDPN が血管の安定性に寄与しているか検討した。まず一過性前脳 (全脳)虚血モデルにおいて白血球の浸潤が見られるかを免疫染色で観察したところ、両側頸動脈の阻血を行わなかったマウス (sham)においては CD45 陽性白血球の脳実質への浸潤がほとんど見られなかったのに対して、阻血を行ったマウス (stroke) においては多数の白血球の浸潤が観察された (図 10 A)。このことから、一過性前脳 (全脳)虚血モデルは脳の炎症モデルとして適切であることが示された。このモデルに対し、抗 mPDPN 中和抗体 (8F11)または陽性コントロールとして抗 GPIb α 中和抗体を尾静脈投与した。投与後 24 時間の時点で脳組織を回収し免疫染色を行ったところ、コントロール IgG 投与群と比較して 8F11 または抗 GPIb α 中和抗体投与群において血管からの fibrinogen 漏出が顕著であった (図 10 B)。そこで fibrinogen の漏出が見られる血管の割合を定量したところ、コントロール IgG 投与群と比較して 8F11 または抗 GPIb α 中和抗体投与群において有意に上昇していた (図 10 C)。このことから、PDPN および血小板は炎症状態にある脳組織において血管安定化を促進していることが示された。

図 10

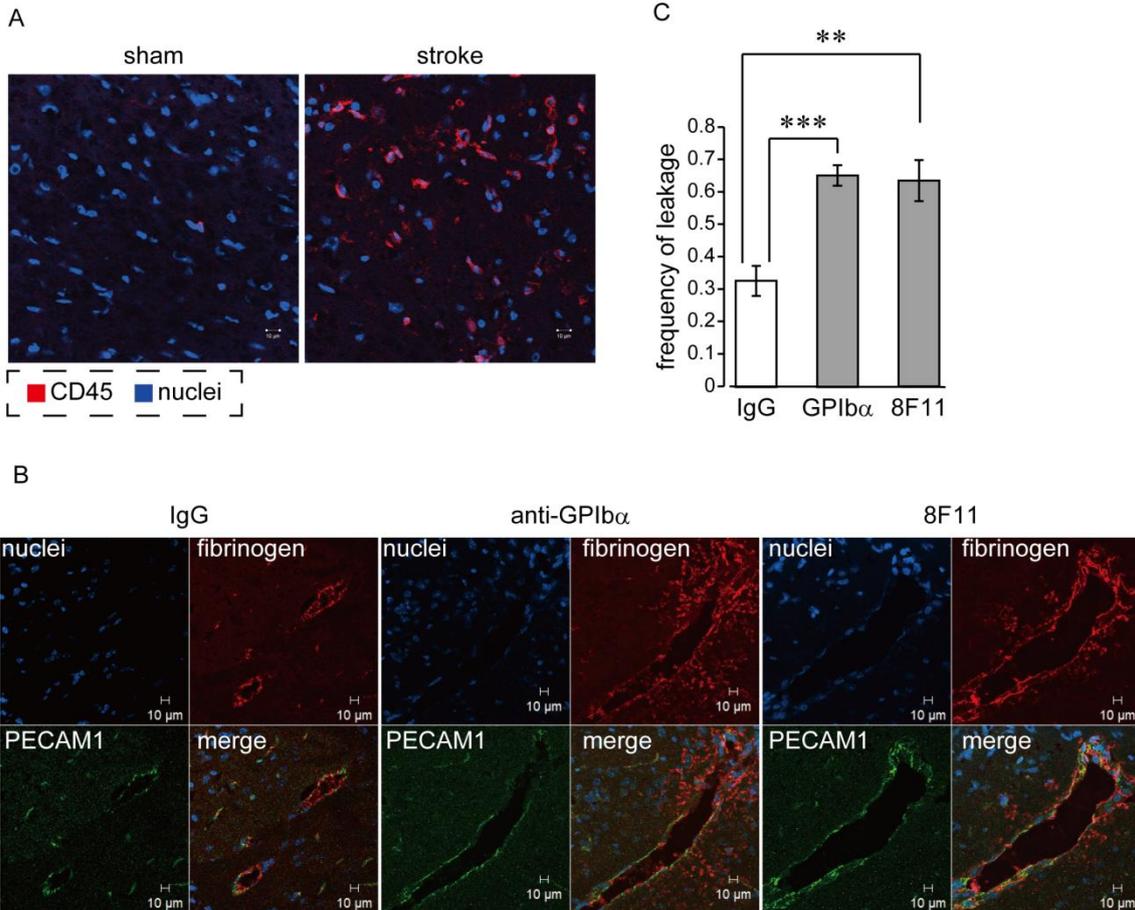


図 10 8F11 の投与は炎症状態にある脳血管の透過性を亢進させる

A CD45 (汎白血球マーカー、赤)の染色。青は核 (TO-PRO3)。sham (虚血なし) ではほとんど白血球の浸潤が見られなかったのに対し、stroke (虚血あり) では多くの白血球が浸潤していた。scale bar: 10 μ m

B モデルに各中和抗体を投与したときの典型的な血管の画像。コントロール IgG 投与群と比較して、抗 GPIIb/IIIa 中和抗体または 8F11 投与群において fibrinogen の点状の漏出が顕著であった。scale bar: 10 μ m

C fibrinogen が漏出している血管の割合の定量。漏出頻度はコントロール IgG 投与群と比較して、抗 GPIIb/IIIa 中和抗体または 8F11 投与群において有意に増加した。error bars: mean \pm SE、それぞれ n = 5, 5, 4、**: p < 0.01、***: p < 0.001

PDPN は膠芽腫由来細胞 (in vitro)およびその同所移植モデル (in vivo)の双方に発現している

PDPN が正常脳組織の BBB に加えて膠芽腫においても BTB のバリア機能に関与する可能性があるかどうか検討するため、まず TGS シリーズの in vitro における hPDPN の発現をフローサイトメトリーで比較した。使用した TGS シリーズのうち、TGS-01 および TGS-03 が hPDPN を高発現していた (図 11 A)。TGS-03 のほうが TGS-01 よりも hPDPN 陽性細胞の割合は高かったが、TGS-01 は TGS-03 と比較して腫瘍形成能が高いことから、以降の in vivo における実験では TGS-01 を用いた。TGS-01-luc 同所移植モデルにはヒトおよびマウスの細胞が混在しているため、免疫染色およびフローサイトメトリーに用いる PDPN 抗体の種特異性を確認した。その結果、hPDPN 抗体 (clone NZ-1.3)はヒト由来脳腫瘍細胞である TGS-01 を、mPDPN 抗体 (clone RTD4E10)はマウス由来脾臓血管内皮細胞である MS-1 をそれぞれ特異的に標識した (図 11 B)。この結果から、今回用いた抗体はヒトとマウスの間で交差反応しないことが示された。

次に TGS-01 が in vivo においても hPDPN の発現を維持しているか調べるため、TGS-01-luc 同所移植モデルを用いて免疫組織染色を行ったところ、腫瘍組織全体において hPDPN の発現が観察された (図 11 C)。これらの結果から、TGS-01 は in vitro および in vivo の双方において hPDPN を発現していることが示

図 11

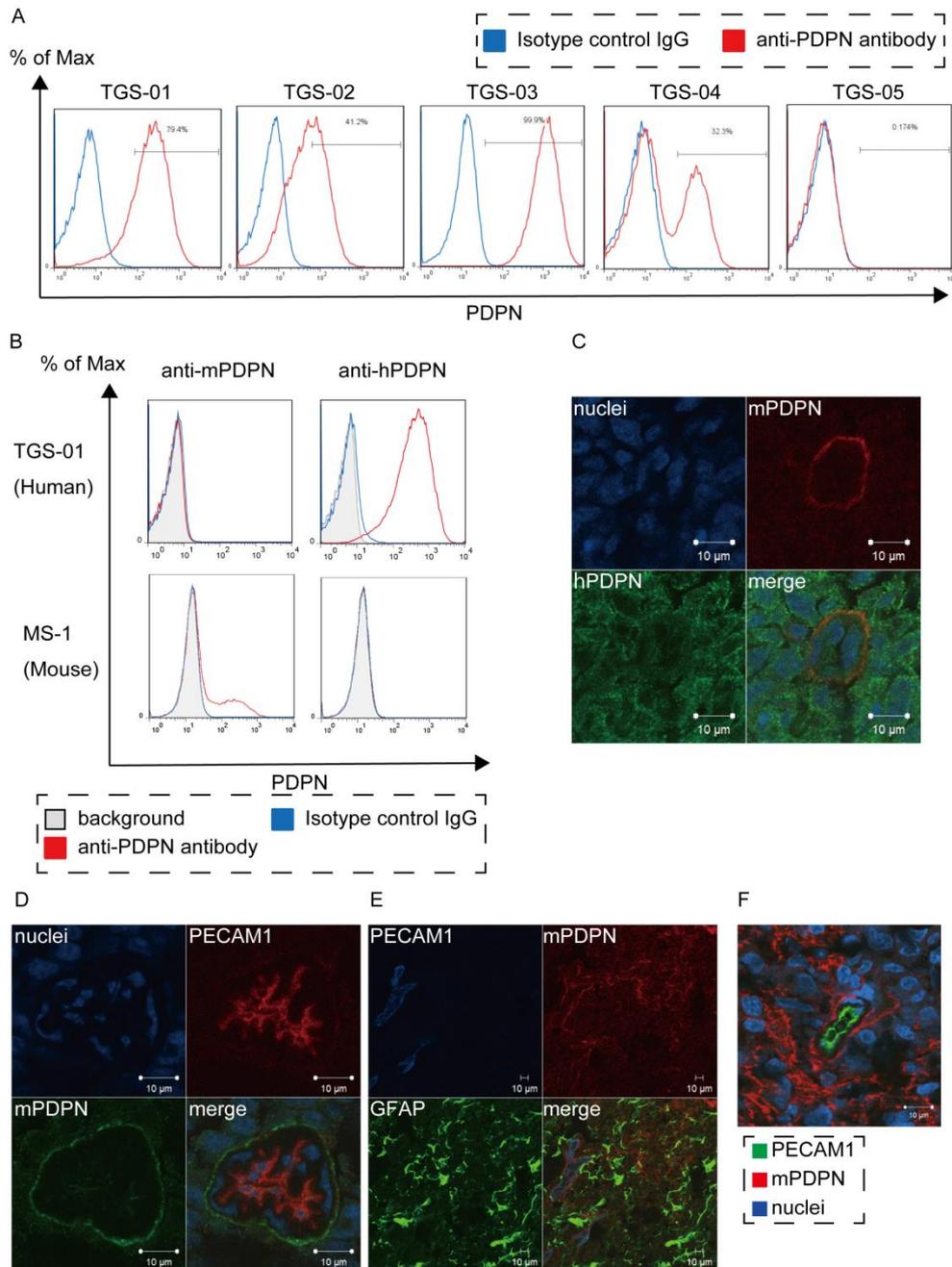


図 11 PDPN は膠芽腫由来細胞およびその同所移植モデルに発現している

A in vitro での脳腫瘍細胞における hPDPN 発現確認。hPDPN は TGS-01 と TGS-03 に高発現しており、TGS-05 にはほとんど発現していなかった。

B 抗体の特異性確認。anti-hPDPN 抗体は hPDPN に、anti-mPDPN 抗体は mPDPN にそれぞれ特異的に結合した。

C-E TGS-01-luc 同所移植モデルにおける免疫染色。scale bar: 10 μm

C hPDPN の発現が保たれていた。

D mPDPN は PECAM1 陽性血管内皮細胞周囲にも発現していた。

E mPDPN は GFAP とは必ずしも共染しなかった。

F TGS-04-luc 移植モデルにおいても mPDPN は血管周囲に発現していた。scale bar: 10 μm

された。

さらに、マウス由来の mPDPN が正常組織だけでなく腫瘍組織においても発現しているかを検討したところ、腫瘍血管を取り囲むように mPDPN が発現している様子が観察された (図 11 D)。また、mPDPN は血管周囲のみならず腫瘍組織全体に網目状に発現していたが、GFAP とは必ずしも共染されなかった (図 11 E)。血管周囲を PDPN 陽性細胞が取り巻いている染色像は TGS-04-luc 同所移植モデルにおいても観察された (図 11 F)。これらの結果から、TGS-01-luc 同所移植モデルにおいては正常組織同様に mPDPN が血管周囲に発現していること、および hPDPN と mPDPN の双方が腫瘍組織全体に発現していることが示された。

BMP シグナルの活性化は PDPN の発現を低下させる

PDPN がマウス正常脳のアストロサイトおよび膠芽腫由来細胞に発現していたことから、これらの細胞において PDPN の発現を制御する因子は血管透過性も制御する可能性がある。そこで PDPN の発現を制御する因子について検討した。私の所属する研究室において、RNA シーケンスによる網羅的な解析から BMP4 刺激が TGS-01 において PDPN の発現を顕著に抑制することが見いだされていた (未発表データ)。そこで、BMP4 が TGS-05 以外の TGS シリーズ、U87MG

および mAC において PDPN 発現を抑制するか定量的 RT-PCR で検討した。その結果、今回使用したすべての細胞において、BMP4 刺激はシグナル標的遺伝子である ID1 mRNA の発現を上昇させた (図 12 A)。これにより、これらの細胞において BMP シグナルが伝達されていることが示された。また、BMP4 刺激は、細胞間で作用の強さに違いはあるものの、すべての細胞において PDPN mRNA の発現を抑制した (図 12 B)。また、mAC に対する LDN の処置は PDPN mRNA の発現を促進したことから、mAC においても BMP シグナルは PDPN の発現を抑制することが示された (図 12 B)。また、フローサイトメトリーで PDPN のタンパクレベルでの発現を解析したところ、TGS シリーズおよび U87MG に対する BMP4 刺激は PDPN の発現を低下させ、mAC に対する LDN 処置は PDPN の発現を上昇させた (図 13 A)。これは mRNA の変動と同様の結果であった。

最後に *in vivo* における BMP シグナルの伝達と PDPN の発現に相関があるか検討するため、マウス正常脳組織を用いてリン酸化 Smad1/5 (pSmad1/5) の免疫染色を行った。脳実質細胞の多くが pSmad1/5 陽性であったが (図 13 B および C)、PDPN 陽性アストロサイト近傍において pSmad1/5 の染色性が減弱していた (図 13 B)。pSmad1/5 の染色性が減弱する部分は PECAM1 陽性の血管内皮細胞近傍とも重なった (図 13 C)。

これらの結果から、*in vitro* において BMP シグナルの活性化がアストロ

図 12

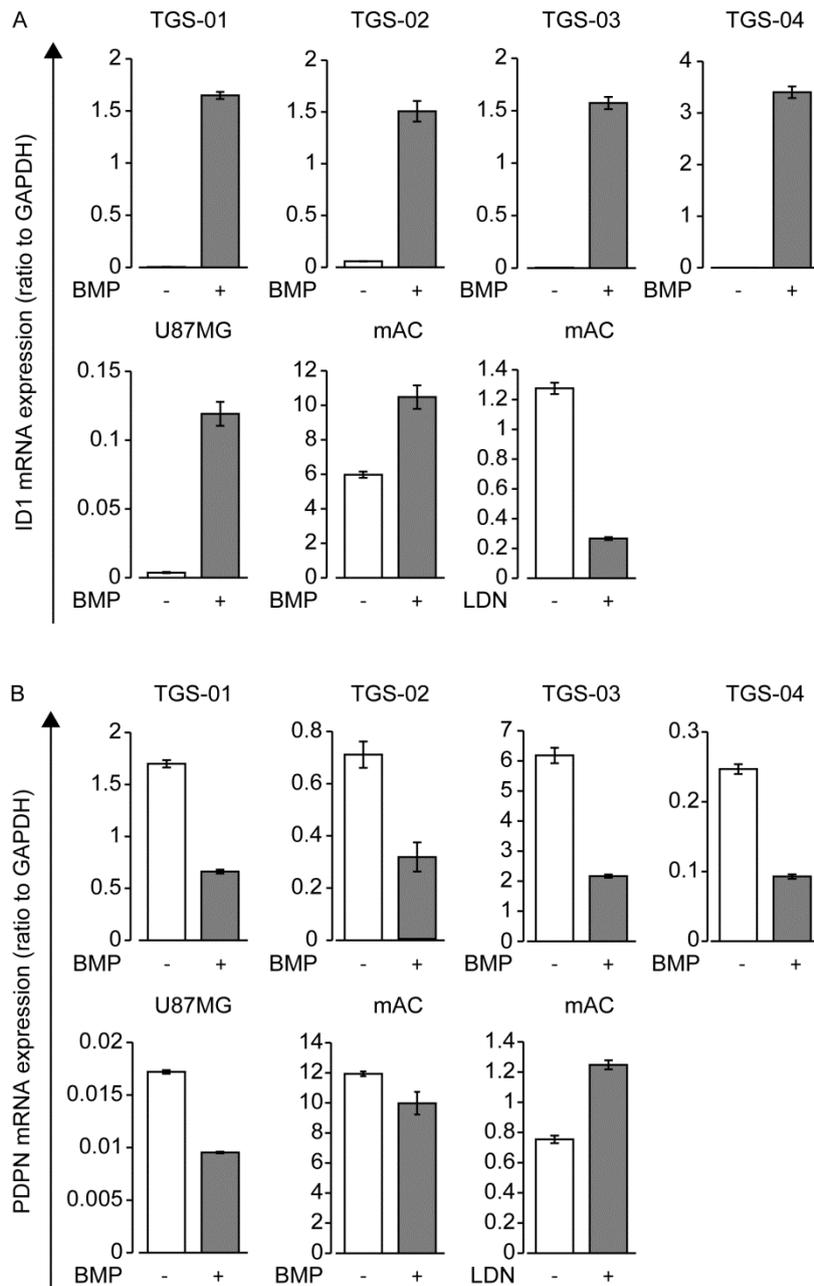
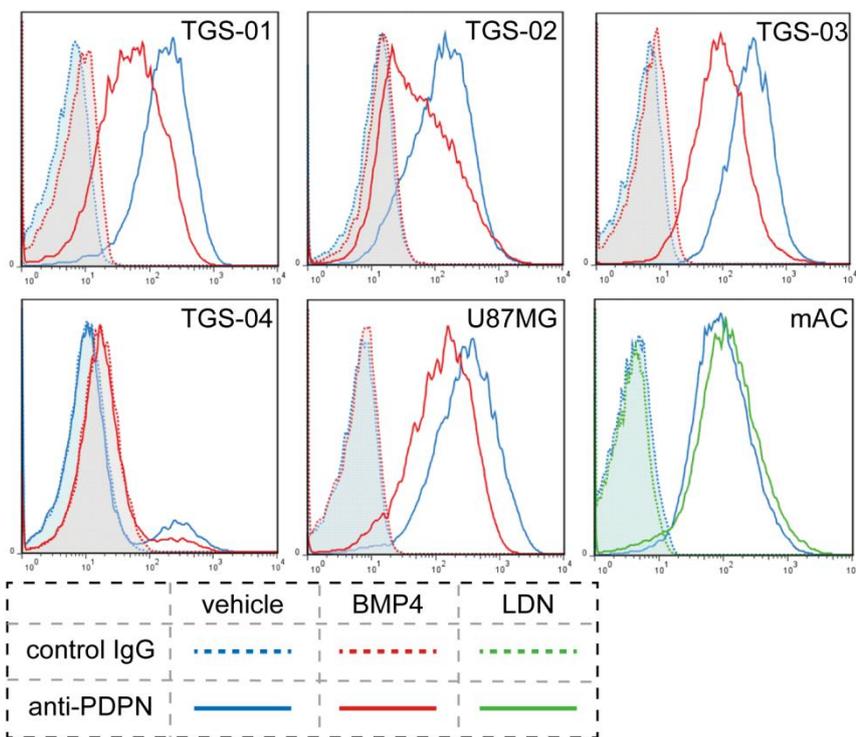


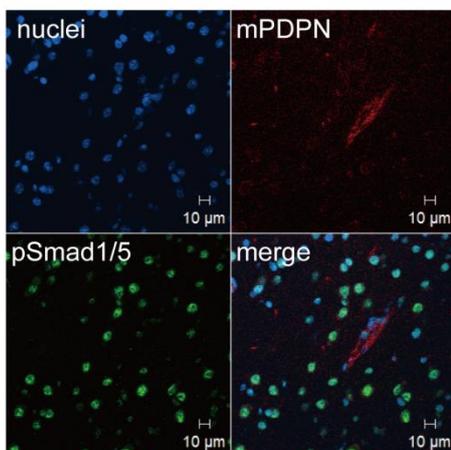
図 12 BMP4 はアストロサイト系の細胞において PDPN の発現を低下させる
 A ID1 mRNA 発現の変動。BMP4 (TGS シリーズに対しては 10 ng/ml、U87MG および mAC に対しては 30 ng/ml、48 時間処置)は全ての細胞において ID1 mRNA の発現を上昇させた。LDN (1 μ M、48 時間処置)は mAC において ID1 の発現を低下させた。error bars: mean \pm SD
 B PDPN mRNA 発現の変動。BMP および LDN の処置条件は(A)と同様である。BMP4 は mAC 以外のすべての細胞において PDPN mRNA 発現を低下させた。LDN は mAC において PDPN mRNA の発現を上昇させた。error bars: mean \pm SD

図 13

A



B



C

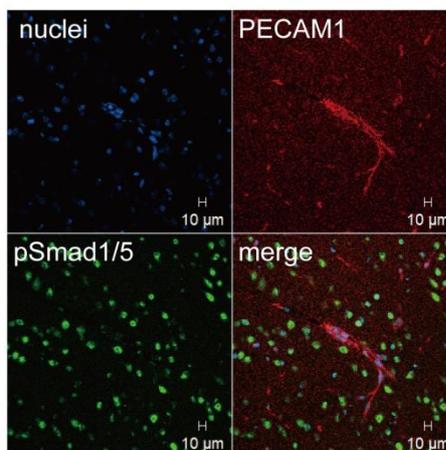


図 13 BMP4 はアストロサイト系の細胞において PDPN の発現を低下させる
 A フローサイトメトリーによるタンパクレベルにおける PDPN 発現解析の結果。BMP4 (TGS シリーズに対しては 10 ng/ml、4 日間、U87MG に対しては 30 ng/ml、6 日間処置)または LDN (mAC に対してのみ実施、1 μ M、48 時間処置)によるピークの変動は、mRNA レベルの発現変動と一致した。

B および C マウス正常脳の免疫染色。scale bar: 10 μ m

B mPDPN を発現する部位 (血管周囲のアストロサイト近傍)では pSmad1/5 の染色が弱かった。

C PECAM1 陽性の血管近傍では pSmad1/5 の染色が弱かった。

サイト系の複数の細胞種において PDPN の発現を抑制することが示された。これに加えて *in vivo* においても脳血管周囲の PDPN 陽性アストロサイト近傍において pSmad1/5 の染色性が減弱しており、*in vitro* の結果を支持した。

考察

本研究において、私はマウス正常脳組織の血管周囲を PDPN 陽性のアストロサイトが取り巻いていることを見出した。膠芽腫モデルにおいては、PDPN は血管周囲に加えて腫瘍領域全体にわたって発現しており、GFAP 陰性細胞の一部も PDPN を発現していた。このことから、膠芽腫においてはアストロサイト以外にも PDPN を発現している可能性が示された。また、PDPN の中和が一過性前脳 (全脳)虚血モデルにおいて血管透過性を亢進させたことから、PDPN は脳血管の安定性の維持に寄与していることが示唆された。さらに、BMP シグナルの活性化が PDPN の発現を抑制することをマウス正常アストロサイトおよび複数のヒト膠芽腫細胞を用いた *in vitro* の実験から見出し、*in vivo* において正常脳組織の血管周囲においてのみ BMP シグナルの活性が抑制されていることを確認した。これは BMP シグナルの活性化が *in vivo* においても PDPN の発現を抑制していることを支持する結果である。これらのことから、PDPN が BBB の機能の一端を担っており炎症状態にある血管の安定化を促進していること、膠芽腫の BTB においても血管の安定化に寄与している可能性があること、さらに BMP シグナルの活性化が PDPN の発現抑制を介して血管透過性を亢進させうることを示唆された。

GPVI の関与について

GPVI は CLEC2 以外のもうひとつの ITAM 受容体であり、GPVI の主なリガンドはコラーゲンである[50]。正常な脳組織においてはコラーゲンの発現量は比較的低いですが、脳腫瘍組織においては特に IV 型コラーゲンの発現量が高まっていることが報告されている[69]。また、GPVI と CLEC2 は炎症状態にある血管の安定化にそれぞれ部分的に寄与している [49]。本実験においても、CLEC2-PDPN の相互作用以外に GPVI-コラーゲンの相互作用で ITAM シグナルが活性化している可能性があり、PDPN 中和抗体は脳虚血モデルにおいて ITAM シグナリングを部分的に阻害していることが考えられる。

PDPN 中和の実用化に向けた課題

PDPN は血小板の ITAM シグナルを活性化することで血管の安定化に寄与しており、炎症状態にあるリンパ節 high endothelial venule において白血球が血管外に遊出する際の局所的なバリアの崩壊を阻止している[49,62]。また、炎症および腫瘍といった白血球の血管外への遊出がある状態においてのみ、血小板減少が出血を誘発することが知られている[45,48,49]。私の所属する研究室においても、脳虚血モデルに対して 8F11 を投与した際に脳以外の組織においては明らかな出血は観察されなかったことから (未公表データ)、炎症状態のみにおいて

PDPN の中和が血管漏出性を亢進させることを確認している。これらのことから、炎症性の疾患をもつ患者において PDPN を中和した場合、炎症部位における出血を促進する可能性がある。従って、膠芽腫の治療の一環として PDPN 中和を計画する際には、患者の全身状態を正確に把握することが重要である。それが可能であるならば、PDPN 中和は膠芽腫に対して薬剤送達を高める有効な方法になると考えらえる。

PDPN のバリア機能について

BBB は血液と組織を隔てる blood-tissue barrier の一種である。blood-tissue barrier には BBB (脳・中枢神経)のほかにも blood-retinal barrier (眼)、blood-thymus barrier (胸腺)、blood-air barrier (肺)、blood-urine barrier (糸球体)、blood-testis barrier (精巣)および blood-placenta barrier (胎盤・臍帯)があり[70,71]、これらすべての blood-tissue barrier において PDPN が発現している[72-76]。本研究において、PDPN が BBB の機能の一端を担っていることが示された。PDPN は BBB のみならず blood-tissue barrier における血管安定化に寄与している可能性がある。

PDPN の BBB における血管安定性維持のメカニズムについて

本研究においては、PDPN が ITAM リガンドとして機能し、炎症状態にある BBB において血管漏出性を負に制御していることを示した。しかし、炎症状態にある血管において、PDPN および血小板が血管安定性を維持するメカニズムはよく知られていない。炎症状態において血管安定性を維持する因子の候補として、血小板の活性化に伴い濃染顆粒から放出される ADP、 α 顆粒から放出される serpine や metalloproteinase inhibitor をはじめ複数の因子が報告されている [50]。また、血小板減少はウサギ舌の毛細血管において血管漏出性を亢進させることおよび血管内皮細胞の菲薄化や有窓化といった電子顕微鏡レベルでの微細構造を変化させることが知られており [77]、PDPN の中和も同様に BBB の微細構造に影響を与える可能性がある。

PDPN の BTB における役割について

本研究においては、正常組織と TGS-01 および TGS-04 同所移植モデルに共通して血管周囲に PDPN が発現していること、および PDPN が炎症状態にある脳血管の漏出性を負に制御していることが示された。また、TGS-01 同所移植モデルに対してヒト PDPN およびマウス PDPN 双方の中和抗体を投与しても血管漏出性の亢進は見られなかったが、これらの中和抗体を投与したのち

BALB/c マウス脾臓から単離した T 細胞を同所移植モデルマウスに静脈内投与すると、統計的な有意差はつかなかったものの血管からの fibrinogen の漏出が亢進する傾向が観察された (未公表データ)。これは TGS-01 同所移植モデルにおいても、PDPN の中和に加えて T 細胞をはじめとした白血球の血管外への遊出が重要であることを示唆する。これらのことから、膠芽腫においても、一過性全脳 (前脳) 虚血モデルと同様に、PDPN の中和は白血球の血管外への遊出がある状態において血管漏出性を高める可能性が高く、PDPN は BTB においても血管の安定化に寄与しているのではないかと考えている。

今後の展開について

本研究の知見をもとに、PDPN 中和抗体や BMP 刺激が BTB の漏出性に与える影響を詳細に検討することや、外因性に投与された薬剤の漏出性を改善し抗腫瘍効果を発揮するかを薬剤トレーサーや抗癌剤を用いて評価することは今後の検討課題である。さらに、PDPN 中和抗体や BMP 刺激の BBB および BTB の微細構造に対する影響を含め、これらが BBB および BTB における漏出性を制御するメカニズムを解明することは興味深い。

本研究の成果は、脳のアストロサイトに発現する PDPN が BBB のバリ

ア機能の一端を担っていることを明らかにした。また、アストロサイト系細胞の PDPN 発現調節の一部を BMP がつかさどっていることを明らかにした。PDPN 中和や BMP 刺激による PDPN 発現抑制は膠芽腫に対する薬剤送達を改善するうえで有効な新規の手段となりうる。

結語

第 1 章

- ヒト膵臓癌由来細胞株 BxPC-3 皮下移植モデルに対する FGF-2 の添加が線維化を亢進させることを発見した。
- 線維化の亢進は高分子薬剤の腫瘍内分布を阻害した。
- 腫瘍組織におけるコラーゲンの増生が線維化および腫瘍組織内の高分子薬剤分布阻害の主な原因になっていることを見出した。

第 2 章

- マウス正常脳組織において、血管周囲のアストロサイトに PDPN が発現していることを見出した。
- 一過性前脳（全脳）虚血により炎症を誘発したモデルに対して抗 mPDPN 中和抗体を投与したところ、血管の漏出性が亢進した。
- PDPN 陽性の血管周囲のアストロサイトは膠芽腫モデルにも存在していた。
- 正常アストロサイトおよびアストロサイト系の膠芽腫細胞においては BMP シグナルの活性化が PDPN の発現を抑制した。

本研究は 2 つの章を通じて難治性が高く予後の悪い腫瘍に対する薬剤送達

を阻む因子の機能および制御の一端を解明したものである。本研究で着目した
膵臓癌と膠芽腫は、発生部位、組織型、血管密度などの微小環境をはじめ、大
きく異なる点が多い。しかし、これら 2 種類の腫瘍に共通して、難治性の一因
として腫瘍組織への薬剤送達性の低下が考えられることが本研究の結果から示
唆された。このことは、薬剤送達性の低下が難治性の原因のひとつとして重要
である可能性を提案している。本研究の成果は、難治性腫瘍に対する化学療法
のさらなる発展に貢献しうるものとする。

引用文献

1. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 47, 3039-3051, 1987
2. 相羽 恵. 抗がん薬の臨床薬理 = Anti-cancer drugs and pharmacology. 南山堂, 731p, 2013
3. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, et al. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst*, 98, 335-344, 2006
4. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-257, 2000
5. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 296, 1883-1886, 2002
6. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14, 159-172, 2014
7. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*, 46, 6387-6392, 1986
8. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, et al. The role of stroma in pancreatic

- cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9, 454-467, 2012
9. 大友 邦, 木村 理. 見て診て学ぶ膵腫瘍の画像診断. 永井書店, 391p, 2009
 10. Rucki AA, Zheng L. Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*, 20, 2237-2246, 2014
 11. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21, 418-429, 2012
 12. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62, 112-120, 2013
 13. Eikenes L, Bruland Ø, Brekken C, Davies CeL. Collagenase increases the transcapillary pressure gradient and improves the uptake and distribution of monoclonal antibodies in human osteosarcoma xenografts. *Cancer Res*, 64, 4768-4773, 2004
 14. Kato M, Hattori Y, Kubo M, Maitani Y. Collagenase-1 injection improved tumor distribution and gene expression of cationic lipoplex. *Int J Pharm*, 423, 428-434, 2012
 15. Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK. Role of extracellular

- matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res*, 60, 2497-2503, 2000
16. Goodman TT, Olive PL, Pun SH. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int J Nanomedicine*, 2, 265-274, 2007
 17. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, et al. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med*, 12, 288-303, 2012
 18. Weinberg RA. *The biology of cancer*. 2nd ed., Garland Science, 876p, 2014
 19. Hosoya H, Kadowaki K, Matsusaki M, et al. Engineering fibrotic tissue in pancreatic cancer, a novel three-dimensional model to investigate nanoparticle delivery. *Biochem Biophys Res Commun*, 419, 32-37, 2012
 20. Kano MR, Bae Y, Iwata C, et al. Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3460-3465, 2007
 21. Kuniyasu H, Abbruzzese JL, Cleary KR, Fidler IJ. Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma. *Int J Oncol*, 19, 681-685, 2001

22. Chujo S, Shirasaki F, Kondo-Miyazaki M, Ikawa Y, Takehara K. Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis. *J Cell Physiol*, 220, 189-195, 2009
23. Cao R, Ji H, Feng N, et al. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 15894-15899, 2012
24. Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4, 806-813, 2004
25. Lunt SJ, Kalliomaki TM, Brown A, et al. Interstitial fluid pressure, vascularity and metastasis in ectopic, orthotopic and spontaneous tumours. *BMC Cancer*, 8, 2, 2008
26. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*, 60, 4324-4327, 2000
27. Leali D, Dell'Era P, Stabile H, et al. Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol*, 171, 1085-1093, 2003
28. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, et al. A simple, quantitative method for assessing

- angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest*, 67, 519-528, 1992
29. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta*, 1832, 989-997, 2013
 30. Aoyagi Y, Oda T, Kinoshita T, et al. Overexpression of TGF-beta by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 91, 1316-1326, 2004
 31. Wenger C, Ellenrieder V, Alber B, et al. Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 18, 1073-1080, 1999
 32. Löhr M, Schmidt C, Ringel J, et al. Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 61, 550-555, 2001
 33. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*, 181, 153-159, 1999
 34. Kano MR, Komuta Y, Iwata C, et al. Comparison of the effects of the kinase

- inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor-beta receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci*, 100, 173-180, 2009
35. Leung HY, Gullick WJ, Lemoine NR. Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 59, 667-675, 1994
36. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev*, 20, 3147-3160, 2006
37. 青笹 克, 中里 洋. 脳腫瘍. 中山書店, 348p, 2012
38. 日本脳神経外科学会, 日本病理学会. 臨床・病理脳腫瘍取扱い規約 : 臨床と病理カラーアトラス第3版. 金原出版, 278p, 2010
39. Preusser M, de Ribaupierre S, Wohrer A, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol*, 70, 9-21, 2011
40. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*, 64, 328-363, 2010

41. Ningaraj NS. Drug delivery to brain tumours: challenges and progress. *Expert Opin Drug Deliv*, 3, 499-509, 2006
42. Hayashi Y, Yoshida Y, Hamada J. [Blood-tumor barrier in malignant brain tumor]. *No Shinkei Geka*, 34, 983-999, 2006
43. Liu Y, Lu W. Recent advances in brain tumor-targeted nano-drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, 9, 671-686, 2012
44. Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1, 56-65, 2011
45. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*, 111, 4958-4964, 2008
46. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res*, 68, 6851-6858, 2008
47. Demers M, Ho-Tin-Noé B, Schatzberg D, Yang JJ, Wagner DD. Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice. *Cancer Res*, 71, 1540-1549, 2011
48. Ho-Tin-Noé B, Carbo C, Demers M, et al. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol*, 175, 1699-1708,

2009

49. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*, 123, 908-916, 2013
50. Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res*, 114, 1174-1184, 2014
51. Ridley A, Cavanagh JB. Lymphocytic infiltration in gliomas: evidence of possible host resistance. *Brain*, 94, 117-124, 1971
52. Palma L, Di Lorenzo N, Guidetti B. Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. *J Neurosurg*, 49, 854-861, 1978
53. Hitchcock ER, Morris CS. Mononuclear cell infiltration in central portions of human astrocytomas. *J Neurosurg*, 68, 432-437, 1988
54. Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, et al. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol*, 111, 483-488, 2006
55. Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol*, 3, 283, 2012

56. Tomooka M, Kaji C, Kojima H, Sawa Y. Distribution of podoplanin-expressing cells in the mouse nervous systems. *Acta Histochem Cytochem*, 46, 171-177, 2013
57. Kato Y, Kaneko M, Sata M, et al. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*, 26, 195-200, 2005
58. Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int*, 55, 83-86, 2005
59. Shibahara J, Kashima T, Kikuchi Y, Kunita A, Fukayama M. Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system. *Virchows Arch*, 448, 493-499, 2006
60. Lowe KL, Navarro-Nunez L, Watson SP. Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. *Thromb Res*, 129 Suppl 1, S30-37, 2012
61. Fujita N, Takagi S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J Biochem*, 152, 407-413, 2012
62. Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, et al. Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature*, 502, 105-109, 2013
63. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors

- and signal transduction. *J Biochem*, 147, 35-51, 2010
64. Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, Miyazono K. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? *Pathol Int*, 63, 287-296, 2013
 65. Peterziel H, Müller J, Danner A, et al. Expression of podoplanin in human astrocytic brain tumors is controlled by the PI3K-AKT-AP-1 signaling pathway and promoter methylation. *Neuro Oncol*, 14, 426-439, 2012
 66. Yoshimatsu Y, Lee YG, Akatsu Y, et al. Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 18940-18945, 2013
 67. Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, et al. C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 752, 209-218, 1997
 68. Grønberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation*, 10, 115, 2013
 69. Payne LS, Huang PH. The pathobiology of collagens in glioma. *Mol Cancer Res*,

- 11, 1129-1140, 2013
70. 伊藤 隆, 阿部 和. 組織学改訂 19 版. 南山堂, 601p, 2005
71. Cheng CY. Biology and regulation of blood-tissue barriers. Springer Science+Business Media Landes Bioscience, 361p, 2012
72. Kaji C, Tomooka M, Kato Y, Kojima H, Sawa Y. The expression of podoplanin and classic cadherins in the mouse brain. *J Anat*, 220, 435-446, 2012
73. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*, 166, 913-921, 2005
74. Kaji C, Tsujimoto Y, Kato Kaneko M, Kato Y, Sawa Y. Immunohistochemical Examination of Novel Rat Monoclonal Antibodies against Mouse and Human Podoplanin. *Acta Histochem Cytochem*, 45, 227-237, 2012
75. Wang Y, Sun J, Gu Y, et al. D2-40/podoplanin expression in the human placenta. *Placenta*, 32, 27-32, 2011
76. Fuertbauer E, Zaujec J, Uhrin P, et al. Thymic medullar conduits-associated podoplanin promotes natural regulatory T cells. *Immunol Lett*, 154, 31-41, 2013
77. Kitchens CS, Weiss L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood*, 46, 567-578, 1975

謝辞

4年間にわたり多くの方々からご指導を賜り博士論文を完成させることができました。ここに深く感謝申し上げます。宮園浩平先生は非常に優れた研究環境を与えてくださるとともに、折に触れて的確なご助言をいただきました。また、狩野光伸先生（現岡山大学医歯薬総合研究科教授）、岩田要先生をはじめグループの皆様、教室員の皆様からは日々ご指導いただき、多くのご支援も賜りました。また、4年間精神的に支えてくださった家族や友人の皆様方、本当にありがとうございました。重ねて御礼申し上げます。