

論文の内容の要旨

論文題目 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

血管内投与した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。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を規定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。

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】

腫瘍の治療に用いられる抗癌剤には低分子薬剤が多いが、低分子薬剤は腫瘍細胞のみならず増殖の速い正常細胞にもダメージを与えるため、副作用を伴うことが多い。このため、新たな腫瘍治療法として高分子薬剤の研究が盛んに行われている。高分子薬剤は低分子薬剤と比較して血中滞留性が高い。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粗造なため高分子薬剤が漏出しやすい。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、組織間質まで到達した薬剤の排出が遅延する。その結果、全身投与された高分子薬剤は腫瘍組織に集積しやすくなる。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。

浸潤性膵管癌は膵臓癌の約9割を占め、5年生存率が6%以下と難治性が高い。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)が知られている。extracellular matrix (ECM)は腫瘍間質を構成する成分のひとつであり、ヒアルロン酸やコラーゲンがこれにあたる。これらは腫瘍組織における薬剤分布を阻害するため、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、*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ため、薬剤分布に対する線維化の影響を適切に評価することは難しい。そこでこの章では、ヒト膵臓癌細胞株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・結果】

ヒト膵臓癌由来細胞株 BxPC-3 をヌードマウスの皮下に移植する際に fibroblast growth factor-2 (FGF-2) を BxPC-3 細胞懸濁液に添加したところ、腫瘍組織の線維化を亢進させることが hematoxylin-eosin (HE) 染色および AZAN 染色により示された。また、高分子薬剤の動態を模したトレーサーとして fluorescein isothiocyanate (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ところ、FGF-2 添加群において有意に減少していた。さらに、FGF-2 の添加は腫瘍組織のコラーゲン含有量の指標であるヒドロキシプロリン含有量およびマウス I 型コラーゲン mRNA 発現量を有意に増大させた。

コラーゲンのほかに高分子薬剤の腫瘍内分布を阻害する因子としてヒアルロンンおよび血管壁細胞の被覆が知られているが、FGF-2 の添加はこれらには影響を与えなかった。また、FGF-2 のリンパ管新生に対する影響を検討したところ、FGF-2 添加群においてリンパ管密度および圧迫されたリンパ管の割合が有意に増加していた。

【考察】

本研究において、私は腫瘍細胞皮下移植モデルに対して線維化を亢進させる新規の手法を発見し、腫瘍組織におけるコラーゲンの増生が線維化の主な原因になっていることを見出した。また、線維化の亢進が高分子薬剤の腫瘍内分布を阻害することを確認した。*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。今後、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になりうる。

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】

膠芽腫はアストロサイト系腫瘍である浸潤性星細胞腫の約 8 割を占め、生存期間中央値は約 15 か月と予後が悪い。膠芽腫に対する化学療法には 中枢神経への移行が良好なテモゾロミド (TMZ) が使用されるが、TMZ 以外の抗癌剤の膠芽腫に対する薬剤送達性は低く、TMZ に耐性を持つ膠芽腫もある。従って、膠芽腫に対する薬剤送達性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。

正常脳組織には血管内皮細胞、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 blood brain barrier (BBB) が存在している。BBB は薬剤の血液から中枢神経組織への漏出を防ぐため、血管透過性は低い。一方、膠芽腫においても blood tumor barrier (BTB) が存在し、腫瘍に

対する薬剤の送達性を低下させていると言われている。これらのことから、BBB と BTB の血管の安定化に共通したメカニズムがある可能性がある。

血小板は炎症状態にある血管および腫瘍血管の安定化を促進している。近年、この機能は 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。血小板膜表面の ITAM 受容体に対するリガンドのひとつに podoplanin (PDPN) があり、PDPN 中和抗体 (8F11)は PDPN の ITAM リガンドとしての機能を抑制し血小板凝集を阻害することが確かめられている。PDPN はアストロサイトや膠芽腫を含め、いくつかの正常臓器や悪性腫瘍に発現がみられる。近年になって、PDPN は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、PDPN の ITAM リガンドとしての重要性が示された。また、私の所属する研究室において RNA シーケンスを用いた網羅的な解析から、bone morphogenetic protein (BMP)4 刺激が膠芽腫由来細胞における PDPN の発現を抑制することが見いだされた。

上記すべてを考え合わせ、この章では PDPN が BBB と BTB に共通して血管の安定化を促進しており、BMP シグナリング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。

【方法および結果】

マウス正常脳組織の免疫組織染色による検討で、血管内皮細胞および壁細胞を取り囲む層にアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein と共染色される PDPN 陽性の細胞が存在していた。次に脳血管において PDPN が血管の安定性に寄与しているか検討するため、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 PDPN 中和抗体 (8F11)を投与したところ、PDPN 中和抗体投与群はコントロール IgG 投与群と比較して血管からのフィブリノーゲン漏出頻度が有意に上昇していた。

膠芽腫における PDPN の発現を検討するため、膠芽腫由来細胞 TGS-01-luc 同所移植モデルにおいて免疫組織染色を行ったところ、正常な脳血管同様 mPDPN 発現が腫瘍血管周囲において観察されたほか、腫瘍組織全体に hPDPN および mPDPN 双方の発現がみられた。

最後に BMP シグナルが PDPN 発現を制御するか検討した。BMP4 刺激は *in vitro* において複数の膠芽腫細胞における PDPN の発現を抑制した。また、マウスプライマリーアストロサイト (mAC)に対する BMP シグナル伝達阻害剤 LDN193189 の処置は PDPN の発現を促進した。*in vivo* では脳血管に限局してリン酸化 Smad1/5 の染色性が低下しており、BMP シグナルの活性が PDPN の発現と逆相関する傾向が観察された。

【考察】

本研究において、私はマウス正常脳において PDPN 陽性のアストロサイトが血管を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、その血管周囲のアストロサイトに加え腫瘍細胞にも PDPN が発現していた。脳における PDPN の機能を調べるため PDPN 中和抗体を一過性前脳（全脳）虚血モデルに投与したところ血管透過性が亢進したことから、PDPN は脳血管の安定性維持 (BBB の維持)に寄与していることが示唆された。さらに、アストロサイトにおける PDPN の発現調節について検討を進め、BMP シグナルの活性化が PDPN 発現を負に制御し

ていることを正常アストロサイトを含む複数のアストロサイト系細胞で確かめた。また、マウス脳内で血管に限局して BMP シグナルの活性が抑制されているという観察も、*in vivo* におけるこの調節機構の存在を支持する結果であった。PDPN を標的に BTB の障壁を弱め (具体的な手段として PDPN 中和抗体の投与や BMP 刺激による PDPN 発現抑制が考えられる)、薬剤送達を改善することは膠芽腫における有効な治療手段になりうる。