

0322 血管内皮増殖因子を利用した腫瘍血管新生イメージング薬剤の開発

00-106 出井 厚子

(指導教官：川井 恵一教授 吉本 光喜助手)

要旨:血管新生とは、既存の血管から新しい血管ネットワークが形成される現象である。腫瘍の増殖には、栄養や酸素を供給するために新たに血管を形成する必要がある。従って血管新生を評価できれば、腫瘍悪性度診断につながると考えた。腫瘍は様々な血管新生促進因子を分泌するが、中でも血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor;VEGF)は血管内皮細胞に特に親和性が高い。VEGFには5つの isoform が存在するが、最も研究が進み、かつ生体内に豊富に存在する VEGF₁₂₁ 及び VEGF₁₆₅ に着目し、血管新生イメージング剤としての可能性について検討を行った。

本研究ではクロラミン T 法により VEGF を ¹²⁵I 標識した。簡便化への種々検討の結果、シリンジタイプのカラムを使用することにより、簡便かつ純度よく [¹²⁵I]VEGF を精製することができた。担癌マウス体内分布を検討した結果、 [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ は投与初期に各臓器への高い集積が見られ、その後速やかなクリアランスを示した。一方、標的臓器である腫瘍と生理的な血管新生が見られる子宮へは高く集積するとともに、他臓器とは異なり、滞留性が認められた。また、 [¹²⁵I]VEGF₁₆₅ は [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ と比べ全ての臓器において集積が低下した。

さらに、血管新生阻害剤(2-Methoxyestradiol)負荷により [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ の腫瘍への集積低下の傾向が見られた。このことから、 [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ は腫瘍における血管新生イメージング薬剤としての可能性が示唆された。

I. はじめに

現在、癌の増殖及び転移は、酸素や栄養の供給と老廃物の廃棄を目的とした血管新生に依存しており、血管新生を阻害することで、腫瘍の増殖が抑えられることが明らかになっている¹⁾。腫瘍から血管新生促進因子が産生され、この物質が血管内皮細胞を誘導し、新たな血管を作り出す。これまでに血管新生促進因子として同定されたものの中に FGF、Int-2、Hst-1、EGF 等がある。しかし、生理的な条件下に産生細胞から細胞外へ効率良く分泌されるか不明であったり、成熟個体の正常組織ではほとんど発現が見られず、また胎生期において血管新生部位と必ずしも一致しない部位で発現している、血管内皮細胞に対する特異性は全く認められない等と上記に挙げた促進因子は、血管新生のみに関与するとは言い難い。しかし、VEGF は様々な研究から、内皮細胞に対する厳密な特異性、発生初期からの VEGF 受容体の内皮細胞特異的発現、さらに、多くの血管新生の際に VEGF が強く発現される点等、内皮細胞と密接な関係があるということが明らかとなっている^{2,3)}。VEGF に5つの isoform が存在することが報告されている⁴⁾が、本研究では最も研究が進み、かつ生体内に豊富に存在する VEGF₁₂₁ 及び VEGF₁₆₅ に着目し、これらを標識母体とする放射性薬剤の開発を試みた。

II. 実験材料と方法

A. VEGF₁₂₁ 及び VEGF₁₆₅ の ¹²⁵I 標識及び精製

VEGF₁₂₁ は R&D systems 社、VEGF₁₆₅ は Peprrotech EC 社より購入した。

VEGF(0.1mg/ml)10 µl にリン酸緩衝液(Phosphate Buffer;P.B, 20mM, pH7.2, Nacalai tesque)を50µl 加えた後、Na¹²⁵I(Amersham)を適量加えた。さらに、クロラミン T(0.5mg/ml, Nacalai tesque)を 50 µl 入れ反応を開始させた。一分間反応させた後、二亜硫酸ナトリウム(5 mg/ml, Nacalai tesque)を 5µl 加えて反応を止めた。

[¹²⁵I]VEGF₁₂₁ の精製にはゲルろ過クロマトグラフィー (HiTrap Desalting column,

Amersham)を用いた。標識を終えた $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ にカラムへの吸着を防ぐ界面活性剤(polyethyleneglycol-p-isoctylphenyl ether;NP-40, Calbiochem)の入った P.B(pH7.2)を 50 μl 加えた。次に P.B(0.1%NP-40, pH7.2)10ml で洗浄した HiTrap Desalting column に apply した。これを 0.5ml ずつ分取し、ペーパークロマトグラフィーで精製率を評価した。

$[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ の精製にはアフィニティークロマトグラフィー(HiTrap Heparin HP, Amersham)を用いた。標識を終えた $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ を HiTrap Heparin HP に apply した。P.B(20mM, pH7.2)10ml で洗浄した後 P.B(0.8M NaCl, pH7.2)5ml を加えて溶出した。これを 0.5ml ずつ分取し、ペーパークロマトグラフィーで精製率を評価した。

ペーパークロマトグラフィーには、専用の濾紙(No.51B, Advantec)を用い、展開液には、アセトン:アンモニア=8:2 を使用した。

B. 担癌マウスの体内分布

移植癌には LS180(ヒト結腸腺癌)を用いた。これは、VEGF の産生量が多いことが明らかとなっているためである⁵⁾。LS180 細胞数 5×10^6 個/100 μl を、マウス(BALB/c nu/nu♀6 週齢)の左大腿部に移植し、7~8 日経過した時点で実験に用いた。担癌マウスに $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ 及び $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ を 56kBq/100 μl /匹を投与し、投与後一定時間(0.5、4、8、24 時間)後にエーテル麻酔下にヘパリン処理済の注射器で 300 μl 採血した。その後臓器を摘出し、湿重量を秤量、オートウェルガンマカウンタ(Aloka:ARC-380)で血液及び臓器の放射能を計測した後、組織集積率及び重量集積率を次式により算出し、腫瘍への取り込みを検討した。

$$\text{組織集積率}[\% \text{ID}/\text{tissue}] = \text{組織放射能}[\text{cpm}] / \text{投与放射能}[\text{cpm}] \times 100$$

$$\text{重量集積率}[\% \text{ID}/\text{g tissue}] = \text{組織集積率}[\% \text{ID}/\text{tissue}] / \text{組織重量}[\text{g}]$$

C. 血管新生阻害剤による治療群と非治療群との比較

血管新生阻害剤として 2-Methoxyestradiol(2-ME, Sigma)を用いた。LS180 移植の手順は B. と同様とし、移植後 8 日目から 2-ME 経口投与による治療を開始した。治療群には 0.5% carboxy methyl cellroce(CMC)で懸濁した 2-ME(75mg/kg)を 100 μl /匹、非治療群には CMC のみを 100 μl /匹経口投与した。1 日 1 回の経口投与を 3 日間続け、LS180 移植後 11 日目に $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ を 56kBq/100 μl /匹投与し、投与後 4 時間後にエーテル麻酔下にヘパリン処理済の注射器で 300 μl 採血した。その後は B. の手順と同様、組織集積率及び重量集積率を算出し、腫瘍への取り込みを検討した。

III. 結果と考察

A. VEGF₁₂₁ 及び VEGF₁₆₅ の ^{125}I 標識及び精製

$[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ 及び $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ の標識率及び純度の結果は、 $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ の標識率 88.4~90.8%、放射化学的純度 98.9~99.1%、比放射能 13.0~18.9[GBq/mg]であり、一方、 $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ の標識率 29.6~53.2%、放射化学的純度 96.6~97.7%、比放射能 2.6~7.2[GBq/mg]であった。両者共にシリンジタイプのカラムで簡便に精製ができ、かつ 96%以上の高い標識率が得られた。 $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ の標識率は、アミノ酸残基数が増えることで、ヨウ素が導入されにくくなり低下したと考えられる。

B. 担癌マウスの体内分布

$[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ 及び $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{165}$ の体内分布の結果を Table.1 に示す。

$[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ は腫瘍及び子宮への集積の一時的な滞留が認められた。子宮は、性周期に伴う卵巣の黄体形成や子宮内膜の発育の際に、一過性の強い血管新生が起こることが分かっている。従って、腫瘍及び子宮への集積は、血管新生に伴い誘導されたものだと考えられた。また、脳には血液脳関門によりほとんど集積が認められず、筋肉にも顕著な集積が認められなかった。さらに、投与後 30 分で肝臓や心臓等、他臓器への集積は一時的に高いものの、速やかなクリアランスが認められた。また血液中の放射能も経時的な低下が認められた。

[¹²⁵I]VEGF₁₆₅ では、特に腫瘍・子宮への特異的な集積が見られなかった。VEGF のレセプターには KDR と Flt がある⁴⁾。KDR の量は Flt に比べ 10 倍以上あり、VEGF₁₂₁ と VEGF₁₆₅ の KDR に対する親和性を比べてみると、VEGF₁₂₁ のほうがよい⁵⁾ので、体内分布もこのことを反映した結果であると考えられる。

Table.1 [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ 及び [¹²⁵I]VEGF₁₆₅ の各臓器における重量集積率

[¹²⁵ I]VEGF ₁₂₁	Time after injection			
	0.5h	1h	4h	24h
Blood	64.49±7.93	57.68±5.01	39.50±2.05	12.80±1.13
Tumor	7.06±2.21	7.26±1.91	9.28±0.93	3.36±1.26
Brain	1.80±0.27	1.42±0.28	10.99±0.11	0.34±0.10
Liver	11.49±1.64	9.03±0.53	6.09±0.67	2.49±0.31
Uterus	7.30±1.37	7.48±3.41	12.77±6.95	4.59±1.13
Ovary	16.75±4.77	15.61±6.60	10.44±3.10	3.87±1.04
Heart	12.25±2.31	13.49±0.77	10.30±1.98	3.12±0.14
Lung	25.52±7.78	19.85±2.93	11.83±1.12	6.16±0.95
Thyroid※	0.28±0.15	0.57±0.03	2.62±0.22	10.80±2.72
Stomach	3.42±2.17	7.86±1.68	10.85±3.14	1.81±0.47
Kidney	21.93±1.61	18.82±1.47	11.54±1.05	4.45±0.38
Pancreas	2.58±1.56	3.55±0.40	2.95±0.30	1.43±0.25
Spleen	9.95±1.74	9.78±0.64	5.44±1.41	2.05±0.24
Muscle	1.90±0.34	2.29±0.14	1.89±0.65	1.14±0.15
Bone	5.55±0.80	4.67±1.13	1.62±0.20	0.98±0.29
Intestine	3.79±0.33	4.96±0.58	4.03±0.59	1.19±0.14

[¹²⁵ I]VEGF ₁₆₅	Time after injection			
	0.5h	1h	4h	24h
Blood	2.01±0.13	2.92±0.49	0.84±0.17	0.04±0.00
Tumor	1.47±0.13	1.89±0.34	0.63±0.11	0.07±0.02
Brain	2.67±0.16	2.29±0.15	0.57±0.06	0.25±0.02
Liver	21.44±2.25	8.71±1.32	3.72±0.39	2.68±0.26
Uterus	5.78±4.61	5.13±2.09	1.46±1.17	0.32±0.04
Ovary	4.49±0.85	4.00±1.31	1.13±0.54	0.59±0.44
Heart	17.47±1.86	12.28±1.64	2.79±0.40	1.30±0.16
Lung	37.47±5.30	29.63±6.62	7.66±1.50	3.04±1.29
Thyroid※	0.19±0.04	0.58±0.10	2.70±0.29	4.72±0.57
Stomach	7.13±2.30	15.97±2.30	7.03±3.12	0.65±0.16
Kidney	26.19±2.00	19.86±2.31	11.26±3.12	6.24±0.33
Pancreas	10.48±1.02	15.46±13.30	2.27±0.37	0.81±0.12
Spleen	12.66±2.08	6.86±1.98	2.55±0.75	2.26±0.25
Muscle	4.74±0.89	4.86±0.82	0.99±0.19	0.42±0.04
Bone	1.46±0.74	1.23±0.28	0.60±0.35	0.28±0.11
Intestine	3.03±0.29	2.79±0.53	1.26±0.18	0.28±0.05

※甲状腺のみ組織集積率で評価した

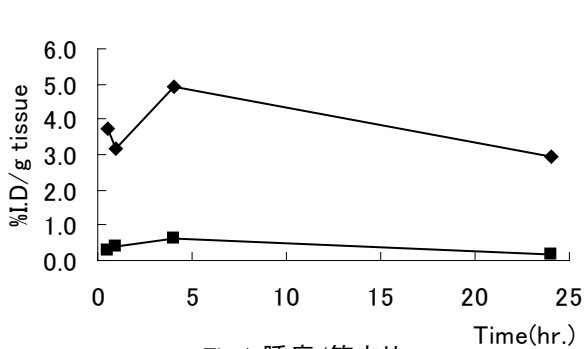


Fig.1 腫瘍/筋肉比

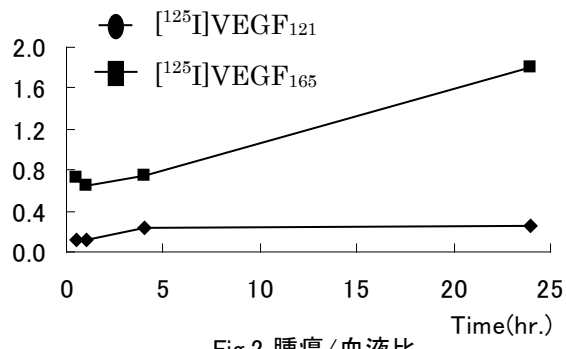


Fig.2 腫瘍/血液比

Fig.2 の腫瘍/血液比から [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ は、腫瘍への集積が血流に依存しておらず、滞留性を示していることがわかる。また対側の正常筋肉との比較である Fig.1 の腫瘍/筋肉比より、[¹²⁵I]VEGF₁₆₅ では、重量集積率が 1.0 を下回る値なのに対し、[¹²⁵I]VEGF₁₂₁ では、4 時間後に 4.5 を上回る値を示し、筋肉と腫瘍への集積の違いが顕著に現れた。以上の結果をふまえ、VEGF₁₂₁ は VEGF₁₆₅ よりも有効であると考えた。

C. 血管新生阻害剤(2-ME)による治療群と非治療群との比較

Table.2 治療群と非治療群における腫瘍の重量集積率の比較

治療群	3.8±0.4
非治療群	4.1±0.6

2-ME により VEGF₁₂₁ の腫瘍への集積が低下すれば血管内皮細胞に対する特異性を証明できる。先の体内分布の結果から投与 4 時間後に集積が最も多くなったので、今回は投与 4 時間でのみ検討を行った。Table.2 より、有意差は認められなかったものの、非治療群に比べて治療群ではやや低下傾向にあることがわかり、血管新生能を反映した集積を示している可能性が示唆された。

IV. 結語

本実験により、放射性ヨウ素標識した VEGF₁₂₁ の腫瘍における血管新生イメージング薬剤としての可能性が示唆された。

V. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、吉本光喜助手、ご協力いただいた本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 285: 1182-1186, 1971
- 2) Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674, 1997
- 3) Folkman J and D'Amore, PA: Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 87: 1153-1155, 1996
- 4) Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 15: 290-298, 1996
- 5) Makoto A, Ayako Y, Hideo S: Wide spectrum of antitumor activity of a neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 93-100, 1999
- 6) Li S, Peck-Radosavljevic M, Koller E, Koller F, Kaserer K, Kreil A, Kapiotis S, Hamwi A, Weich HA, Valent P, Angelberger P, Dudczak R and Virgolini I: Characterization of ¹²⁵I-vascular endothelial growth factor-binding sites expressed on human tumour cells: possible implication for tumour scintigraphy. *J. Cancer*, 91: 789-796, 2001