

要旨：腫瘍の血管新生は細胞が増殖し続ける上で必要不可欠なものであり、従って腫瘍血管新生の評価は、腫瘍悪性度の診断・治療効果の評価につながると考えられる。腫瘍血管新生を促進させる因子には種々のものが知られているが、これまでの研究で VEGF₁₂₁ を利用した腫瘍血管新生イメージングの可能性を報告した。今回、VEGF₁₂₁ の腫瘍内分布をオートラジオグラフィ法により検討するとともに、他の血管新生促進因子である angiopoietin(Ang)-1、FGF ファミリーの FGF-1・FGF-2 及び血管新生抑制因子である Ang-2 に着目し、これらを標識母体とした腫瘍血管新生イメージング薬剤としての可能性について検討した。

[¹²⁵I]VEGF₁₂₁ の担癌マウスにおける腫瘍内分布評価を行った結果、腫瘍辺縁を含む不均一な高集積が観察された。これらの高集積部位は、免疫染色の結果から得られた血管内皮細胞の分布と一致した。また、[¹²⁵I]FGF、[¹²⁵I]Ang の担癌マウス体内分布の結果、[¹²⁵I]Ang-1 及び 2 では血液中に高い放射能が認められるものの、腫瘍への高集積と生理的な血管新生が見られる子宮・卵巣への集積も確認された。血管新生イメージング薬剤としての可能性が高い[¹²⁵I]VEGF₁₂₁ との比較においても、同等の集積結果が得られた。一方、[¹²⁵I]FGF-1 及び 2 では腫瘍や子宮・卵巣への集積は認められなかった。以上の結果から、[¹²⁵I]VEGF₁₂₁ は血管新生を反映した腫瘍集積を示すことが確認され、加えて、新たに[¹²⁵I]Ang-1 及び 2 の腫瘍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

固形腫瘍が増殖するためには十分な栄養や酸素などを供給するための新たな血管の新生が必要である¹⁾。血管新生が様々な疾患に関与していることがわかっているが、最も研究が進んでいるのが腫瘍の血管新生である。腫瘍の血管新生は種々の段階を経て成立するため、各段階を制御することが可能であり、それらを阻害する化合物の作用メカニズムも明らかになっているものが多い²⁾。このことにより、血管新生の種々の段階をターゲットにした薬剤の開発が精力的に進められ、制癌剤としての候補化合物が臨床治験³⁻⁶⁾の段階に入っている。

腫瘍は血管新生促進因子を産生し、これらの物質が血管内皮細胞に作用することにより、血管新生を誘導する。血管新生は促進因子と抑制因子とのバランスによって調節されている。血管新生を生じさせるには、通常状態では抑制因子が優位であり血管新生は抑制されているため、誘導因子が抑制因子の作用を上回る必要がある^{7,8)}。これまでに調節因子として Ang、VEGF、FGF、HGF などが知られているが、血管新生の発生する部位や時期、あるいは生理的血管新生と病的血管新生との違いなどによって主体となる調節因子は異なっている。本研究では血管新生促進因子である VEGF、Ang-1、FGF ファミリーの FGF-1・FGF-2 及び血管新生抑制因子である Ang-2 に着目し、これらを標識母体とした腫瘍血管新生イメージング薬剤としての可能性について検討した。

II. [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ を利用した腫瘍血管新生イメージング

(1) 実験方法

a). [¹²⁵I]VEGF₁₂₁ の標識及び精製方法

VEGF₁₂₁(R&D systems;1µg/10µl 20mM リン酸緩衝液(pH7.2))の入ったチューブに 20mM リン酸緩衝液(pH7.2)を 50µl 加えた後、0.5mg/ml のクロラミン T を 50µl 加えて反応を開始させた。その後、一分間攪拌し、5mg/ml の二亜硫酸ナトリウムを 5µl 加えて反応を停止させた。[¹²⁵I]VEGF₁₂₁ の精製にはゲルろ過クロマトグラフィ(HiTrap Desalting column, Amersham)を用いた。標識後の溶液にカラムへの吸着を防ぐための界面活性剤 0.1%NP-40 (polyethyleneglycol-p-*io*octylphenyl ether, Calbiochem)を 500µl 加えてこの溶液の一部(0.5µl)を採取してペーパークロマトグラフィにて標識率を算出した。残りの溶液を 0.1%NP-40 で洗浄したカラムに通し、20mM リン酸緩衝液(0.8M NaCl, pH7.2)で溶出した。これを 0.5ml ずつ分取し、ペーパークロマトグラフィにて放射化学的純度を算出した。ペーパークロマトグラフ

イーには、専用の濾紙(No.51B, Advantec)を用い、展開溶液にはアセトン:アンモニア水=8:2の混合液を使用した。

b).担癌マウスの腫瘍内分布評価

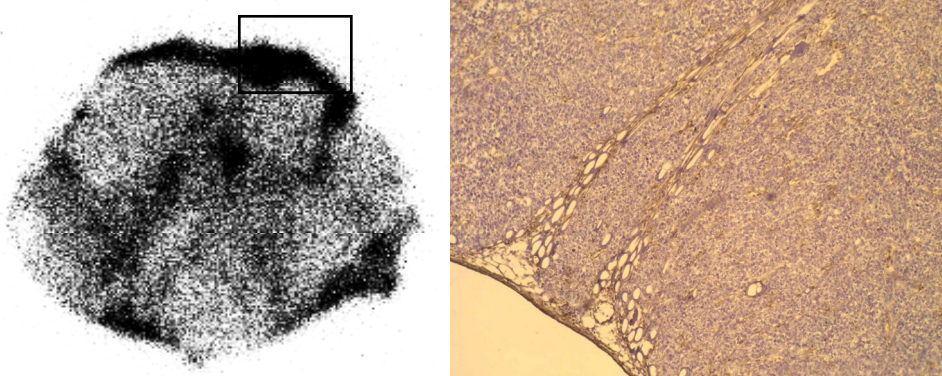
移植癌にはLS180(ヒト結腸腺癌)を用いた。LS180細胞数 5×10^6 個/100 μ lを、マウス(BALB/c nu/nu, ♀, 6週齢)左大腿部に移植し、7~10日経過した時点で実験を行った。 $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ を投与4時間後に腫瘍を摘出し、摘出した腫瘍をドライアイス・アセトンで凍結した後切片を作成し、イメージングプレートにコンタクトした後、BAS5000を用いて腫瘍内での分布を評価した。また、その分布を、CD34を用いて血管内皮細胞を免疫染色した細胞分布と比較した。

(2) 結果と考察

a).VEGF₁₂₁の¹²⁵I標識及び精製結果

標識率は76.7%、放射化学的純度は82.6~95.0%であった。

b).担癌マウスの腫瘍内分布評価の結果



左の図は摘出腫瘍組織のオートラジオグラフィ(ARG)の結果、右の図はARGで四角で囲った部位をCD34により血管内皮細胞を染色した結果を示している。特に、腫瘍辺縁部に $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ の高集積が確認できた。また、この様な高集積を示した部位はCD34により染まった部位とよく一致していた。これまでの報告で腫瘍辺縁部に血管内皮細胞が多く存在している⁹⁾ことがわかっており、その報告と比べてもこの実験結果は一致していた。

(3) 結論

このように、 $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ の腫瘍内分布実験から腫瘍辺縁を含む腫瘍内に不均一な高集積が確認され、さらにこの高集積部位がCD34の免疫染色による血管内皮細胞の分布と一致したことにより、VEGF₁₂₁の集積する部位には血管内皮細胞が存在していることが証明された。よって、 $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ の腫瘍血管新生イメージング薬剤としての有用性がより強くなった。

III. $[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 及び2、 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 及び2を利用した腫瘍血管新生イメージング

(1) 実験材料と実験方法

a).Ang-1及び2・FGF-1及び2の¹²⁵I標識及び精製

Ang-1・Ang-2(R&D systems)、FGF-1・FGF-2 (Peprotech EC)(1 μ g/10 μ l 20mMリン酸緩衝液(pH7.2))をそれぞれチューブに入れ、Ang-1、Ang-2のチューブには20mMリン酸緩衝液(pH7.2)を50 μ l加えた後、0.5mg/mlのクロラミンTを50 μ l加えて反応を開始させた。一方、FGF-1、FGF-2のチューブには50 μ lの0.1%NP-40を50 μ l加えた後、0.5mg/mlのクロラミンTを50 μ l加えて反応を開始させた。それぞれ一分間攪拌した後、5mg/mlの二亜硫酸ナトリウムを5 μ l加えて反応を停止させた。標識を終えた $[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 及び2・ $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 及び2にカラムへの吸着を防ぐ界面活性剤0.1%NP-40を500 μ l加えた。この溶液の一部(0.5 μ l)を採取し、ペーパークロマトグラフィにて標識率を算出した。残りの溶液を0.1%NP-40で洗浄したカラムに通し、20mMリン酸緩衝液(2M NaCl, pH7.2)で溶出した。 $[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 及び2の精製にはヘパリンカラム(HiTrap Heparin HP Column, Amersham)、 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 及び2の精製には、ゲルろ過クロマトグラフィ(HiTrap Desalting column, Amersham)を用いた。溶出液を0.5mlずつ分取し、ペーパークロマトグラフィにて放射化学的純度を算出した。ペーパークロマトグラフィには、専用の濾紙(No.51B, Advantec)を用い、展開溶液にはアセトン:アンモニア水=8:2の混合液を使用

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。LS180細胞数 5×10^6 個/100 μ lを、マウス(BALB/c nu/nu♀6週齢)左大腿部に移植し、実験に用いた。 $[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 及び $2 \cdot [^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 及び 2 を投与し、投与2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 μ l採血した。その後臓器を摘出し、湿重量を秤量後、オートウェルカウンタ(Aloka: ARC380)で血液及び臓器の放射能を計測した。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。

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

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

(2) 結果と考察

a).FGF-1及び $2 \cdot \text{Ang-1}$ 及び 2 の ^{125}I 標識及び精製の結果

	標識率(%)	放射化学的純度(%)
$[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$	65.3	90.3~94.7
$[^{125}\text{I}]\text{FGF-2}$	60.7	94.3
$[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$	89.6	86.7~93.7
$[^{125}\text{I}]\text{Ang-2}$	89.2	92.5~98.5

b).担癌マウスの体内分布結果

$[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{FGF-2}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-2}$ の体内分布の結果をTable 1に示す。比較のために $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ の結果も表に追加した。

Table 1. $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 及び 2 、 $[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 及び 2 の重量集積率

	$[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$	$[^{125}\text{I}]\text{Ang-2}$	$[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$	$[^{125}\text{I}]\text{FGF-2}$	$[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$
Blood	30.14 \pm 3.37	30.10 \pm 2.79	2.51 \pm 0.54	2.45 \pm 0.26	32.03 \pm 0.59
Tumor	6.43 \pm 0.27	4.84 \pm 1.13	1.21 \pm 0.30	1.56 \pm 0.48	9.12 \pm 0.98
Brain	0.79 \pm 0.05	0.81 \pm 0.10	0.19 \pm 0.08	0.16 \pm 0.03	0.70 \pm 0.08
Liver	6.07 \pm 0.69	5.14 \pm 0.48	1.93 \pm 0.32	2.96 \pm 0.51	5.49 \pm 0.44
Uterus	8.73 \pm 3.23	8.19 \pm 2.29	3.02 \pm 2.60	1.78 \pm 0.61	13.76 \pm 2.19
Ovary	9.44 \pm 0.94	9.40 \pm 2.61	1.22 \pm 0.27	1.39 \pm 0.19	9.66 \pm 3.97
Heart	7.79 \pm 1.04	7.70 \pm 1.38	0.87 \pm 0.20	0.98 \pm 0.15	8.39 \pm 0.41
Lung	14.61 \pm 0.83	11.61 \pm 0.85	1.88 \pm 0.48	2.32 \pm 0.11	13.31 \pm 2.05
Thyroid*	0.63 \pm 0.07	0.46 \pm 0.07	3.23 \pm 0.62	4.09 \pm 0.69	1.05 \pm 0.11
Stomach	5.49 \pm 0.70	5.36 \pm 0.51	12.82 \pm 5.68	21.22 \pm 3.84	8.81 \pm 1.87
Kidney	8.79 \pm 0.84	8.25 \pm 0.88	5.98 \pm 0.72	5.43 \pm 1.42	11.46 \pm 0.78
Pancreas	2.41 \pm 0.19	2.22 \pm 0.20	1.51 \pm 0.42	1.95 \pm 0.92	2.30 \pm 0.73
Spleen	4.46 \pm 0.31	4.39 \pm 0.59	1.46 \pm 0.33	1.94 \pm 0.35	5.90 \pm 1.36
Muscle	1.39 \pm 0.11	1.38 \pm 0.18	1.46 \pm 1.67	0.70 \pm 0.24	2.48 \pm 0.86
Bone	3.41 \pm 0.49	2.63 \pm 0.39	1.15 \pm 0.20	1.08 \pm 0.19	4.90 \pm 1.05
Intestine	3.36 \pm 0.25	3.32 \pm 0.35	2.44 \pm 0.51	2.53 \pm 0.43	3.84 \pm 0.36

*Thyroidに関しては組織集積率で評価した。

$[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 及び 2 では、血液中に多くの放射能の残留が認められるが、腫瘍への集積があり、さらに生理的に血管新生が起こることが知られている子宮・卵巣への集積も認められた。また、筋肉への集積は認められなかった。 VEGF_{121} と比較するとほとんど同程度の腫瘍・子宮・卵巣への集積が認められた。 $[^{125}\text{I}]\text{FGF-1}$ 及び 2 は、 $[^{125}\text{I}]\text{Ang}$ や $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ と比較して血液中の放射能は低かったが、標的臓器である腫瘍への集積は低く、生理的な血管新生が起こる子宮・卵巣への集積も認められなかった。また、顕著に胃へ集積していることがわかり、原因として一部には、脱ヨウ素化の進行が考えられた。

Table 2 に $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ 、2 及び $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ の腫瘍正常組織比を示す。 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1,2}$ のどちらも $[^{125}\text{I}]\text{VEGF}_{121}$ と比較すると、肝臓や脾臓において多少は劣る部分も見られるが、他の主要臓器で 1.0 以上の腫瘍正常組織比を示しており、同等の結果が得られていることがわかる。

Table 2. Tumor to non-tumor ratio

	Ang-1	Ang-2	VEGF ₁₂₁
Blood	0.21	0.16	0.28
Liver	1.06	0.94	1.66
Uterus	0.74	0.59	0.66
Ovary	0.68	0.51	0.94
Heart	0.83	0.63	1.09
Lung	0.44	0.42	0.69
Stomach	1.17	0.90	1.04
Kidney	0.73	0.59	0.80
Pancreas	2.67	2.18	3.97
Spleen	1.44	1.10	1.55
Muscle	4.61	3.51	3.68
Bone	1.88	1.84	1.86
Intestine	1.91	1.45	2.38

(3) 結語

本検討により、 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-1}$ を利用した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。また、血管新生抑制因子 $[^{125}\text{I}]\text{Ang-2}$ も同程度の有用性が見出されたことから、血管新生促進因子 (VEGF₁₂₁・Ang-1) だけでなく、今まであまり注目されていなかった血管新生抑制因子を利用して血管新生イメージング薬剤を開発できるさらなる可能性が見出された。

IV. 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。

V. 参考文献

- 1) Folkman, J. Tumor angiogenesis, therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186, 1971
- 2) 渋谷正史: 血管研究の最前線に迫る. 羊土社, pp72-81, 2000
- 3) Zhang, H-T. and Harris, A.L. Anti-angiogenic therapies in cancer clinical trials. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7: 1629-1655, 1998
- 4) Mousa, S.A. Mechanisms of angiogenesis in vascular disorders, potential therapeutic targets. *Drugs of the future.* 23: 51-60, 1998
- 5) Nelson, N.J. Inhibitors of angiogenesis, enter phase III testing. *J. Nat. Cancer Inst.* 90: 960-963, 1998
- 6) 鈴木日出夫: 血管新生阻害剤と癌の抑制. *実験医学*, 17: 747-752, 1999
- 7) 室田誠逸 井藤英喜: 血管新生のメカニズムと疾患. 医学ジャーナル社, 1997
- 8) 室田誠逸 佐藤靖史: 血管新生研究の新展開. 医学ジャーナル社, 2000
- 9) Balbay, M.D., Pettaway, C.A., Kuniyasu, H., Inoue, K., Ramirez, E., Li, E., Fidler, I.J., and Dinney, C.P.N. Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *5: 783-789, 1999*