

0713 腫瘍診断用放射性医薬品の腫瘍細胞への集積に対する血管新生阻害剤の効果

佐賀 友輔

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助教)

要旨：腫瘍細胞は増殖因子やサイトカインなどを放出し、増殖に必要な酸素や栄養などを確保するために血管新生を引き起こす。血管新生は腫瘍の増殖や転移に密接に関与しているため、様々な血管新生阻害剤の開発研究が進められている。本研究では、ヒト大腸癌細胞 (LS180) を用いて、血管新生阻害剤である thalidomide, 2-methoxyestradiol (2-ME), SU5416 の増殖阻害効果を調べると共に、各阻害剤の腫瘍診断用放射性医薬品の腫瘍集積性への影響を 2-deoxy-D-[2,6-³H]-glucose (DG), [methyl-³H]-3'-fluorodeoxy-thymidine (FLT), [S-methyl-¹⁴C]-L-methionine (Met) を用いてインビトロ実験により検討した。

細胞集積阻害実験において thalidomide, SU5416 は、どのトレーサーにおいても顕著な集積低下を示さなかったが、2-ME 10 μ M 負荷では FLT においてのみ、約 27% の集積低下が観察された。集積への影響を示さなかった thalidomide, SU5416 では LS180 細胞の増殖に対する影響は見られなかった。一方、2-ME 10 μ M 負荷では増殖阻害効果が確認された。これらの結果から血管新生阻害剤の中でも、2-ME のみが直接的な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、FLT により、2-ME の抗腫瘍効果を検出できる可能性が示された。

I. はじめに

腫瘍細胞の大きな特徴として高い増殖能を持つことが知られている。そのため、腫瘍は増殖し巨大化するにつれて、既存の血管だけでは増殖に必要な栄養や酸素を供給できなくなる。腫瘍細胞はそれを補う手段として周囲の血管を刺激することにより新たな血管を誘導し(血管新生)、新生血管から栄養や酸素を確保する。近年、血管新生を阻害する血管新生阻害剤の開発、抗腫瘍薬としての応用研究が進められているが、現在の治療効果判定法は腫瘍の形態変化の観察などが用いられていることから、効果判定に時間がかかる。そのため、早期に治療効果判定が行える診断方法の開発が望まれている。本研究では、ヒト大腸癌細胞(LS180)を用いて、血管新生阻害剤である thalidomide, 2-methoxyestradiol (2-ME) , SU5416 の増殖阻害効果を調べると共に、各阻害剤の腫瘍診断用放射性医薬品の腫瘍集積性への影響をインビトロ実験により観察し、腫瘍細胞に対する血管新生阻害療法の効果判定の可能性を検討した。

II. 細胞増殖曲線

a)実験材料および実験方法

血管新生阻害剤には、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)の分泌、内皮細胞の管腔形成を阻害する thalidomide¹⁾ (Sigma), 血管内皮細胞の増殖・遊走阻害や腫瘍細胞のアポトーシスを促進する 2-methoxyestradiol²⁾ (2-ME, Sigma), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)のチロシンキナーゼを特異的に阻害する SU5416³⁾(Sigma)を用いた。

LS180 は 10% fetal bovine serum (FBS)を含む Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma) で培養した。これらを細胞数が 5×10^4 個/well になるように、細胞培養用 24well プレート(Falcon) に播き、5%CO₂, 37°Cで 24 時間培養した。その後、最終濃度が 0.1, 1, 10 μ M になるように調整した thalidomide, 2-ME, SU5416 を加え、24, 48, 72 時間培養した。MEM を除去し、phospho-buffered saline (PBS)で洗浄した後、トリプシンを用いて細胞を剥離し、細胞数を測定した。なお、本実験では、血管新生阻害剤を溶かす際の溶媒として dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いたため、DMSO(最終濃度 0.5%)のみを加えたものを control として実験を行った。

b)結果と考察

Fig.1 に thalidomide, 2-ME, SU5416 の細胞増殖に対する影響を調べた結果を示す。10 μ M の 2-ME で顕著な増殖阻害を示したが、thalidomide や SU5416 では細胞増殖の抑制を観察することが出来なかった。これは、腫瘍細胞に対しアポトーシス効果を持つ 2-ME に比べ、thalidomide が VEGF 分泌阻害剤であるため、LS180 に対し直接的な増殖阻害効果を表さなかったことが考えられた。また SU5416 が VEGFR2 チロシンキナーゼを特異的に阻害する薬剤であり、今回用いた LS180 には VEGFR2 が発現していないとされている⁴⁾ことから、細胞増殖に影響が見られなかったと考えられた。

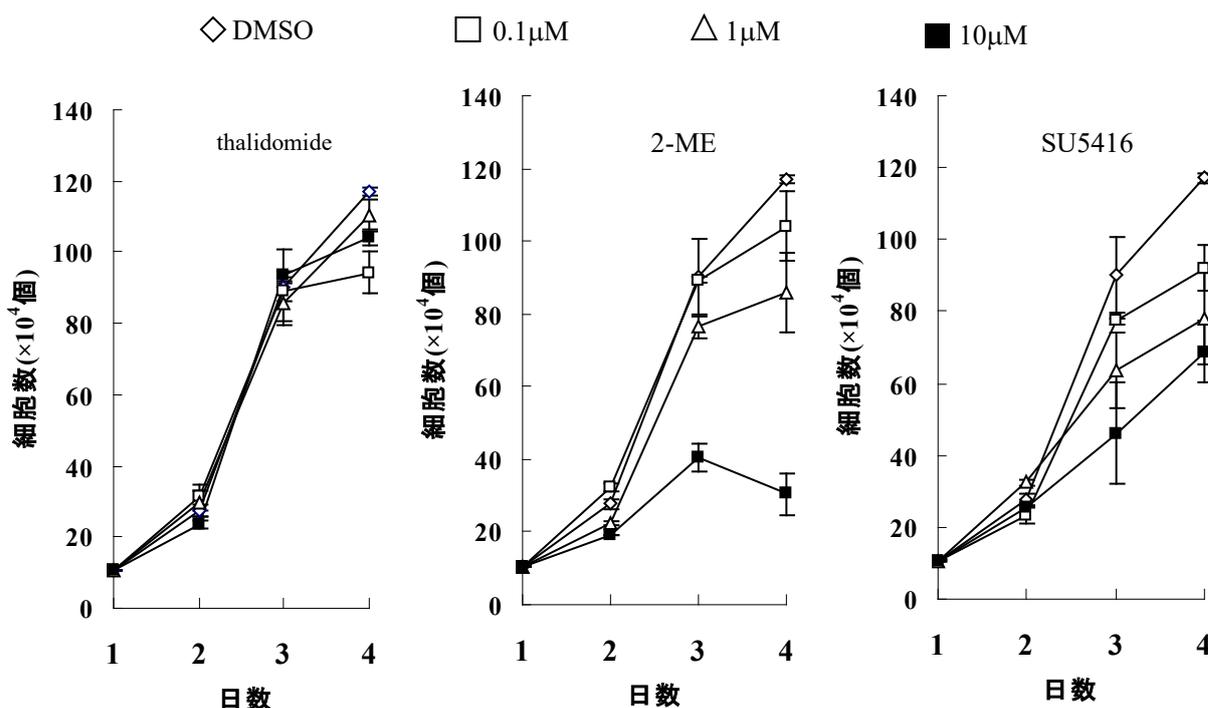


Fig.1 血管新生阻害剤の細胞増殖曲線に対する影響

III. トレーサーの取り込み実験

a)実験材料および実験方法

今回使用する腫瘍診断用放射線医薬品として、細胞の増殖に密接に関与する代謝機能である糖代謝、タンパク質合成、核酸合成をそれぞれ反映する 2-deoxy-D-[2,6-³H]-glucose⁵⁾ (DG, Amersham), [methyl-¹⁴C]-L-methionine⁶⁾ (Met, Amersham), [methyl-³H]-3'-fluoro-deoxythymidine⁷⁾ (FLT, Moravek Biochemicals)を用いた。

LS180 は 10% FBS を含む MEM で培養した。これらを細胞数が 5×10^4 個/well になるように、細胞培養用 24well プレートに播き、5%CO₂, 37°C で 24 時間培養した。その後、II と同様に thalidomide, 2-ME, SU5416 を薬剤の最終濃度が 0.1, 1, 10 μ M となるように加え、さらに 24 時間培養した。それから培養液を取り除き、DG, Met をそれぞれ 0.5 μ Ci 含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium:DMEM (DG/Met-DMEM), 又は FLT, Met をそれぞれ 0.5 μ Ci 含む DMEM (FLT/Met-DMEM) を 500 μ L/well ずつ加え、1 時間インキュベートした。DG/Met-DMEM と FLT/Met-DMEM を除去し、PBS で洗浄した後、トリプシンを用いて細胞を剥離した。細胞数を測定した後、0.2N NaOH で細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンタ LSC-5100 (Aloka) で放射能を測定した。

b)結果と考察

Fig.2, Fig.3, Fig.4 にそれぞれ DG, Met, FLT の LS180 への集積に対する血管新生阻害剤の影響を示す。すべての濃度においてthalidomide, SU5416 は DG や Met, FLT の集積に対し、影響を示さなかった。この原因として、thalidomide, SU5416 の両方とも腫瘍細胞に対し、直接的な抗腫瘍効果を持たない薬剤であるため、細胞の糖代謝、タンパク質合成、核酸合成などの増殖に密接に関与する代謝機能に影響を与えなかったものと考えられた。

一方、2-ME は、10 μ M を負荷したときのみ、FLT の取り込みが control に比べ約 27% の集積低下を示した。2-ME が腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を持つ薬剤であること、また細胞増殖に最も密接に関係する代謝機能が核酸合成であることから、DG, Met, FLT の中でこの機能を反映する FLT で最も顕著に影響が現れたと考えられた。この結果、今回の条件下では FLT でのみ細胞増殖に対する 2-ME の効果を評価できることが示された。

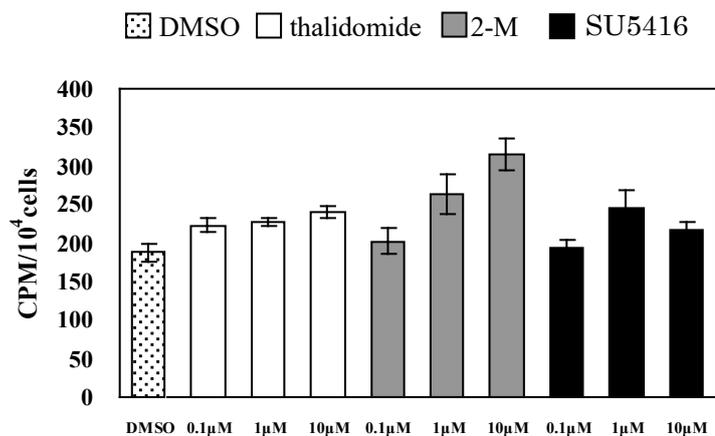


Fig.2.血管新生阻害剤の DG 集積に対する影響

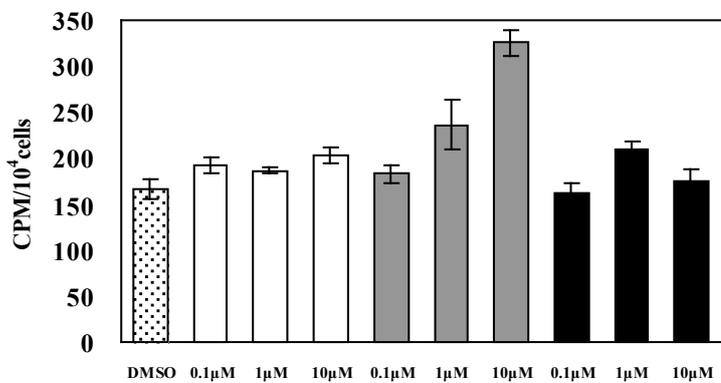


Fig.3 血管新生阻害剤の Met 集積に対する影響

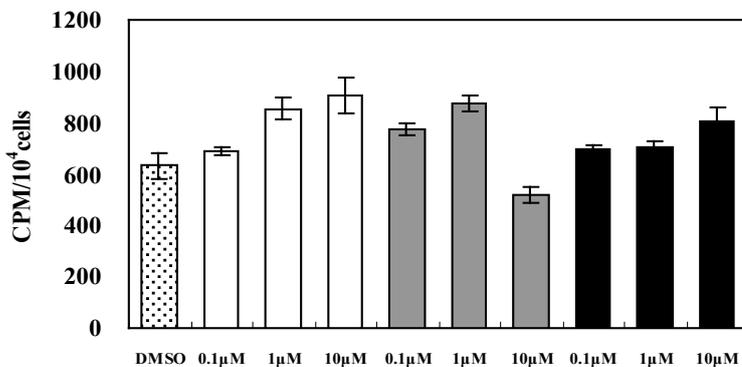


Fig.4 血管新生阻害剤の FLT 集積に対する影響

III. 結語

細胞増殖阻害実験において、2-ME 10 μ M 負荷時に腫瘍細胞の増殖阻害効果が見られた。また、トレーサー集積実験においても、2-ME 10 μ M 負荷においてのみ FLT の集積低下が見られた。よって FLT の腫瘍細胞集積率を指標として、2-ME の抗腫瘍効果が検出できる可能性が示された。また血管新生阻害剤が基本的に血管内皮細胞を標的としていることから、インビボにおいて血管新生阻害剤の効果を検討する際に適した腫瘍細胞は、その細胞自身が直接血管新生阻害剤による影響を受けないものが望ましい。よって thalidomide や SU5416 など細胞増殖や集積に影響が見られなかった LS180 は、インビボでの血管新生阻害剤の効果を検討する腫瘍モデルとして適していると考えられた。今後、LS180 担癌モデルマウスにおいて、thalidomide や SU5416 の増殖阻害効果に対する腫瘍診断用放射性医薬品の腫瘍集積への影響について検討する必要がある。

IV. 謝辞

本研究を終えるに当たりご指導いただきました、川井恵一教授、吉本光喜助教、ならびにご協力いただいた本研究室の皆様から心から感謝いたします。

V. 参考文献

- 1) Komorowski J, Jerczynska H, Siejka A, Baranska P, Lawnicka H, Pawloeska Z, Stepień H: Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. *Life Sci.* 2006; 78(10): 2558-2563.
- 2) Mooberry SL: Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drug Resist Updat.* 2003; 6(10): 355-361.
- 3) Mendel DB, Schreck RE, West DC, Li G, Strawn LM, Tanciongco SS, Vasile S, Shawver LK, Cherrington JM: The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(12): 4848-4858.
- 4) Asano M, Yukita A, Suzuki H: Wide spectrum activity of a neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *Jpn J Cancer Res.* 1999; 90(1): 93-100.
- 5) Waki A, Fujibayashi Y, Yokoyama A: Recent advances in the analyses of the characteristics of tumors on FDG uptake. *Nucl Med Biol.* 1998; 25(7): 589-592.
- 6) Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC, Jager PL, Hoeksma HJ, Elsinga PH: [¹⁸F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004; 31(12): 1659-1672.
- 7) Vaalburg W, Coenen HH, Crouzel C, Elsinga PH, Langstrom B, Lemaire C, Meyer GJ: Amino acids for the measurement of protein synthesis in vivo by PET. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1992; 19(2): 227-237.