

0712 血管内皮細胞に対する血管新生阻害剤の増殖阻害効果と 腫瘍診断用放射性医薬品の集積性との関連

中村 菜穂

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助教)

要旨：腫瘍血管新生は、腫瘍細胞から分泌される血管新生増殖因子などにより刺激された血管内皮細胞が、増殖・遊走などを引き起こすことにより新たな血管を形成する一連のプロセスから成る。血管新生阻害剤はこのプロセスの一部に作用することで血管新生を阻害する薬剤である。そのため、従来の抗癌剤と異なり、多くの血管新生阻害剤は血管内皮細胞を標的としている。この血管新生阻害剤の効果判定を腫瘍診断用放射性医薬品により行なう方法が検討されているが、腫瘍診断用放射性医薬品は腫瘍細胞を標的としている。従って、内皮細胞への腫瘍診断用放射性医薬品の集積を調べ、治療効果判定に応用できるかどうかを評価する必要がある。

本研究では、腫瘍診断用放射性医薬品の血管内皮細胞への集積性を調べると共に、血管新生阻害剤による集積への影響を評価した。腫瘍診断用放射性医薬品として、それぞれ糖代謝、核酸合成、タンパク質合成を反映する2-deoxy-D-[2, 6-³H]-glucose (DG), [methyl-³H]-3'-fluorodeoxythymidine (FLT), [S-methyl-¹⁴C]-L-methionine (Met)を選択し、血管新生阻害剤には、thalidomide, 2-methoxyestradiol (2-ME), SU5416を用いた。

細胞集積実験の結果、2-ME, SU5416では、濃度依存的にDG, FLT, Metの集積が低下する傾向が見られた。さらに、2-ME, SU5416は明らかな増殖阻害効果を示した。このことから、DG, FLT, Metは、2-ME, SU5416などの血管内皮細胞の増殖に影響する血管新生阻害剤の治療効果判定に利用できる可能性が示された。

I. はじめに

腫瘍細胞の増殖には、酸素や栄養素が必要であり、それらを十分に供給する血管が必要不可欠である。腫瘍細胞は血管新生促進因子などを分泌することにより新たな血管を誘導し(血管新生)¹⁾、血管から栄養素などを得ようとする。近年、この血管新生を阻害することで、腫瘍細胞の増殖を抑える血管新生阻害療法が注目されている。現在、多様な血管新生阻害剤が開発され、臨床研究が進められている。多くの血管新生阻害剤は、従来の抗癌剤と異なり、血管内皮細胞を標的としているため、腫瘍に対する直接的な殺細胞効果を有していない。そのため、腫瘍組織の形態変化の観察により治療効果判定を行う場合、血管新生阻害療法による治療効果判定には時間を要するため、早期に治療効果判定が出来る方法が必要とされている。

本研究では、腫瘍診断用放射性医薬品による治療効果判定の可能性を検討することを目的とし、腫瘍診断用放射性医薬品の中でも細胞増殖に密接に関係する代謝機能である糖代謝、核酸合成、タンパク質合成をそれぞれ反映する 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose²⁾ (¹⁸F-FDG), 3'-[¹⁸F]fluoro-deoxythymidine³⁾ (¹⁸F-FLT), [S-methyl-¹¹C]-L-methionine⁴⁾ (¹¹C-Met)の血管内皮細胞への集積性と血管新生阻害剤による集積への影響を調べた。

II. 血管新生阻害剤による細胞増殖抑制効果の検討

A) 実験材料と方法

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・管腔形成抑制を示す thalidomide⁵⁾ (Sigma), 細胞増殖抑制・腫瘍細胞のアポトーシス抑制を示す 2-methoxyestradiol⁶⁾ (2-ME ; Sigma), VEGF レセプター2 のチロシンキナーゼを特異的に阻害する SU5416⁷⁾ (Sigma) を用いた。

実験には、血管内皮細胞として、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用した。細胞数が 5×10^4 個/well となるように、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。添加後の薬剤濃度を 0.1, 1.0, 10 μ M に調整した血管新生阻害剤をそれぞれ加え、さらに 24, 48, 72 時間培養した。培養液を除去し、PBS で洗浄の後、トリプシンを加え、それぞれの細胞数を数えて細胞増殖曲線を作成した。今回の実験では薬剤の溶媒として DMSO を用いたため、最終濃度 0.5% の DMSO を加えたものをコントロールとして評価を行なった。

B) 結果と考察

各血管新生阻害剤による細胞増殖の影響を調べた結果を Fig.1 に示す。2-ME, SU5416 で濃度依存的な細胞増殖抑制がみられた。2-ME, SU5416 は、血管内皮細胞に対し細胞増殖抑制効果を示す^{6,7)}ことが報告されており、その効果が確認された。一方、thalidomide は、細胞増殖に対する影響を示さなかった。Thalidomide は、VEGF の分泌抑制により血管新生を阻害する薬剤であるため、細胞に直接的な増殖抑制効果を有していないと考えられた。

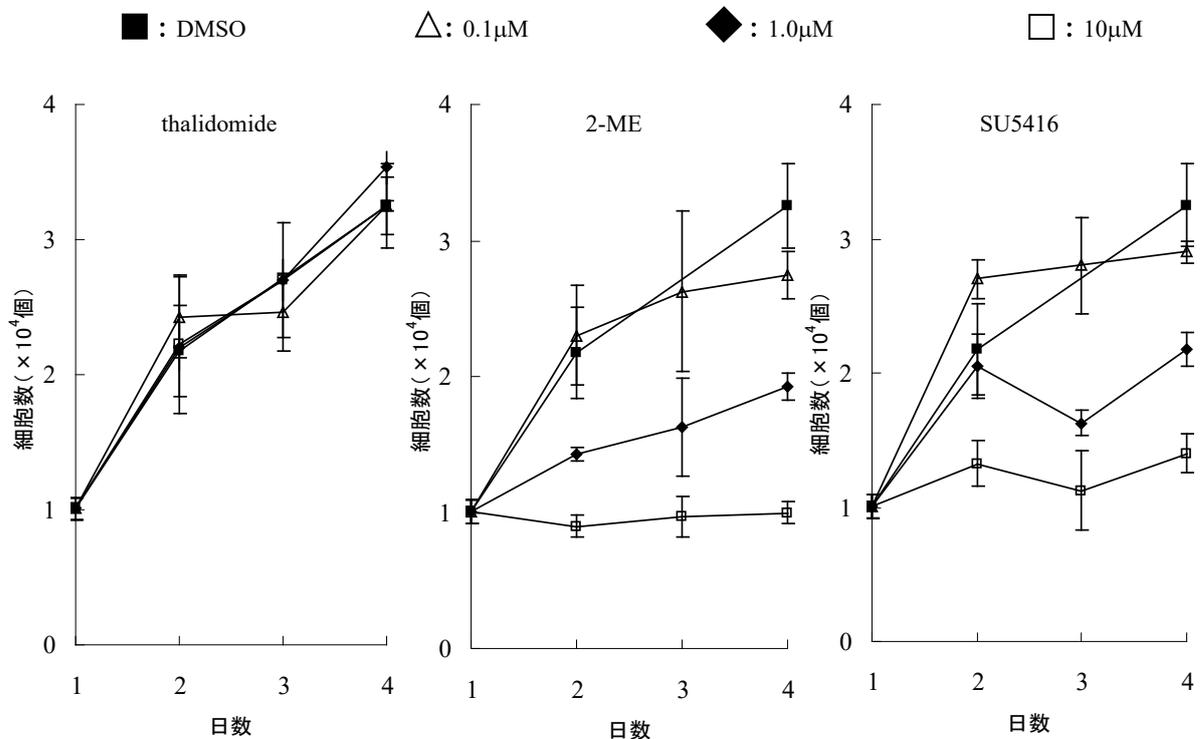


Fig.1 血管内皮細胞の増殖曲線に対する血管新生阻害剤の影響

III. 腫瘍診断用放射性医薬品の細胞集積阻害実験

A) 実験材料と方法

腫瘍診断用放射性医薬品には ^{18}F -FDG, ^{18}F -FLT, ^{11}C -Met を想定し, 基礎実験において汎用性のある 2-deoxy-D-[2, 6- ^3H]-glucose (DG, Amersham), [methyl- ^3H]-3'-fluorodeoxythymidine (FLT, Moravek Biochemicals), [methyl- ^{14}C]-L-methionine (Met, Amersham) を使用した. 血管新生阻害剤には, II と同様に thalidomide, 2-ME, SU5416 を用いた.

HUVEC は添加因子セット (FBS, hydrocortisone, hFGF, VEGF, R-IGF-1, ascorbic, hEGF, GA-1000, heparin ; Lonza) を含む endothelial cell basal medium-2 (EBM-2 ; Lonza) で培養した. これらを細胞数が 5×10^4 個/well となるように, 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, 添加後の薬剤濃度を 0.1, 1.0, 10 μM に調整した血管新生阻害剤をそれぞれ加え, さらに 24 時間培養した. 培養液を取り除き, DG, Met をそれぞれ 0.5 μCi 含んだ EBM-2 (DG/Met-EBM), または FLT, Met をそれぞれ 0.5 μCi 含んだ EBM-2 (FLT/Met-EBM) を 500 μL /well ずつ加え, 1 時間インキュベートした. DG/Met-EBM, FLT/Met-EBM を除去し, phosphate-buffered saline (PBS) での洗浄後, 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, 0.2M の NaOH で細胞を溶解し, 液体シンチレーションカウンター LSC-5100 (Aloka) で放射能を測定した. 今回の実験では薬剤の溶媒として DMSO を用いたため, 最終濃度 0.5% の DMSO を加えたものをコントロールとして評価を行なった.

B) 結果と考察

DG, FLT, Met の血管内皮細胞への集積を Fig.2, 3, 4 に示す. コントロールである DMSO について比較すると, 全ての腫瘍診断用放射性医薬品において血管内皮細胞への集積が見られることから, 腫瘍診断用放射性医薬品が血管内皮細胞に集積することが確認された. また, FLT は DG に比較して 5.3 倍, Met に対しては 5.9 倍の集積が確認され, 血管内皮細胞への集積が DG, Met より多いことが示された.

加えて DG, FLT, Met の集積が 2-ME, SU5416 負荷により濃度依存的に低下する傾向が見られた. II の細胞増殖実験の検討から, 2-ME, SU5416 は血管内皮細胞に対し細胞増殖抑制効果を示すことが確認された. このことから, 糖代謝・核酸合成・タンパク質合

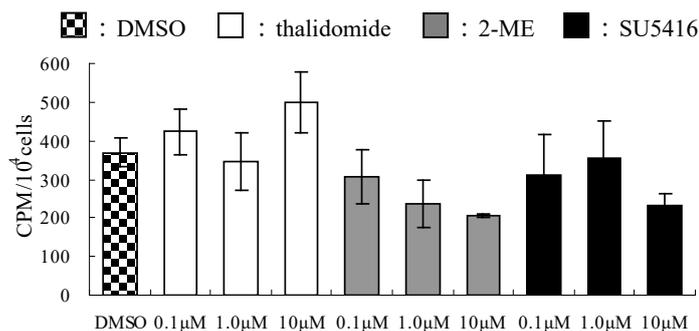


Fig.2 DG の血管内皮細胞への集積に対する血管新生阻害剤の影響

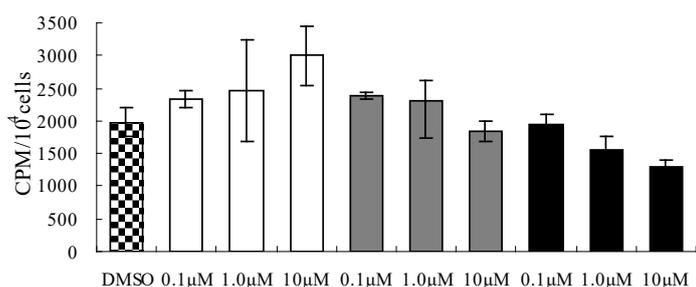


Fig.3 FLT の血管内皮細胞への集積に対する血管新生阻害剤の影響

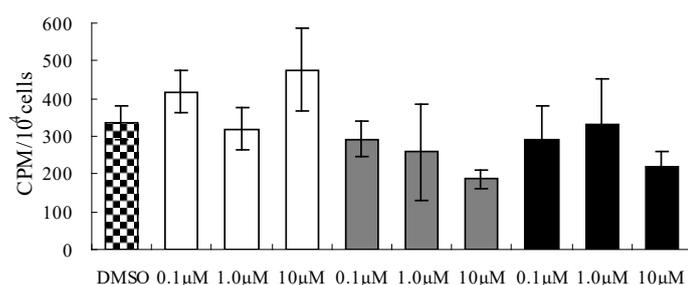


Fig.4 Met の血管内皮細胞への集積に対する血管新生阻害剤の影響

成など細胞増殖に関係する代謝機能の低下が起こり、集積に影響が出たものと考えられた。

一方、thalidomide は、集積に影響を示さなかった。thalidomide は、VEGF の分泌を抑制することにより血管新生を阻害するため、2-ME、SU5416 のように血管内皮細胞の増殖に直接作用することにより血管新生阻害を示さない。そのため、thalidomide は著しい代謝機能低下を引き起こさず、その結果、集積への影響を示さなかったと考えられた。

IV. 結語

腫瘍診断用放射性医薬品の血管内皮細胞への集積阻害実験の結果、DG, FLT, Met を用いた 2-ME, SU5416 の効果判定の可能性が示された。また、FLT の血管内皮細胞への集積量が DG, Met に比べ大幅に多いことに加え、血管内皮細胞に直接作用する SU5416 の血管新生阻害効果を反映できることから、FLT が血管新生阻害剤の効果判定に最適であると考えられる。

しかしながら、腫瘍組織は主に腫瘍細胞から構成されており、腫瘍細胞に比べ血管内皮細胞の数は少ない。今後は担癌モデルマウスを用いたインビボでの検討により、血管新生阻害剤による腫瘍診断用放射性医薬品の腫瘍集積に対する効果を評価する必要があると考えられる。

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、吉本光喜助教、ご協力いただいた本研究室の方々に心より感謝いたします。

VI. 参考文献

- 1) 渋谷正史 編集: 血管研究の最前線に迫る: 羊土社, 2000, p66.
- 2) 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.
- 3) Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH : [¹⁸F]FLT-PET in oncology : current status and opportunities. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004; 31(12): 1659-1672.
- 4) 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.
- 5) Komorowski J, Jerczynska H, Siejka A, Baranska P, Lawnicka H, Pawlowska 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.
- 6) Mooberry SL: Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. Drug Resist Updat. 2003; 6(10): 355-361.
- 7) 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.