

学 位 論 文 題 名

Anti-angiogenic Treatment for Peritoneal Dissemination of Pancreas Adenocarcinoma: A Study Using TNP-470

(膵腺癌腹膜播種に対する抗血管新生療法： TNP-470 を用いた研究)

学位論文内容の要旨

I. 目的

腫瘍血管新生の重要性は、主に血行性転移において研究され認識されているが、腹膜播種形成においては、いまだ報告は少なく十分に明らかにされていない。

膵癌患者の腹膜播種結節は、組織学的に血管新生を伴う腫瘍細胞の増殖から成っており、腫瘍血管新生の抑制は腹膜播種形成を抑制する可能性がある。本研究の目的は、ヒト膵癌細胞株より高腹膜播種亜株を樹立してその細胞学的特性を解析し、さらに腹膜播種モデルを作成して腹膜播種に対し血管新生阻害が有効かどうかを検討することである。

II. 材料と方法

1. 材料

動物は雌ヌードマウス (BALB/c, nu/nu) 4 - 6 週齢 (日本クレア) を使用、すべてのマウスは、北海道大学医学部附属動物実験施設の無菌バリア室にて飼育した。食餌・水分は γ 線滅菌したものを使用した。ヒト膵癌細胞株 (PCI-43) は当科膵癌患者の手術時に得られた組織から本学第一病理学教室にて樹立、維持されたものを使用した。

2. ゼラチンザイモグラフィによる MMP-2/MMP-9 の検出

PCI-43 細胞を無血清培地で 24 時間培養した上清を用い 0.1%ゼラチン (Difco) 含有 10% ポリアクリルアミドゲル上にて電気泳動し展開し解析した。

3. VEGF 産生能の解析

PCI-43 及び-43p3 の無血清培養上清 (48 時間) と ELISA kit (Genzyme) を使用した。また、RT-PCR による VEGF mRNA の発現は、培養細胞から Isogen (Nippon Gene) を用い RNA を抽出し、primer は The sense primer, 5'-TCCAGGAGTACCCTGATGAG-3', anti-sense primer, 5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3' を使用した。

4. PCNA 染色

一次抗体として抗 PCNA マウスモノクローナル抗体 (DAKO) 及び LSAB キット (DAKO) を使用

した。癌細胞核がびまん性に染色されたものを陽性とした。PCNA Index は、500 以上の腫瘍細胞核をカウントし、その陽性率で示した。

5. 血管新生阻害剤

TNP-470 は、武田薬品より供与されたものを使用した。

6. 腹膜播種モデル

以下の3つの群で実験を行った。TNP-long-treatment 群は、 1×10^7 PCI-43p3 を腹腔内接種し、当日より TNP-470, 30mg/kg を隔日で4週間皮下注した。TNP-short-treatment 群は、PCI-43p3 の腹腔内接種2週後に TNP-470 皮下注を開始し、2週間隔日で行った。Control 群は、TNP-470 なしの vehicle を4週間皮下注した。いずれも28日目に犠牲死させ、腸間膜に形成された播種結節を評価した。結節は、個数及び最大径を測定し、組織学的にその存在を確認した。

7. 統計解析

すべて対応なしの t 検定を用い施行、triplicate、p 値 0.05 未満を有意差有りと判定した。

III. 結果

1. ヒト膀胱癌細胞株 PCI-43 をヌードマウスに腹腔内接種し、この in vivo selection を3回繰り返すことにより高腹膜播種株 PCI-43p3 を樹立した。この高腹膜播種株は、親株に比べ高い腹膜播種形成能を有していた。また、MMP-9 の発現亢進、VEGF 産生能の亢進が見られた。しかし、VEGF の mRNA レベルでは発現に差はみられなかった。

2. 血管新生阻害剤 TNP-470 を投与したマウスの実験系で、投与期間依存性に腹膜播種形成が有意に抑制された。PCNA 染色で、TNP-470 を投与した群で、腫瘍細胞の増殖能が有意に抑制された。

IV. 考察

本研究では、高腹膜播種株において VEGF 産生能の亢進、MMP-9 の発現亢進が見られた。VEGF は、多くの臨床的または基礎的癌研究でその産生能亢進が報告されており、腫瘍の遠隔転移のステップに重要であることが示されている。今回、高腹膜播種株で VEGF の産生亢進が見られたことから、VEGF がマウス血管内皮細胞に作用し腫瘍血管新生に効果的に働いたと考えられる。MMP-9 は、活性の強いマトリックス分解酵素で親株である PCI-43 には見られず、高播種株 PCI-43p3 にその発現が見られたことから播種形成に関与していることが示唆された。血管新生阻害剤 TNP-470 は、本実験系で有意に腹膜播種を抑制した。しかも、投与期間依存性で結節数及び腫瘍径も抑制した。一方、TNP 投与群では、PCNA 染色で腫瘍細胞の増殖能が抑制されていることがわかった。TNP-470 は、腫瘍細胞の VEGF 産生能、中皮細胞接着能に影響を与えないこと、また、in vitro の実験系で PCI-43 の増殖能に影響しないことから考えあわせて、この抑制効果は、主に宿主血管内皮細胞に作用する血管新生阻害によるものと考えられる。このことは、我々の既報にあるマウス皮下チャンバー

を用いた血管新生阻害の結果からも支持されるものである。

V. 結語

1. 腹膜播種形成において MMP-9 の亢進、VEGF 産生亢進が関与していることが示唆された。
2. 血管新生阻害は腹膜播種の抑制効果があり、今後肺癌の有効な治療法のひとつとして期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Anti-angiogenic Treatment for Peritoneal Dissemination of Pancreas Adenocarcinoma: A Study Using TNP-470

(膵腺癌腹膜播種に対する抗血管新生療法：TNP-470を用いた研究)

腫瘍血管新生の重要性は、主に血行性転移において研究され認識されているが、腹膜播種形成においては、いまだ報告は少なく十分に明らかにされていない。膵癌患者の腹膜播種結節は、組織学的に血管新生を伴う腫瘍細胞の増殖から成っており、腫瘍血管新生の抑制は腹膜播種形成を抑制する可能性がある。本研究では、ヒト膵癌細胞株より高腹膜播種亜株を樹立し、さらに腹膜播種モデルを作成して腹膜播種に対し血管新生阻害が有効かどうかを検討した。

動物は雌ヌードマウス(BALB/c, nu/nu) 4 - 6 週齢 (日本クレア) を使用した。ヒト膵癌細胞株(PCI-43)は腫瘍外科膵癌患者の手術時に得られた組織から病態分子病理教室にて樹立、維持されたものを使用した。高腹膜播種株 PCI-43p3 は、親株 PCI-43、 1×10^7 個をヌードマウスに腹腔内接種し、腸間膜に形成された播種結節を摘出、*in vitro* で培養し、さらに腹腔内注入する操作を3回繰り返し樹立した。この PCI-43p3 株の腹膜播種形成能、中皮細胞への接着能を検討した。また、ゼラチンザイモグラフィーによる MMP-2/ MMP-9 産生能、ELISA kit 及び RT-PCR 法による VEGF 産生能の解析も行った。PCI-43p3 を用いたマウス腹膜播種モデルでの抗血管新生療法の検討は、以下の3群で実験を行った。Group 1 は、 1×10^7 PCI-43p3 を腹腔内接種し、当日より TNP-470、30mg/kg を隔日で4週間皮下注した。Group 2 は、PCI-43p3 の腹腔内接種2週後に TNP-470 皮下注を開始し、2週間隔日で投与した。Control 群は、TNP-470 なしの vehicle を4週間皮下注した。いずれも28日目に犠牲死させ、腸間膜に形成された播種結節を評価した。結節は、個数及び最大径を測定し、組織学的にその存在を確認した。また、播種結節の腫瘍の増殖能を、PCNA 染色にて検討した。TNP-470 の副作用としての体重変化についても検討した。さらに、TNP-470 の作用機序を明らかにする目的で、PCI-43p3 の中皮細胞への接着能に及ぼす影響を検討した。

その結果、樹立された高腹膜播種株 PCI-43p3 は、親株に比べ高い腹膜播種形成能及び中皮細胞への高い接着能を有していた。また、MMP-9 の発現亢進、VEGF 産生能の亢進が見られた。しかし、VEGF の mRNA レベルでは発現に差はみられなかった。マウス腹膜播種モデルでの検討では、血管新生阻害剤 TNP-470 を投与した群で、投与期間依存性に腹膜播種形成が有意に抑制された。PCNA 染色を用いた検討では、TNP-470 投与群で腫瘍細胞の増殖能が有意に抑制された。TNP-470 は、PCI-43p3 の中皮細胞への接着能に

影響を与えず、また腫瘍細胞の増殖能、VEGF 産生能に影響を及ぼさないこと、*in vivo* の実験系で PCI-43 の誘導する血管新生を抑制することから、この抑制効果は、主に担癌宿主の血管内皮細胞に作用する血管新生阻害によるものと考えられた。また、副作用として TNP-470 長期投与した群で体重増加の抑制が見られた。以上の結果より、腹膜播種形成において MMP-9 の亢進、VEGF 産生亢進が関与していることが示唆された。また、血管新生阻害は腹膜播種の抑制効果があり、今後膵癌患者の予後改善に有効な治療法のひとつに成りうると考えられた。

口頭発表において、副査の加藤紘之教授より PCI-43p3 株を用いたモデルで実験を行った意義について、臨床の場において免疫力が低下した終末期の患者における血管新生阻害剤投与の意義について、播種以外の転移に対する効果について、副作用の体重減少の機序について、化学療法との併用による相互作用の有無について質問があった。次いで、副査の吉木 敬教授より他の血管新生阻害剤の開発状況について、また、高腹膜播種株で現在までに解っている特性について、中皮細胞への接着能亢進に関与している因子について質問があった。また、主査の今村雅寛教授より血管新生に関して血行性転移と腹膜播種性転移との相違について、TNP-470 の腹膜播種抑制の作用機序について、今後臨床応用への展望について、化学療法との併用の報告例などについて質問があった。以上の質問に対し申請者は概ね妥当と思われる回答をした。

膵癌腹膜播種に対する血管新生阻害剤を用いた治療効果に関して詳細な検討を行った本研究の意義は大きく、審査員協議の結果、申請者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。