

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目：**Blockade of the SDF-1/CXCR4 Axis Attenuates *In vivo* Tumor Growth by Inhibiting Angiogenesis in a VEGF-Independent Manner**

和訳：**CXCR4 中和抗体は腫瘍血管新生を低下させ消化器癌 増殖を抑制する**

指導教官：小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名：バヤス グラン (Bayasi Guleng)

研究の背景および目的

腫瘍血管新生は癌種を問わず腫瘍組織の増大にとっては必須の現象であると考えられ、広いスペクトラムを有する新たな癌治療標的として重要と考えられている。実際に現在、分子標的治療薬を初めとする抗血管新生薬の開発競争が盛んであり、既に抗ヒト VEGF 抗体は臨床現場で投与され、従来 of 抗癌剤との併用で有意に患者予後を延長させるなどの成果が報告され始めている。また、従来、腫瘍血管新生の本体は組織内 de novo での血管発芽と考えられてきたが、最近、組織幹細胞のひとつとして骨髄由来の血管内皮前駆細胞が末梢血中に同定され、その細胞が腫瘍などの末梢局所へリクルートされる現象が報告された。

細胞のケモタキシスを司るケモカイン遺伝子群の中で SDF-1/CXCR4 axis 欠損マウスがいずれも血管系の異常で胎生致死になると報告されている。また、SDF-1 は組織の間質と血管内皮で発現され、受容体である CXCR4 も血管内皮細胞に発現するとの報告から SDF-1/CXCR4 axis が腫瘍血管新生に寄与する可能性が考えられた。

我々は今回消化器癌細胞を皮下移植したマウスモデルを用いて、腫瘍血管新生におけるケモカイン SDF-1/CXCR4 axis の役割を検討した。

方法

C57BL/6 マウスに放射線を照射して骨髄を破壊し、GFP トランスジェニック

マウスの骨髄細胞を移植した。そのマウスに大腸癌、膵癌細胞株を皮下移植した。大腸癌と膵癌それぞれの腫瘍組織内へに浸潤する細胞を比重遠心で回収し、それらの細胞に共通に発現するケモカインレセプターを RT-PCR 法によりスクリーニングし、CXCR4 については免疫学的染色により腫瘍組織での発現を検討した。腫瘍の増殖に伴う骨髄由来幹細胞の腫瘍組織への誘導、生着は腫瘍組織内の GFP と血管内皮細胞のマーカー CD31、同定された CXCR4 との蛍光二重染色により解析した。一方、比重遠心で末梢血単核球分画を採取、内皮細胞の培養条件下で *in vitro* 培養することで、末梢血の血管内皮前駆細胞における CXCR4 の発現も検討した。

さらに大腸癌、膵癌細胞株を皮下移植したマウスモデルに、CXCR4 の中和抗体を投与し、腫瘍への抑制効果を検討した。腫瘍の血管新生への影響は血管内皮細胞のマーカーである CD31 の抗体で蛍光免疫染色を行い、両群での腫瘍血管数を定量するとともに、Laser Doppler imaging system を用いて腫瘍内の血流を測定した。

結果

大腸癌、膵癌細胞株を皮下移植したマウスモデルで、腫瘍組織内へに浸潤する細胞を比重遠心で回収し、それらの細胞に共通に発現するケモカインレセプターを RT-PCR 法によりスクリーニングしたところ、二種類の腫瘍でケモカイン受容体 CXCR4 の共通発現が確認され、免疫染色の検討でも CXCR4 が二種類の腫瘍で確認され、一部は腫瘍の血管内皮で発現されていた。GFP 骨髄移植したマウスモデルでの蛍光二重染色で GFP と CXCR4 ダブル陽性細胞が腫瘍血管内皮で発現され、それらの細胞はトータル GFP 陽性細胞に対して大腸癌の Colon38 と膵臓癌の PancO2 のモデルでそれぞれ 3.4% (32.3 ± 2.1 v.s. 961.3 ± 36.8)、2.1% (65.7 ± 4.6 v.s. 3185.7 ± 149.8)であった。一方、比重遠心で末梢血単核球分画を採取、内皮細胞の培養条件下で *in vitro* 培養したところ、末梢血の血管内皮前駆細胞における CXCR4 の発現も確認された。このことから CXCR4 は骨髄由来血管内皮前駆細胞の腫瘍へのリクルートにも関与する可能性が考えられた。

大腸癌、膵癌細胞株を皮下移植したマウスモデルに、CXCR4 の中和抗体を投与し、中和効果を検討したところ、CXCR4 の中和抗体が二種類の腫瘍の増殖をそれぞれ抑えた。*In vitro* で Colon38 と PancO2 細胞に CXCR4 の中和抗体を添加し、MTT assay で検討した結果、中和抗体は癌細胞そのものの増殖に影響は与えなかった。Colon38 細胞は RT-PCR レベルでは CXCR4 を発現することから、RNAi 手法を用いて Colon38 に CXCR4 を Stable Knock Down した細胞株 (siCXCR4) を樹立した。siCXCR4 細胞をコントロール siRenilla 細胞と *in vitro, in vivo* で検討したところ、CXCR4 の Knock Down により癌細胞の増殖に影響は与

えなかった。つまり CXCR4 陽性細胞が腫瘍の一部血管内皮で発現された結果から、CXCR4 の中和効果の機序は腫瘍直接でなく血管新生を抑えた可能性が示唆され、さらに検討を進めた。中和抗体の投与群とコントロール群の腫瘍組織で CD31 の抗体で蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で両群での腫瘍血管数を定量した結果、中和抗体を用いた群ではコントロール群より血管の数は 45% ($p < 0.001$)まで減少した。Laser Doppler imaging system を用いて腫瘍内の血流を測定した結果、中和抗体を用いた群ではコントロール群より血流が 65% ($p < 0.01$)まで減少した。CXCR4 の中和効果と VEGF との関連を検討するため、両群の腫瘍から蛋白を回収して、ELISA Assay で VEGF の濃度を測定した結果、両者で VEGF 蛋白の発現量に有意差が認められなかった。このことは CXCR4 が VEGF と非依存的に腫瘍血管新生に関与することを示している。

考察

本研究では、消化器癌細胞を皮下移植されたマウス腫瘍組織において、ケモカイン受容体である CXCR4 をその中和抗体を用いて阻害すると腫瘍増殖が抑制され、それが腫瘍細胞自身への効果ではなく間質を介した腫瘍内血流の低下によるものであることを明らかにした。

乳癌では CXCR4 が過剰発現、リガンドの SDF-1 も腫瘍組織で発現、癌の転移にも関わり、CXCR4 の中和により乳癌転移に抑制効果があると報告されている。我々の消化器癌モデルでの結果から推測すれば、CXCR4 の中和により転移抑制効果は腫瘍の血管新生を抑制する影響もあるかもしれない。

ケモカインレセプター CXCR4 が皮下移植された腫瘍において VEGF とは非依存的に腫瘍血管新生に関与する結果が得られ、そのひとつは血管内皮の構築の制御を介している可能性が文献的に考えられた。内皮細胞の三次元構造の確立が SDF1 により制御しているという現象はすでに血管内皮細胞株を用いた *in vitro* の実験で報告されているが、そればかりでなく、今回の骨髄移植モデルや腫瘍内血流 Doppler の検討では骨髄からの血管内皮前駆細胞のリクルートにも CXCR4 が関与していると考えられた。

結語

癌細胞を皮下移植したマウスモデルでの検討では、CXCR4 に対する中和抗体の投与により、腫瘍血管新生阻害を介して腫瘍増殖を抑制した。SDF-1/CXCR4 axis が、VEGF の阻害とは異なる血管新生抑制機構として、新たな癌治療の分子標的として臨床応用につながることを期待される。