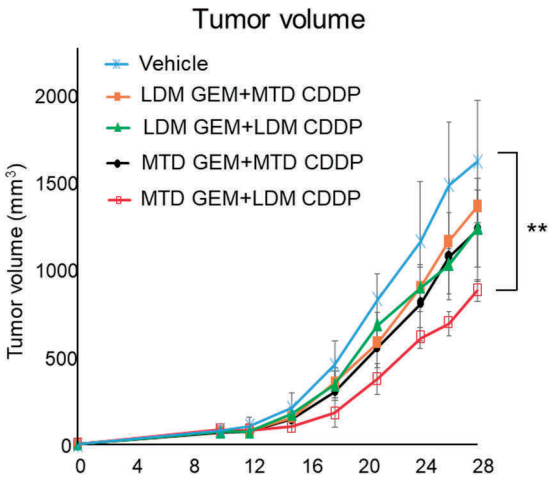
165　腫瘍血管内皮の異常性と尿路上皮癌の新規治療法開発	菊地　央

【目的】腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞はがんの進展や転移に重要な役割を担っていることが知られており、様々な異常性をもつことが明らかとなってきた。腫瘍血管内皮細胞は、がん組織内のわずか数パーセントの細胞集団であるが、その役割から抗癌剤治療後にも残存すると再発・転移の要因となりうるため、腫瘍血管自体の薬剤耐性も無視することはできない。これまで、腫瘍血管内皮細胞が、正常組織の血管内皮細胞と比較して様々な違いがあることが解明されてきており、そのひとつに ABC トランスポーターの一つ ABCB1（多剤耐性遺伝子 *MDR1* によりコード）の発現亢進がある。ABC トランスポーターは細胞内の薬剤排出に関わる細胞膜輸送型タンパクである。腫瘍血管内皮細胞は ABCB1 を介して抗癌剤を細胞外に排出することで耐性を示す。我々は尿路上皮癌の臨床検体を用いた研究で、抗癌剤治療によって ABCB1 高発現の腫瘍血管内皮細胞が増加し、予後不良の原因となることを見出している。さらに、その ABCB1 発現亢進メカニズムとして、炎症性サイトカインである IL-8 が関与していることを解明している。本研究では薬物治療時の炎症性変化を抑制することで、腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得を防ぎ、長期間奏効する尿路上皮癌の新規治療法の開発を目指した。

【方法】尿路上皮癌のゼノグラフトモデルを用いて、標準化学療法として行われるゲムシタビンまたはシスプラチンを低容量維持による投与法で腫瘍の炎症性変化が抑制されたか、また腫瘍血管の異常性亢進が改善されたかを主に免疫組織学的に検証した。さらに、その治療法により治療効果の改善がみられたかを検証した。

【結果】シスプラチンの低容量維持投与を行うことで、腫瘍組織内の炎症性サイトカイン発現や免疫抑制性細胞の動員が抑制されるなど、腫瘍組織内の炎症性変化が抑制されることが示された。また、シスプラチンの最大投与量でみられていた腫瘍血管密度の増大が、低容量維持投与ではキャンセルされかつ、周囲細胞でおおわれた血管の増加がみられ、腫瘍血管の正常化がもたらされていた。それに伴いシスプラチンの低容量維持投与により、腫瘍増殖が抑制され、骨転移の減少がみられ治療効果が改善することが証明された。

尿路上皮癌ゼノグラフトモデルにおける腫瘍増殖曲線



165. 腫瘍血管内皮の異常性と尿路上皮癌の新規治療法開発

菊地　央

*北海道大学病院 泌尿器科

Key words：腫瘍血管内皮細胞，薬剤耐性，低容量維持化学療法，炎症，尿路上皮癌

緒　言

腫瘍微小環境において、がん細胞と間質細胞の相互作用、がんの進展における間質細胞の役割について研究が進み、間質細胞もがんの薬剤耐性や進展に重要な役割を担っていることが明らかとなってきている。腫瘍間質細胞の一つに腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞（Tumor Endothelial Cell：TEC）がある。がんの進展や転移に腫瘍血管が重要な役割を担っていることが知られており、TEC が様々な異常性をもつことが明らかとなってきた。TEC は、がん組織内のわずか数パーセントの細胞集団であるが、その役割から抗癌剤治療後にも残存すると再発・転移の要因となりうるため、腫瘍血管自体の薬剤耐性も無視することはできない。

我々はこれまで、TEC が、正常組織の血管内皮細胞と比較して様々な違いがあることを見出しており［1］、そのひとつに TEC の ABC トランスポーターの一つ ABCB1（多剤耐性遺伝子 *MDR1* によりコード）の発現亢進がある[2]。ABC トランスポーターは細胞内の薬剤排出に関わる細胞膜輸送型タンパクである。TEC は ABCB1 を介して抗癌剤パクリタキセルを細胞外に排出することでパクリタキセルに対して耐性を示すこと、ABCB1 阻害剤の併用によりパクリタキセルを細胞内に留めることでその治療効果を増強させ、有意に腫瘍を縮小できることをメラノーマのマウスモデルで見出した［3]。しかし、 尿路上皮癌の TEC に関する研究報告は殆どなく、抗癌剤ががん細胞と TEC を含むがん間質細胞の相互作用に与える影響も未解明であるのが現状であった。

我々は尿路上皮癌の臨床検体を用いた研究で、抗癌剤治療によって ABCB1 高発現の腫瘍血管内皮細胞が増加し、予後不良の原因となることを見出した。さらに、その ABCB1 発現亢進メカニズムとして、炎症性サイトカインである IL-8 が関与していることを解明している［4]。本研究では薬物治療時の炎症性変化を抑制することで、腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得を防ぎ、長期間奏効する尿路上皮癌の新規治療法の開発を目指した。 炎症性変化を抑制する治療法として、抗癌剤の低容量維持投与による治療法に焦点をおいた。

方　法

1. 免疫組織学的評価

微小血管密度（Microvessel density：MVD）は、NIH ImageJ ソフトウェアを使用して、総面積における CD31 染色面積の割合とした。F4/80、CD206、CD11b、Gr-1 およびトリクローム染色領域は、NIH ImageJ ソフトウェアを使用して測定し全組織面積に対する陽性染色面積の比率を計算した。周皮細胞で覆われた腫瘍血管面積は、$CD31^{+}$血管の総数に対するα-SMA および CD31 で同時染色された血管数の比率によって計算した。各群のすべての腫瘍から無作為に選択された 10～20 のフィールドで、上記の染色データを解析し、群間で比較した。

2. マウスを用いた腫瘍ゼノグラフトモデルによる治療実験

tdTomato-Luc2-UMUC3 腫瘍細胞（4×10^{6}）を等量のマトリゲル（356231、Corning）と Hank's 平衡塩溶液（HBSS）で希釈し、7 週齢のメスの nude マウスの右側腹部に皮下注射した。ゲムシタビン（Gemcitabine：GEM）／シスプラチン（Cisplatin：CDDP）治療は、腫瘍注射の 10 日後に開始した。最大耐用量（Maximum

*現在の所属：手稲渓仁会病院 泌尿器科

tolerant dose : MTD）GEM＋CDDP 化学療法では、各マウスに GEM（60 mg/kg）を腹腔内注射し、翌日 CDDP（6 mg/kg）を腹腔内注射した。治療レジメンは週に 1 回、3 コース行った。低容量維持（Low dose metronomic : LDM）化学療法では、GEM（1.0 mg/kg）または CDDP（0.6 mg/kg）の連日投与を行った。腫瘍体積は、（最短径）^{2}×（最長径）×0.5 の計算式で測定した。腫瘍細胞の皮下注射後 29 日の時点でマウスを sacrifice し、腫瘍組織を、免疫組織学的分析および RNA 分離のために切除した。左後肢の骨と肺を切除し、IVIS スペクトラム（Caliper Life Sciences）を用いた生物発光イメージングによって転移を観察した。

3. 統計手法

図のデータは平均±標準偏差として表示した。 箱ひげ図は中央値（中心線）、25%タイルと 75%タイル（箱）、最小値と最大値（ひげ）を示した。 群間の比較は Wilcoxon test を用いた。統計学的有意性は P＜0.05 とした。統計分析は、JMP バージョン 14（SAS Institute）を用いた。

結　果

1. LDM CDDP＋MTD GEM 治療による腫瘍増大と骨転移の抑制

CDDP または GEM を使用した LDM 治療の有効性を評価するために、tdTomato-Luc2-UMUC3 ゼノグラフトを用いて LDM または MTD GEM および CDDP による治療実験を行った（図 1a）。LDM CDDP＋MTD GEM 群のみが、Vehicle 群と比較して腫瘍増殖を減少させた。一方で LDM GEM＋MTD CDDP または LDM GEM＋LDM CDDP 治療では、腫瘍増殖を抑制できなかった（図 1b）。さらに、骨転移も Vehicle 群と比較して LDM CDDP＋MTD GEM 群で減少した（図 1c、d）。

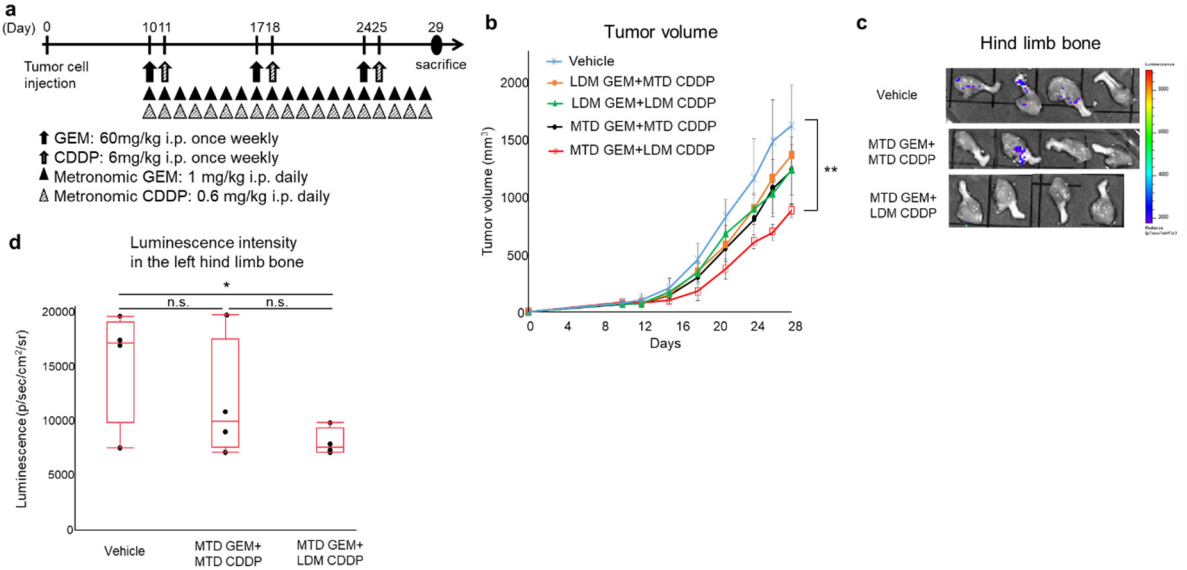


図 1. LDM CDDP＋MTD GEM 治療による腫瘍増大と骨転移の抑制

a）tdTomato-Luc2-UMUC3 ゼノグラフトモデルにおける治療実験デザイン。

b）tdTomato-Luc2-UMUC3 ゼノグラフトにおける腫瘍増殖曲線。**P＜0.01（Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon test）。

c）IVIS スペクトラムによる左後肢骨の発光強度の評価。

d）IVIS スペクトラムによる骨転移の群間比較。*P＜0.05（Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon test）。

2. LDM CDDP＋MTD GEM 治療による腫瘍微小環境の炎症性変化の抑制

腫瘍微小環境における LDM または MTD 化学療法の炎症性変化を mRNA 発現および免疫組織学的に解析した。炎症関連遺伝子の mRNA 発現を解析したところ腫瘍間質の IL-8 および PTX3 mRNA 発現が MTD CDDP＋MTD GEM によって増加傾向となったが、LDM CDDP＋MTD GEM では増加しなかった。また、腫瘍間質の線維化や M2 マクロファージ、Myeloid-derived suppressor cell の動員が LDM CDDP＋MTD GEM 群では抑制されていた。

3. LDM CDDP＋MTD GEM 治療による腫瘍血管の正常化

LDM CDDP＋MTD GEM が腫瘍血管の異常性亢進を抑制しているかを解析した。MTD CDDP＋MTD GEM は Vehicle 群と比較して MVD を増加させたが、LDM CDDP＋MTD GEM は MVD を増加させなかった（図 2a、b）。次に、血管の成熟度を評価するために、α-SMA および CD31 の免疫染色によって血管の周皮細胞被覆率を分析した。Vehicle 群と比較して、化学療法治療では成熟した血管が増加し、LDM CDDP＋MTD GEM は MTD CDDP＋MTD GEM よりも成熟血管を増加した（図 2c、d）。

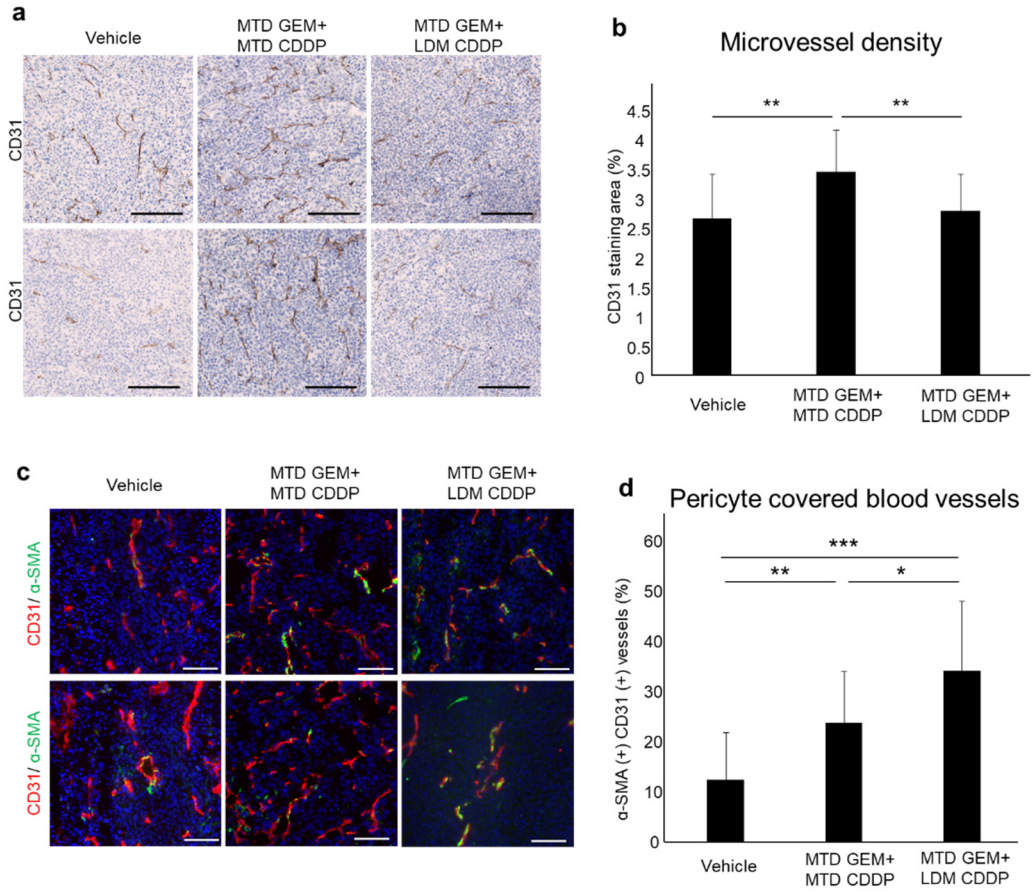


図 2. LDM CDDP＋MTD GEM 治療による腫瘍血管の正常化

a) tdTomato-Luc2-UMUC3 腫瘍組織における CD31 染色像（スケールバー：200μm）。

b) MVD の定量分析。** P＜.01（Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon test）。

c) tdTomato-Luc2-UMUC3 腫瘍組織における CD31（赤）およびα-SMA（緑）の二重染色像（スケールバー：100μm）。

d) 腫瘍血管の周皮細胞被覆率の定量分析。* P＜0.05、** P＜0.01、*** P＜0.001（Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon test）。

考　察

従来行われている最大耐用量による化学療法は、腫瘍の炎症性変化を誘発することが示されており、癌関連線維芽細胞の活性化による線維化や薬剤耐性などにより腫瘍の増悪を促進する［5］。尿路上皮癌の臨床現場においては、抗癌剤の投与は最大耐用量による投与法が通常であり、その治療が腫瘍血管の異常性を亢進し、薬剤耐性獲得の一因となっている［4］。

本研究では低容量維持投与によるシスプラチンが抗腫瘍効果を高め、骨転移を減少させることを示した。これらの治療結果は、腫瘍血管の正常化、免疫抑制細胞の減少、炎症性変化の抑制など、腫瘍微小環境の再構築によってもたらされたと考えられる。低容量維持投与によるシスプラチンは、肝細胞癌ゼノグラフトモデルにおいて血管内皮増殖因子およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-2の発現を減少させたことが報告されている［6］。本研究でも、 低容量維持投与によるシスプラチンは腫瘍間質のIL-8を減少させる傾向があり、腫瘍組織の血管新生促進分子を減少させる可能性がある。低容量維持投与によるシスプラチンは腫瘍血管新生の抑制、血管の正常化をもたらすことで抗癌剤の治療効果を改善するポテンシャルがあり、尿路上皮癌の新たな治療法となる可能性がある。ただし、臨床応用にあたっては腎機能障害などの有害事象に関する解析などさらなる研究が必要と考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院歯学研究科血管生物分子病理学研究室の樋田京子教授、間石奈湖助教である。

文　献

1） Hida K, Hida Y, Amin DN, Flint AF, Panigrahy D, Morton CC, Klagsbrun M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. Cancer Res. 2004 Nov 15;64(22):8249-55. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1567. PMID: 15548691.

2） Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Ishikawa S, Maishi N, Akino T, Kondoh M, Matsuda A, Inoue N, Shindoh M, Hida K. Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. Am J Pathol. 2012 Mar;180(3):1283-1293. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.029. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22245726.

3） Akiyama K, Maishi N, Ohga N, Hida Y, Ohba Y, Alam MT, Kawamoto T, Ohmura H, Yamada K, Torii C, Shindoh M, Hida K. Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel. Am J Pathol. 2015 Feb;185(2):572-80. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25498238.

4） Kikuchi H, Maishi N, Annan DA, Alam MT, Dawood RIH, Sato M, Morimoto M, Takeda R, Ishizuka K, Matsumoto R, Akino T, Tsuchiya K, Abe T, Osawa T, Miyajima N, Maruyama S, Harabayashi T, Azuma M, Yamashiro K, Ameda K, Kashiwagi A, Matsuno Y, Hida Y, Shinohara N, Hida K. Chemotherapy-Induced IL8 Upregulates MDR1/ABCB1 in Tumor Blood Vessels and Results in Unfavorable Outcome. Cancer Res. 2020 Jul 15;80(14):2996-3008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3791. Epub 2020 Jun 14. PMID: 32536602.

5） Karagiannis GS, Condeelis JS, Oktay MH. Chemotherapy-Induced Metastasis: Molecular Mechanisms, Clinical Manifestations, Therapeutic Interventions. Cancer Res. 2019 Sep 15;79(18):4567-4576. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1147. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31431464; PMCID: PMC6744993.

6) Shen FZ, Wang J, Liang J, Mu K, Hou JY, Wang YT. Low-dose metronomic chemotherapy with cisplatin: can it suppress angiogenesis in H22 hepatocarcinoma cells? Int J Exp Pathol. 2010 Feb;91(1):10-6. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00684.x. PMID: 20096070; PMCID: PMC2812723.