

## 血管新生とその臨床応用

田 中 俊 英\*

## Clinical Application on Angiogenesis Research

Toshihide TANAKA\*

---

**Key words** : angiogenesis, gene therapy, two compartment theory, angiostatin, platelet factor 4
 

---

## はじめに

脳腫瘍を含めた悪性腫瘍の治療に関しては数多くの臨床医や研究者が英知をふりしぼってその病態にせまるべく日夜治療，研究に従事しているにもかかわらず依然として難治性疾患である。特に悪性グリオーマに関して言えば近年脳神経外科手術手技や術後療法として化学療法，放射線治療，免疫療法などの著しい発展にもかかわらず50%生存率は12~16カ月，5年生存率が10%以下というきわめて悲惨な治療成績は20年前と比べ変わらない。癌治療の研究はこれまで正常細胞との相違点に着目され病理学的検索から治療薬の開発さらに遺伝子解析にまで及ぶようになったが，常に癌細胞が主役であった。それでも治療成績にその成果が反映されないのは治療戦略の着目点が癌細胞のみに注がれていたからである。従って，癌細胞ではなくて癌を含む癌組織全体に着目した新たな治療戦略を考えることは今までの既存の治療法に加え，新たな breakthrough になり得ると考えられる。

腫瘍の血管新生は Folkman のグループが angiostatin, endostatin の発見により一躍注目されている<sup>1)2)</sup>。特に1990年代に入り，この分野

の研究が爆発的に発展したのは1つには毛細血管の内腔を裏打ちしているわずか薄い血管内皮細胞の培養技術が進歩したことにより *in vitro* で *in vivo* に近い再現モデルを作成できるようになったことがあげられる。

Angiogenesis は腫瘍組織より放出されるサイトカインや growth factor が血管内皮細胞に作用し既存の血管より新たに血管が出芽していく現象で腫瘍細胞のみならずその周囲にあるマクロファージ，白血球などの血液系細胞や血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，周皮細胞などの血管壁を構成している細胞も参画しており益々複雑な現象であることがわかってきた。こうしたプロセスで完成した新生血管は，原発腫瘍の増殖，再発，浸潤そして遠隔転移の経路としての役割を果たしている。血管内皮細胞の増殖に始まり，血管基底膜の破壊，血管内皮細胞が腫瘍細胞に向かって遊走していき最後に管腔を形成する精巧にプログラムされた一連のドラマにさまざまな因子が関与しており病態の悪性度に相関することが明らかになった。従って血管新生をターゲットにした治療は癌治療を考えるうえで理に適った治療戦略といえよう。

## 1) 血管内皮細胞と増殖因子

血管内皮細胞は，生体内に数億個存在し，体

---

\*東京慈恵会医科大学脳神経外科〔〒105-8467 港区西新橋3-25-8〕Department of Neurosurgery, Jikei University School of Medicine (3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, 105-8467, Japan.)

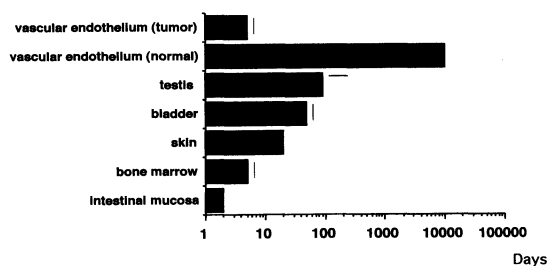


図1 正常細胞の細胞周期

比較的細胞増殖能の高い正常細胞のDNA合成能を比較したデータである。[<sup>3</sup>H]でラベルしたチミジンが100%細胞に取り込まれるまでにかかる時間を示したものである。正常血管の内皮細胞は非常に緩徐な増殖を示すのに対し、腫瘍血管の内皮細胞のDNA合成能は、骨髄細胞のそれと同等で、腫瘍血管新生に大きく関与している。

重70kgの成人の体内に総面積にして1,000m<sup>2</sup>あるといわれている。図1に示した如く腫瘍血管の内皮細胞は正常の血管内皮細胞に比べその増殖は著しく速く、正常骨髄細胞のそれと同等でturnoverは約5日である。1gの腫瘍組織中には $2 \times 10^7$ 個の血管内皮細胞と $10^8 \sim 10^9$ 個の癌細胞が含まれているといわれており、(1個の血管内皮細胞が5~50個の癌細胞)、血管内皮細胞は、腫瘍の増殖、浸潤、遠隔転移に貢献している。本来増殖能に乏しい細胞であるにもかかわらず、腫瘍血管の内皮細胞の増殖能は骨髄細胞のそれにほぼ等しく、遺伝子異常は認められない。腫瘍組織内に存在しているというだけであたかも腫瘍細胞の如くふるまっているわけである。

これには数々の因子が腫瘍組織より放出され内皮細胞の増殖やangiogenesisの促進に関与していることが明らかにされてきた。1983年にMichael KlagsburnらによりbFGFがangiogenic factorであることが同定されて以来、数々の因子がangiogenic factorあるいはinhibitorとして明らかにされた。これらは腫瘍細胞やマクロファージ、fibroblastなどの間葉系の細胞より放出されtumor angiogenesisに貢

献していることが免疫組織化学などから明らかにされている。そして腫瘍増殖、退縮にはangiogenesisの正と負の制御因子のバランスにより精巧に調節されていると考えられるようになってきた。

最近注目されているのが内皮細胞にのみ特異的に作用するVEGFである。グリオーマを始めとするangiogenic tumorにその発現量が多く、さらに興味深いのはhypoxiaによりupregulationされる点である。乏血管性になった腫瘍組織が栄養を得るために1種のSOSシグナルを放出し血管を誘導するというものだ。さらにこの因子が血管透過性を亢進させる作用も有し、peritumoral edema, ascitesやcystを形成するメカニズムの1つとして考えられておりtumor biologyや治療戦略を考えるうえで大変興味深く示唆に富んでいる。またVEGFに関しては急速に研究が進められており癌抑制遺伝子であるp53の変異やc-Srcのような癌遺伝子によりその発現が高まることも明らかにされている。この因子をターゲットにした治療戦略も考え出されており、新たな治療戦略として期待されている。

## 2) angiostatin, endostatinの発見物語<sup>1)2)</sup>

臨床上外科医が経験することに、原発腫瘍を外科的に切除するとそれを契機に今まで静かにしていた転移巣が急激に増大し致死的になることがしばしば経験するが、そのメカニズムについては1900年代からずっと謎であった。Folkmanのグループによって提唱された転移のメカニズムの仮説を示したのが、図2である。原発腫瘍はこのようにangiogenesis factorを放出し局所で血管新生を誘導し、それにより腫瘍増殖が起こる。しかしながらそれと同時に原発腫瘍自ら内因性の血管新生抑制因子を産生し全身循環を介し遠隔臓器の血管新生を抑えている。内因性の血管新生抑制因子の血中半減期はbFGF, VEGFのそれより長く、血中でも比較的安定していると考えられる。それ故、原発腫瘍の存在下では転移巣の血管新生が抑制され、

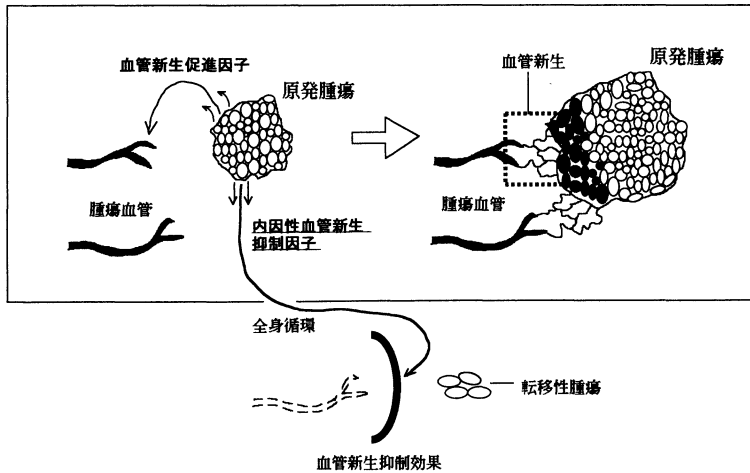


図 2 O'Reilly の提唱した遠隔転移のメカニズム

遠隔転移の機序として原発腫瘍には血管新生発現型と非発現型の細胞が混在しており発現型より血管新生が誘発され原発腫瘍は増殖する。それと同時に原発腫瘍から内因性の血管新生抑制因子が放出され、全身血液循環を介して遠隔臓器において血管新生を阻害しているため、そこではわずかな数のすでに転移を起こした癌細胞は増殖できず、“休眠状態” (microscopic metastatic dormancy tumor) にある。ところが原発腫瘍を外科的に切除すると、このバランスが崩れ内因性血管新生抑制因子の供給源が断たれてしまうことになり、“休眠状態”にあった転移性腫瘍が増殖し始める。こうして二次的に癌の遠隔転移が起こると O'Reilly は仮説をたて、これが、アンジオスタチン、エンドスタチンの発見につながっていった。

転移腫瘍の増殖も抑えられているが、外科的に原発腫瘍を切除すると血管新生抑制因子の供給源がなくなり転移巣でも血管新生が誘導され転移腫瘍が増殖し始めるというのが仮説である。

この抑制因子を抽出するために以下のような実験が行われた。ルイス肺癌細胞をマウスの皮下に生着させ2週間後に2つのグループに分け、1つは外科的に切除した群、残りは腫瘍をそのままにしておいた群とし、さらに2週間観察した後に sacrifice し、肺の転移巣を調べた。すると外科的に切除した群では肺転移巣が40～50あったのに対し、切除しなかった群では5以下であった。腫瘍生着マウスの血清、尿を採取し、血管内皮細胞を用いた増殖抑制効果を比較検討したところコントロールと比べ、dose dependent に内皮細胞の増殖が抑制されたことが判明した。

タンパクを抽出しそのアミノ酸配列を調べあ

げた。プラスミノゲンのアミノ酸の3次元構造は、5つの大きなループ (Kringle loop) を含んでいることで知られているが、抽出されたタンパクの配列はループの1番目から4番目までと一致していた。血管静止作用という angiostatic effect という意味から angiostatin と名付けられた。そしてルイス肺癌細胞を用いた肺癌転移モデルに対し plasminogen fragment (angiostatin) を投与したところ転移抑制効果が認められた。

免疫組織学的に検討すると血管内皮細胞のマーカーである vWF (von Willebrand factor) の染色によりコントロール群に比べ angiostatin 治療群では著明に vascularity が低下していた。また bFGF を植え込んだ角膜法でもコントロールに比べ angiostatin 治療群では角膜での angiogenesis が抑制された。さらにマウス、ヒトの原発腫瘍のモデルに対しての治療効

果を調べてみると80~90%の抑制効果が認められた。さらに同様の方法でhemangioendotheliomaの培養上清が内皮細胞の増殖抑制作用を有することがわかり、新しい血管新生抑制因子を発見した。抽出されたタンパクのアミノ酸配列は18型collagenのC末端側の約20kDのペプチドであることが判明した。endothelial cellに対するcytostatic effectを有することよりendostatinと名付けられたこの血管新生抑制因子も同様に*in vivo*で皮下腫瘍に対する治療効果が検討され、angiostatinよりもさらに強力な抑制効果を示した。また免疫組織学的検討ではvWF、増殖マーカーであるPCNA、アポトーシスの細胞を同定するTUNEL法を調べるとendostatin治療群では著明にvascularityが低下し、腫瘍細胞の増殖能に対しては影響を与えなかったが、アポトーシス誘導効果が認められ、それにより腫瘍増殖を抑えているいわゆる“休眠状態”(dormancy)を保っていることが判明した。腫瘍の増殖能には影響を与えずアポトーシスを誘導することが血管新生抑制因子を用いた癌治療の特長でありこれをdormancy therapyと呼んでいる。

### 3) ウイルスベクターを用いた抗血管新生遺伝子治療法の開発<sup>3)4)</sup>

以上こうした抗血管新生療法は血管新生の抑制、内皮細胞の増殖を抑制することにより癌との共存という理想的な環境を実現することが悪性腫瘍に対する抗血管新生療法の基本概念である。特に悪性グリオーマのように限局した腫瘍の場合には血管新生抑制因子を全身投与したのでは有効な局所濃度を維持することが期待しにくくまた抗血管新生療法は腫瘍細胞に対して直接の殺細胞効果はもたないため治療は長期間にわたって行われる必要がある。それにより患者への精神的、経済的負担が重なる。何らかの方法で腫瘍組織とその周辺に限局し長期にわたって高濃度の血管新生抑制因子が集積するような環境をつくることが望ましい。そうした問題を解決する手段の1つとして近年開発の著しいウ

イルスベクターを用いた遺伝子治療の技術を利用し血管新生抑制因子の遺伝子と腫瘍細胞およびその周囲の細胞に導入し腫瘍組織から内因性に血管新生抑制因子を産生させ腫瘍血管新生を抑制し微小環境を変えることを試みた。

分泌シグナルを付加した血小板第4因子(PF4)とangiostatinのcDNAを組み込んだレトロウイルスベクターを作成し、グリオーマ細胞に導入するとスタンパクの発現が細胞質、また培養上清中に認められ、分泌されることが確認できた。

内皮細胞(HUVEC-human umbilical vein endothelial cells)を用いてベクターによる遺伝子導入を行ったところ、 $\beta$ -gal発現ベクターを用いて内皮細胞にトランスフェクションすると遺伝子発現が確認できた。さらに増殖抑制効果について検討したところPF4、angiostatinの遺伝子導入したグリオーマと内皮細胞をco-cultureしたり培養上清を混合したり、また内皮細胞に直接遺伝子導入することによりオートクライン、パラクラインの経路でangiostatinによる内皮細胞増殖抑制効果が確認された。

*in vivo*の系ではsubrenal capsule assay法と呼ばれる方法で腫瘍増殖抑制、血管新生抑制効果を検討した。subrenal capsule assay法の利点として腎臓が簡単にexposeできること、renal capsuleは丈夫で腫瘍組織を生着させるのに適していること、renal capsuleは透明であるため新生血管が透過しやすい点、さらにsubrenal spaceは無血管領域でありこのスペースに生着した腫瘍組織の増殖はangiogenesis dependentである微小環境であることである。PF4、angiostatin産生グリオーマにて抗腫瘍効果、血管新生抑制効果が認められた。

免疫組織学的に検討してみると、vWF、TUNEL法にて、angiostatin産生グリオーマの方がvascularityも低く、apoptosisが誘導されていることが示された。皮下に生着した腫瘍の成長曲線では、T/C比率は0.23であり約77%抑制されたことになる。頭蓋内に生着させ

た腫瘍においても angiostatin 産生グリオーマ群において有意に生存期間の延長を認めた。

レトロウイルスでは腫瘍細胞と腫瘍血管内皮細胞のみが遺伝子導入の標的となるわけだが、その場合腫瘍容積が小さいうちは導入される細胞数も少ないため十分な量の血管新生抑制因子の産生が期待しにくい。つまり腫瘍が大きくなるにつれ血管新生抑制因子の産生量が増すことになる。理想的には少ない腫瘍容積のうちに大量の血管新生抑制因子が産生されるという微小環境が望ましいわけで、そのためには分裂、非分裂細胞の双方に遺伝子導入できるベクターが適していると考えられる。そこで同様な手法を用いてアデノウイルスベクターに PF 4, angiostatin の遺伝子を組み込んだ。またアデノウイルスベクターによる遺伝子導入の効率を先程示したように  $\beta$ -gal 発現ベクターを用いて  $\beta$ -gal を定量することで比較検討した。内皮細胞への導入効率はグリオーマと同等かそれ以上であり、内皮細胞がアデノウイルスベクターの標的として適していることがわかる。また MOI を変えると dose dependent に遺伝子発現レベルが増加する。HUVEC を用いた bioassay では遺伝子導入したグリオーマとの co-culture や直接内皮細胞に遺伝子導入した場合、ともに angiostatin を導入した方が著明に内皮細胞の増殖能は抑制された (図 3)。

subrenal capsule assay にて、ヒトグリオーマ細胞とウイルス溶液を co-injection し、3週間後に sacrifice し、腫瘍容積、重量、血管密度を比較検討したところ angiostatin 産生グリオーマで有意に腫瘍増殖や血管新生が抑制されていた (図 3)。同様に免疫組織学的検索では vWF, PCNA, TUNEL を施行すると vascularity は angiostatin 産生グリオーマで低下しており、また腫瘍細胞の増殖能には差がみられなかったが、angiostatin 産生グリオーマでコントロールに比べアポトーシス誘導効果が認められ、dormancy state になっていることが判明した。

頭蓋内腫瘍モデルでは腫瘍生着 1 週間後に同部位にウイルスを注入したところ、angiostatin 治療群で有意に生存期間の延長が認められた。

#### 4) 腹水産生腫瘍モデルに対する抗血管新生遺伝子治療法

ところで、最近の知見として、腫瘍血管新生と血管透過性が、腹膜播種した腫瘍における腹水産生に関与していることが明らかになった。その原因として血管新生因子の 1 つである VEGF/VPF が腹水産生を促すことが知られている。腹腔内は、隔離された空間であり、遺伝子導入を利用した治療モデルとして適していると考えられる。そこで、血管新生抑制因子の遺伝子導入が、腹水産生腫瘍の治療の一手段として有用であると期待され、血清腹水を産生する乳癌細胞を用いた動物モデルを利用して、その治療効果を検討した。

腹水を採取し、血管内皮細胞の培養液に加えると、濃度依存的に内皮細胞の増殖が促進される。腹水中に高濃度の VEGF が検出されたことより、腹壁の血管新生に加え新生血管の透過性の亢進により腹水貯留が生じるものと思われる。またアデノウイルスベクターによる腹腔内への遺伝子導入の効率を調べると、腹水中の浮遊腫瘍細胞のみならず腹部実質臓器においても広範囲にわたり遺伝子発現が認められた。また分泌型 PF 4 発現ウイルスベクターを腹水産生乳癌細胞を移植したマウスに投与すると腹水産生量が抑制されただけでなく、血性でなく黄色の腹水が認められた。さらに生存日数を比較すると分泌型 PF 4 発現ウイルスベクター投与群で有意な生存延長が認められた (図 4)。

分泌型 PF 4 自身は、直接腫瘍細胞に対する殺細胞効果は認められず、PF 4 治療群より得られた黄色腹水中にもコントロール群と同様、浮遊する腫瘍細胞は認められた。

以上の結果より血管新生抑制因子の遺伝子治療は、腹水産生腫瘍に対して腹水産生と出血量を抑え、その結果延命効果が得られることが示唆された。浮遊する腫瘍細胞に対する殺細胞効

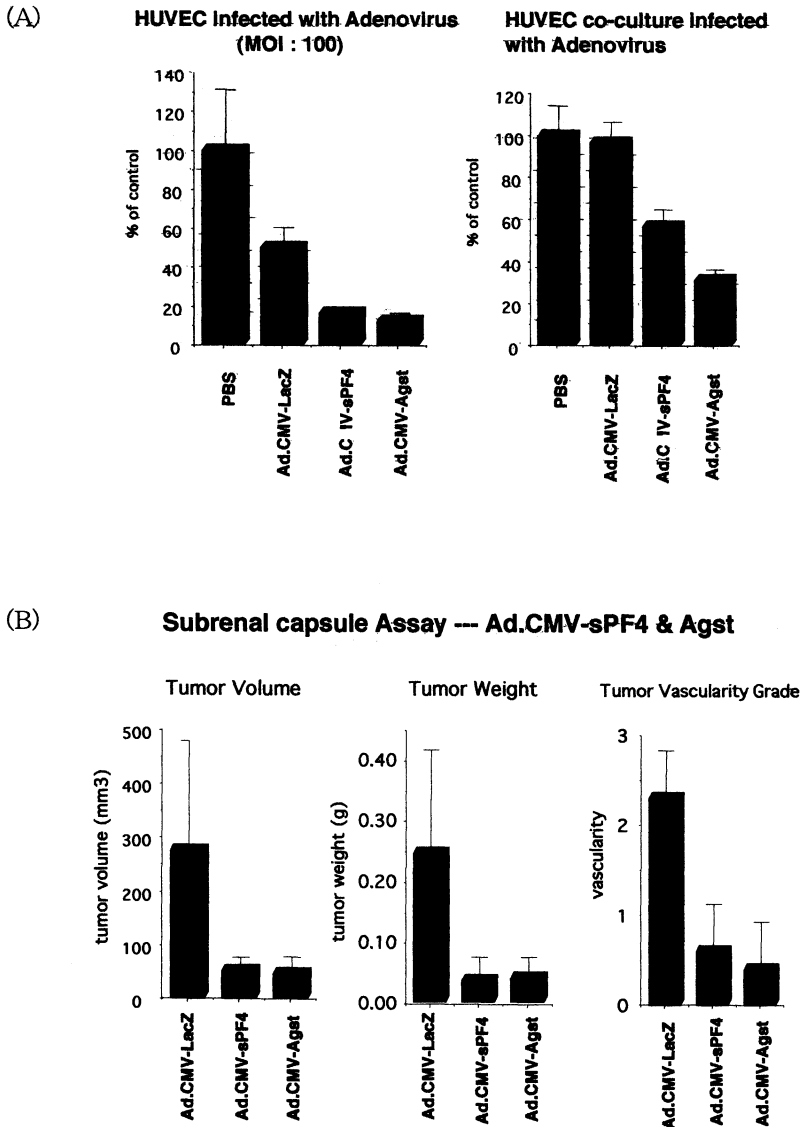


図 3 アデノウイルスベクターによる分泌型血管新生抑制因子の遺伝子導入

(A) 3H-チミジン取り込みによる内皮細胞増殖抑制効果: PF4 や Agst (アンジオスタチン) を導入した腫瘍細胞と HUVEC を Boyden chamber を用いて混合培養し, 3H-チミジンの取り込み能を比較した. アデノウイルスベクターによりそれぞれ遺伝子導入された細胞より分泌された PF4 やアンジオスタチンにより内皮細胞の増殖が 40~60% 抑制された.

(B) subrenal capsule assay: 分泌型 PF4, アンジオスタチン発現アデノウイルスベクターとグリオーマ細胞 (野生株) をヌードマウスの腎臓の被膜下に顕微鏡を用いて生着させたもの. 2週間後, 腎臓を摘出し腫瘍容積, 重量, 肉眼的血管新生所見を比較検討した. コントロールの血管, 壊死に富んだグリオーマに比べ, 分泌型 PF4, アンジオスタチン遺伝子導入グリオーマでは, 白く小さい腫瘍塊であり, 血管新生抑制効果を介して腫瘍増殖が抑制されたことがわかる.

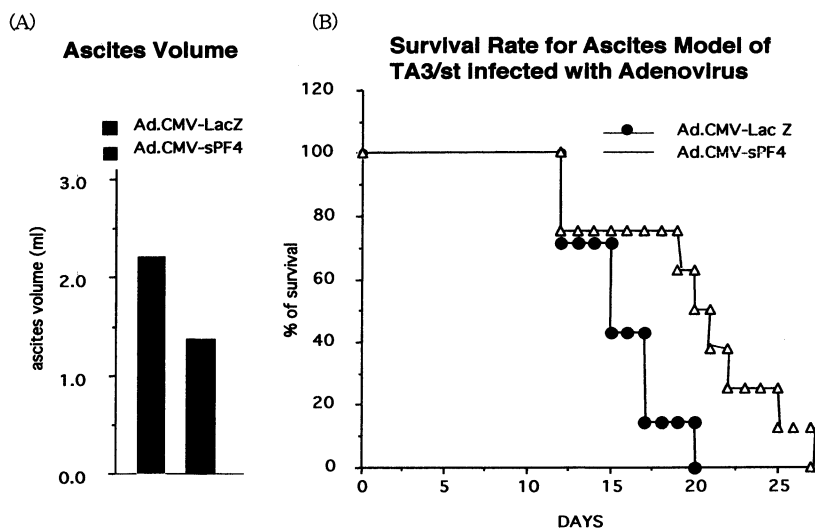


図4 分泌型 PF 4 遺伝子導入による腹水産生腫瘍に対する抗腫瘍効果  
 (A) 腹水産生抑制効果：血性腹水産生乳癌細胞（野生株）をヌードマウスの腹腔内に生着させ、分泌型 PF 4 発現アデノウイルスベクターを投与し 10 日目に腹水を採取した。PF 4 治療群で有意な腹水産生抑制効果が認められたと同時に黄色腹水であった。  
 (B) 生存日数の比較：腹水産生乳癌細胞（野生株）をヌードマウスの腹腔内に生着させ、分泌型 PF 4 発現アデノウイルスベクターを投与すると有意な延命効果が認められた。

果はないことから本治療は anchorage dependent な腫瘍に対し有効であると考えられ、腹壁に浸潤する腫瘍に対する抗腫瘍効果を現在、詳細に検討中である。ウイルスベクターを用いた抗血管新生遺伝子療法は、脳腫瘍のみならずさまざまな腫瘍に対して有効な治療法になり得るであろう。

### おわりに

これまでに報告のあるベクターを用いた遺伝子導入による抗血管新生療法—antiangiogenic gene therapy—の一覧である（表 1）<sup>5)</sup>。VEGF 受容体に対して拮抗するもの、シグナル伝達経路を遮断するもの、またわれわれが報告してきた血管新生抑制因子を導入する手法などがある。いずれの報告でも共通しているのは比較的小分子量が小さく、また分泌可能である点であり、これによりオートクライン、パラクラインの経

路で抑制することが可能になることが期待できる。また angiostatin, endostatin を代表とする内因性の血管新生抑制因子の一覧（表 2）に共通していることは、血小板第 4 因子以外はいずれも本来生体中に誰もが持っているタンパクが何らかの酵素により 1 部のフラグメントに切断され、それが強力な血管新生抑制物質になりうるということである。元とはまったく性質の異なった作用をもつという点が興味深い。さらに血小板第 4 因子でさえも白血球などから放出されるプロテアーゼにより開裂が生じもとの物質より 50 倍の活性が高まることが報告されている。このように人体には“strong medicine”が隠されている。

腫瘍の“two compartment therapy”ともいえるべき腫瘍組織は腫瘍細胞と血管内皮細胞で構成されており、その共存ネットワークを遮断することが大切であり、抗血管新生療法が現在行われている化学療法、放射線療法、免疫療法な

表1 Anti-angiogenesis gene therapy

Gene	Vector System	Therapeutic Model
Thrombospondin-1	Calcium phosphate	ex vivo transfection to breast cancer cells and inoculation to nude mice
Dominant negative FLK-1 mutant	retroviral vector	<i>in vivo</i> transduction to various primary tumor model in nude mice
VEGF antisense	oligonucleotide	ex vivo transfection to glioma cells and inoculation to nude mice
soluble platelet factor 4	adeno and retroviral vector	<i>in vivo</i> transduction to established glioma model in nude mice
angiostatin	adeno and retroviral vector	<i>in vivo</i> transduction to established glioma model in nude mice
soluble Flt-1 receptor	adenoviral vector	<i>in vivo</i> transduction to colon and fibrosarcoma in mice
soluble Tie-2 receptor	adenoviral vector	<i>in vivo</i> transduction to breast cancer and melanoma in mice

表2 Endogenous inhibitor of angiogenesis internal fragment of peptide

fragment	Molecular weight	substrate
Fibronectin	29 kD	550 kD fibronectin
Prolactin	16 kD	N-terminal fragment of 23 kD prolactin
Thrombospondin-1	70 kD	Type 1 repeat of 450 kD TSP-1
Angiostatin	38 kD	Kringle 1~4 of 180 kD plasminogen
SPARC	Fragment 4.2	Asp 254-Gly 273 of 43 kD SPARC
Platelet factor-4	7.8 kD	Platelet factor-4 (split Thr 16-Ser 17)
EGF	Fragment 33~42	EGF (fragment 33~42)
Endostatin	20 kD	C-terminal fragment of collagen XVIII
Plasminogen K 5	13 kD	Kringle 5 of 180 kD plasminogen
Prothrombin K 2	22 kD	66 kD prothrombin split by factor Xa

どと一緒に組み合わせて行う新たな adjuvant therapy の一手段として有用であると期待される。

#### 文 献

- 1) O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al.: Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-328, 1994.
- 2) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al.: Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285, 1997.
- 3) Tanaka T, Manome Y, Wen PY et al.: Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nature Med* **3**: 437-442, 1997.
- 4) Tanaka T, Cao Y, Folkman J et al.: Viral vector-mediated antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* **58**: 3362-3369, 1998.
- 5) 田中俊英: 血管をターゲットにした腫瘍治療. *組織培養工学* **25**(5): 186-191, 1999.