

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間： 2007～2008
課題番号： 19790553
研究課題名（和文）
Delta-like 4 中和抗体を用いた肺癌治療に関する研究
研究課題名（英文）
The Mechanism of Novel Delta-like 4 neutralizing antibodies to lung cancer
研究代表者
浅田 成紀（ASADA MASANORI）
東北大学・病院・助教
研究者番号： 20396477

研究成果の概要：
肺癌治療では、抗VEGF抗体など血管新生阻害剤が進行性肺癌の化学療法に併用されるが、これらの血管新生阻害剤はすべての肺癌に効果はなく、また、効果があったとしてもいずれ再発する。本研究で明らかにできたことは、新規Delta-like 4(Dll4)中和抗体がマウス肺扁平上皮癌と腺癌において腫瘍縮小作用があること、NotchシグナルだけではなくEphrinB2を介して非生産的血管形成をおこし腫瘍増殖を抑える作用である。Dll4中和抗体がヒトの様々な癌治療でも有効である可能性がある。

交付額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学、呼吸器内科学

キーワード： 肺癌、血管新生、腫瘍血管阻害抗体、Delta-like-4 中和抗体

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦において癌死の1位であり、特に進行性肺癌は肺癌診断時の4割から6割にのぼり、現在の最先端の医学をもってしても、根治できない。しかしながら、進行性肺癌において、さまざまな化学療法、分子標的治療薬が使用できるようになり、現在のターゲットととして、腫瘍血管阻害剤があげられる。腫瘍血管の阻害剤として、すでに VEGF 抗体、VEGF 受容体抗体などが臨床で使用されているが、すべての進行性肺癌に効果がある訳ではなく、また、耐性化した肺癌も見られることから次世代の腫瘍血管阻害の確立

が急務であった。そこで、私どもは Notch シグナルが血管新生に VEGF 以上に関与していることから、Notch リガンドのひとつである Delta-like4 中和抗体が肺癌治療に使用できる可能性について検討した。

2. 研究の目的

腫瘍血管阻害剤の新たな治療法の開発

3. 研究の方法

腫瘍増殖モデルマウスに Delta-like4(Dll4) 中和抗体を投与し、腫瘍増殖の変化をみる。また、Delta-like4 中和抗体は Notch シグナルを阻害することから、腫瘍血管新生なども

検討する。

4. 研究成果

Delta-like4(D114) 中和抗体（順天堂大学
八木田准教授より譲渡）を検討した。

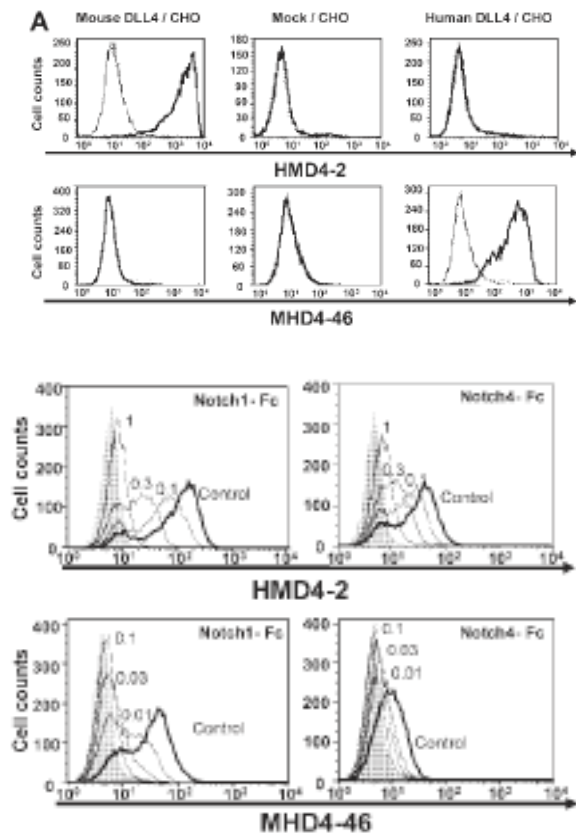


図 1

図 1 のように、HMD4-2 抗体は、マウス D114 を CHO 細胞に発現させた細胞には結合するが、ヒト D114 を CHO 細胞に発現させた細胞には結合しなかった。HMD4-2 抗体で細胞をブロッキングすると Notch1 は D114 に結合できなかったが Notch4 は結合できた。以上のことから、HMD4-2 抗体はマウス D114 に特異的な中和抗体であった。同様に MHD4-46 ではヒト D114 を CHO 細胞に発現させた細胞には結合するが、マウス D114 を CHO 細胞に発現させた細胞には結合しなかった。MHD4-46 抗体で細胞をブロッキングすると Notch1 は D114 に結合できなかったが Notch4 は結合できた。以上のことから、MHD4-46 抗体はヒト D114 に特異的な中和抗体である。

次に上記の Delta-like4(D114) 中和抗体を肺癌モデルマウスに投与した。

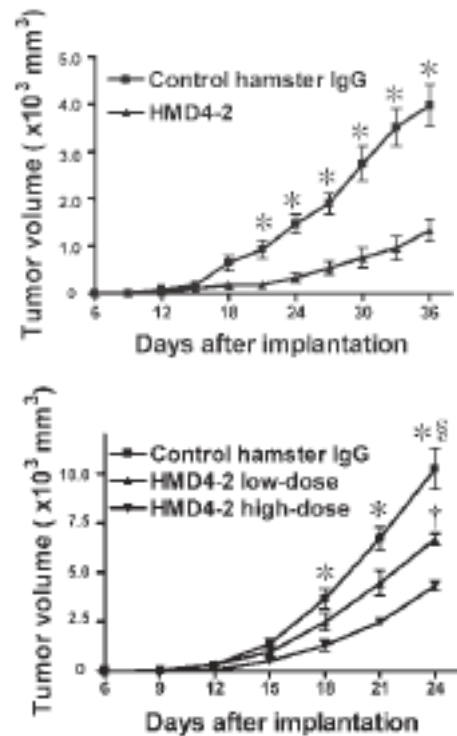


図 2 KLN205

図 2 のように D114 中和抗体投与群では明らかにマウス腺癌（KLN205、図 3 上図）とマウス肺扁平上皮癌（LLC、図 3 下図）腫瘍の増殖が抑えられた。

次に腫瘍の病理標本を作成し、腫瘍血管を染色し血管の面積を計測した（図 3）。

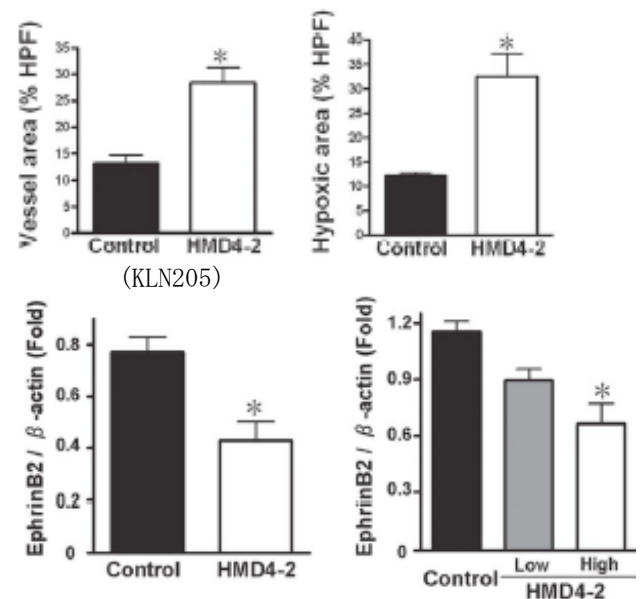


図 3 (LLC)

図 3 のように D114 中和抗体投与群では有意

に腫瘍血管が増えていた。そこで、組織に十分に血流が有るかどうかを検討するため、血流が十分にいかないことをみる低酸素状態を検討した。しかしながら、血管が多いD114中和抗体投与群では腫瘍内の低酸素エリアが増大していた。そこでこの矛盾する現象を説明するためにさらなる解析を行った。

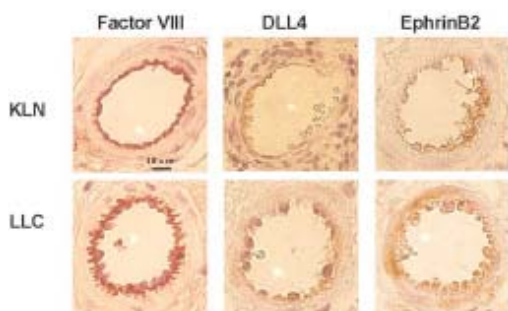


図 4

図 4 で示すように、D114, EphrinB2 は腫瘍血管内皮細胞に発現していた。また、D114 中和抗体投与群ではあきらかに EphrinB2 が抑制されていた。EphrinB2 は血管の発達、増殖に重要な役割をもっており、D114 中和抗体にて EphrinB2 も阻害され、血流の無い血管（非生産的血管増生）が起きていることが示唆された。より、この現象を観察するためにヒト血管内皮細胞 (HUVEC, HMVEC) を用いて検討した。

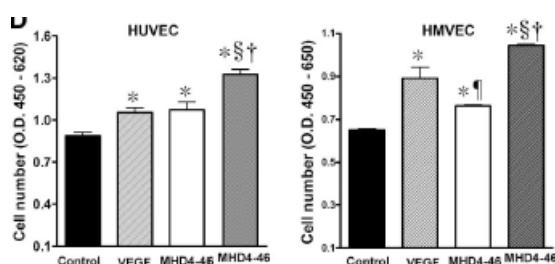


図 5

図 5 で示すように血管内皮細胞においては VEGF とともに D114 中和抗体は血管内皮細胞の増殖因子として作用していた。

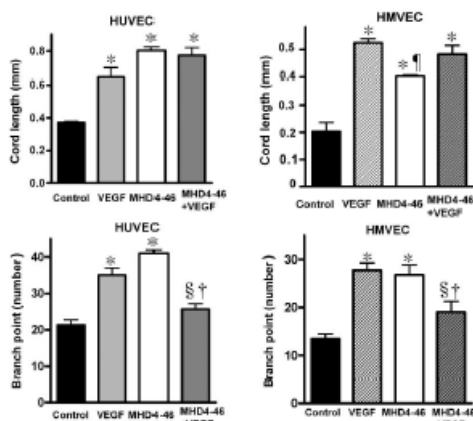


図 6

ヒト血管内皮細胞を用いて血管形成の実験を引き続き行ったところ、血管内皮細胞は大きくなるが枝分かれが起きず、非生産的血管形成が起きることが示された。

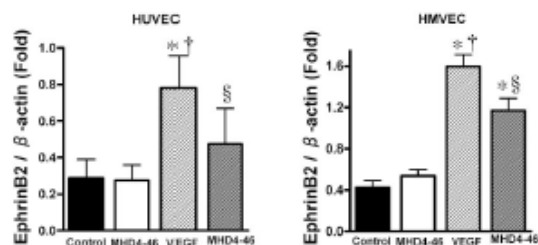


図 7

この時、図 7 のように EphrinB2 の発現も抑制された。以上のことから、D114 中和抗体は D114 のシグナルだけでは無く、EphrinB2 のシグナルの抑制も示唆された。

さらに、ヒト血管内皮細胞において siRNA を使い、EphrinB2 の発現を抑制させたところ、D114 中和抗体を投与したときと同じ現象が観察された。

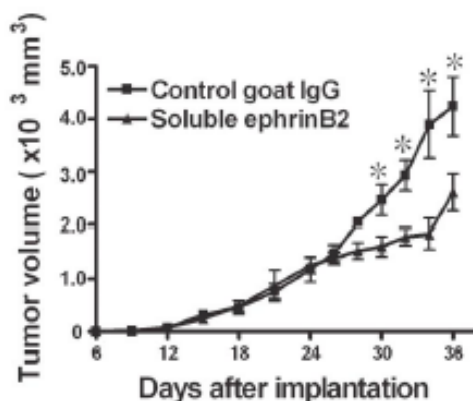


図 8

次に EphrinB2 阻害剤抗体を肺癌モデルマウスに投与したところ、腫瘍増殖は抑制された (図 8)。

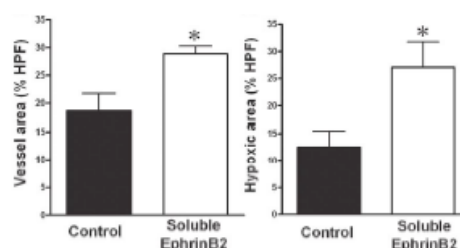


図 9

そのメカニズムとしては D114 中和抗体を投与したときと同様に非生産的腫瘍血管増殖による腫瘍の抑制効果であった (図 9)。以上のことから、D114-Notch シグナルが EphrinB2 の上流にあり、D114 中和抗体はこ

これらの血管増殖因子のシグナルを止め、腫瘍血管に致命的な血流不全をおこさせ、腫瘍を抑制すると考えられた。これらの知見はこれからヒトへの応用が考えられている D114 中和抗体の基礎的なデータとなる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

矢満田 慎介、海老原 覚、浅田 成紀他 7 名、 Role of ephrinB2 in non-productive angiogenesis induced by Delta-like 4 blockade. Blood 2009;113:3631-3639. 査読有り.

浅田 成紀他 6 名、 Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. Neoplasia 2009;4:408-417. 査読有り.

岡崎 達馬、海老原 覚、浅田 成紀他 3 名、 Erythropoietin promotes the growth of tumors lacking its receptor and decreases survival of tumor-bearing mice by enhancing angiogenesis. Neoplasia 2008;9:932-939. 査読有り.

〔学会発表〕(計 1 件)

矢満田 慎介、浅田 成紀他 4 名、 Role of ephrinB2 in non-productive angiogenesis induced by Delta-like 4 blockade. 米国胸部疾患学会 2007 年 5 月 20 日、サンフランシスコ (米国)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 成紀 (Asada Masanori)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20396477