

令和元年6月10日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15459

研究課題名(和文) 抗癌剤増感作用をもたらす腫瘍内血管再構築機構の解明

研究課題名(英文) The effects of PHD inhibitor on tumor blood vessel normalization

研究代表者

松永 慎司 (Matsunaga, Shinji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30704910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、PHD阻害薬による腫瘍血管の新生・再構築機構を明らかにすること目的に行った。PHD阻害薬投与により変化する細胞集団の一つとして、血管新生に関与しているマクロファージ(Mφ)を見出した。これらの腫瘍内Mφの詳細解析により、PHD阻害薬投与後の腫瘍内Mφにおいて血管再構築に関与している分画を同定した。同定したMφ分画を単離し、マウス移植腫瘍へ投与することで血管再構築が生じることが示唆された。これらの結果からPHD阻害薬による腫瘍内血管構築には同定したMφ分画が関わっていることが示唆された。また本研究結果から、腫瘍血管を機能的に再構築するには同定した細胞分画が必要な因子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は腫瘍内血管を再構築し、効率的な抗癌剤治療を行うための治療法の開発に繋がること期待される。また、既存の抗癌剤治療の効果を上昇させつつ、抗癌剤の投与量の低減にも寄与し、副作用の軽減にも繋がる考える。さらに、抗癌剤投与量の低減は増大する医療費の抑制にも貢献するものとする。また、本研究で使用したPHD阻害薬は現在、第Ⅲ相臨床試験中の薬剤であるためヒトへの安全性などが明らかになっており、本研究で得られた知見は臨床へ応用しやすいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal the mechanism of tumor blood vessel normalization which enhance chemo-sensitization by PHD inhibitor treatment. We identified macrophage as associating with blood vessel normalization after PHD inhibitor treatment. These macrophage population were analyzed in detail and characterized. Identified macrophage fractions were isolated from the transplanted tumors and injected to other mouse transplanted tumors. It was exhibited that tumor vessel normalization was occurred in the injection of PHD inhibitor treated tumor macrophage. The identified macrophage fraction is considered to be a necessary factor to functional tumor blood vessel normalization. We hope that these results lead to the development of therapeutics for the normalization of tumor blood vessels and efficient anticancer drug treatment.

研究分野：腫瘍

キーワード：血管再構築 腫瘍 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内の血管は正常な血管と異なり、脆弱かつ不規則に走行しており血流にも乏しい。さらに間質圧の上昇、低酸素、低栄養といった腫瘍組織特異的な組織環境が形成されている。血管血流の障害が原因のこのような環境は抗癌剤治療において薬物送達効率を低下させるだけでなく、癌細胞の抗癌剤抵抗性獲得の一因となっており、抗癌剤治療を困難なものとしている。血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害剤であるベパシズマブは種々の癌種に適応されている。血管新生阻害剤の作用点は腫瘍への栄養供給を行う血管を断つことであるが、近年の臨床研究結果から血管新生阻害剤は全ての血管を遮断するのではなく、新生血管の形成の抑制と脆弱微小血管の除去を行い、そして、一部の既存の血管を正常化させると報告がなされている (文献 1)。また、腫瘍内微小環境での血管新生が生じる組織は、血流が乏しく、低栄養、低酸素環境と考えられる。これらのことから、VEGF に代表される血管新生阻害剤投与では血流改善が生じる部分がある反面、一部では血流障害によりさらに腫瘍内微小環境を悪化させる側面もあると推察される。さらに、低酸素環境は癌幹細胞の存在に適した環境とも言われており、血管新生阻害剤により癌細胞を兵糧攻めにする一方、癌幹細胞生存に適した環境を作り、再発や難治性腫瘍の温床となる可能性がある。これまでの研究結果から皮膚創傷治癒モデルマウスにおいてプロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害薬を投与により血管新生が促進され、創傷治癒が迅速に行われることを明らかとなっている (文献 2)。血管新生阻害剤とは異なるアプローチとしてこの現象が腫瘍組織への正常血管走行と血流回復および薬物送達効率を向上させると考え PHD 阻害薬を癌治療へ応用可能ではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

これまでの研究結果からマウス腫瘍移植モデルに、PHD 阻害薬を投与することにより腫瘍内血管の新生・再構築が生じ、血液漏出の低下、血流回復および組織内薬物動態が改善されることさらに、PHD 阻害薬投与後に抗癌剤を低用量投与した場合においても、PHD 阻害薬投与群では有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。これらの研究結果より本研究は PHD 阻害薬による抗癌剤感受性を増強する腫瘍血管の新生・再構築機構を明らかにすることを目的としている

### 3. 研究の方法

- (1) 腫瘍移植モデルマウスにおける PHD 阻害薬による腫瘍血管正常化の確認・評価  
Lewis 肺癌細胞株を C57BL/6J マウス皮下に移植後 10 日目に PHD 阻害薬 FG-4592 を 120 mg/kg 腹腔内投与し、その後 6 日目に腫瘍組織内の血管の評価を行った。評価項目は腫瘍内の血管密度の変化、血管内皮マーカーである CD31 陽性面積率、タイトジャンクション形成率を蛍光免疫染色およびその画像解析により行った。
- (2) PHD 阻害薬投与により腫瘍組織内で変化する細胞集団の解析  
PHD 阻害薬投与後の腫瘍を摘出し、単細胞化を行い、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカーによる解析を行った。
- (3) 変化した細胞集団の性状解析  
PHD 阻害薬投与後の腫瘍内で変化した細胞について細胞表面マーカーをフローサイトメーターにて解析を行った。また、薬剤の全身性への影響および変化した細胞より分泌されるサイトカインの影響を評価するために、血中サイトカイン量をマルチプレックスイムノアッセイシステムにより測定を行い評価した。
- (4) 単離した細胞による血管新生・再構築に対する評価  
同定された細胞集団の単離を行い腫瘍移植モデルマウスに移植し、腫瘍組織内の血管構造について蛍光免疫染色をおこない評価・検討を行った。

### 4. 研究成果

- (1) 腫瘍移植モデルマウスにおける PHD 阻害薬による腫瘍血管正常化の確認・評価  
腫瘍移植モデルマウスに対し、120 mg/kg の FG-4592 を投与した腫瘍組織において腫瘍血管数の低下および血管腔の拡張が FG-4592 投与群において有意な変化を認めた (図 1)。また、血管の成熟化評価として FG-4592 投与群の腫瘍組織内の血管における血管内皮間のタイトジャンクションの指標である ZO-1 の陽性面積の増加および周皮細胞マーカーの NG-2 陽性面積の増大が観察された。FG-4592 投与により血管構造の変化および、腫瘍血管構造の正常化 (成熟化) が示唆された。

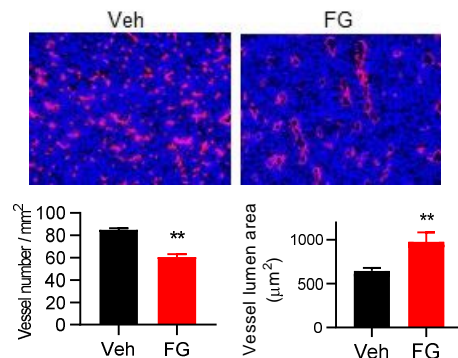
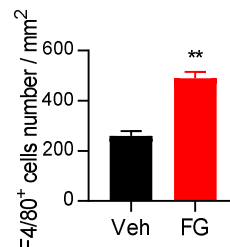


図 1. PHD 阻害薬投与による腫瘍血管構造変化

- (2) PHD 阻害薬投与により腫瘍組織内で変化する細胞集団の解析

PHD 阻害薬投与により変化する細胞集団をフローサイトメトリーを用いて解析を行った。腫瘍組織内の血管内皮細胞、繊維芽細胞などについて検討を行った結果、免疫細胞であるマクロファージ (CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80 陽性細胞) が増加することが示唆された。また、摘出腫瘍組織の免疫蛍光染色による解析・評価においても同様にマクロファージの増加が示唆された (図 2)。



### (3) 変化した細胞集団の性状解析

PHD 阻害薬投与後に変化したマクロファージの細胞集団について詳細な解析を行った。マクロファージの集団を Ly6C により分画すると、Ly6C 陰性細胞集団比率の低下が認められた。また、FG-4592 投与による全身への影響を評価するため、血液中のサイトカインの評価を行った。FG-4592 投与後 48、144 時間後血液中の種々のサイトカインについて評価を行ったが有意な変化は認められなかった。このことから FG-4592 の血管構造変化に対する作用は全身性の作用よりも局所的な作用による影響が強いと推察された。

図 2 . PHD 阻害薬投与後の腫瘍内マクロファージ数

### (4) 単離した細胞による血管新生・再構築に対する評価

FG-4592 投与による腫瘍血管再構築に対しマクロファージが関与しているか否かを確認するために FG-4592 処置前にリポソーム封入クロドロネートを投与することにより組織内マクロファージを除去することで評価を行った。その結果リポソーム封入クロドロネートを投与し、マクロファージを除去すると FG-4592 投与による血管再構築は生じなかった。

FG-4592 投与により変化が生じたマクロファージ集団の腫瘍血管構築に対する影響を評価するために Ly6C 陽性・陰性マクロファージの単離を行い、それぞれの細胞集団を腫瘍組織に移植後、血管構造変化について解析を行った。Ly6C 陽性集団移植腫瘍では腫瘍内血管構造変化に有意差は認められなかったが、Ly6C 陰性集団移植腫瘍においては血管密度の有意な低下が認められ、血管腔においては FG-4592 処置腫瘍より単離したマクロファージを移植した腫瘍組織において有意な増大が認められた (図 3)。FG-4592 処置腫瘍より単離した Ly6C 陰性マクロファージ移植群では Vehicle 処置腫瘍より単離した Ly6C 陰性マクロファージ移植群に比し、腫瘍血管構造がより変化する傾向が認められた。

これらの結果から PHD 阻害薬による腫瘍血管正常化には腫瘍内 Ly6C 陰性マクロファージ集団が関与していることが明らかとなった。

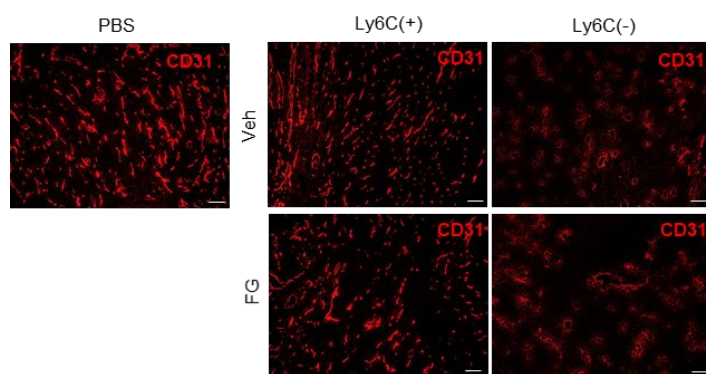
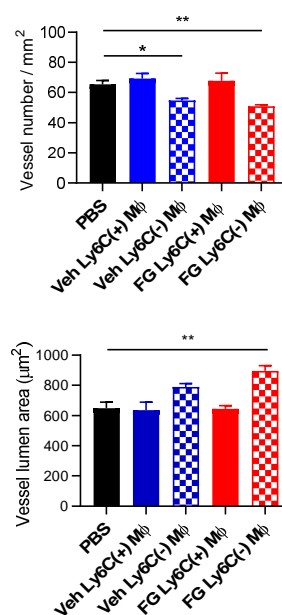


図 3 .PHD 阻害薬処置腫瘍より単離したマクロファージを腫瘍組織へ移植した組織の血管構造評価



### 引用文献

Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* (2005) 307, 58-62

Takaku M, Tomita S, Kurobe H, et al. Systemic preconditioning by a prolyl hydroxylase inhibitor promotes prevention of skin flap necrosis via HIF-1-induced bone marrow-derived cells. *PLoS One*. (2012) 7(8), e42964

Koyama S, Matsunaga S, Imanishi M, et al. Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse

model. *Sci Rep.* (2017) 7, 45621

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

なし

〔学会発表〕(計 3件)

松永慎司, 薬剤誘導性腫瘍血管正常化は抗癌剤感受性を増強させる。2018年3月25日-28日, 日本薬学会第138年会, 金沢

Shinji Matsunaga, Shunji Nishide, Masayuki Shiota, Takehiro Yamaguchi, Shojiro Kitajima, Katsuyuki Miura and Shuhei Tomita. Prolyl Hydroxylase inhibitor repaired chemo-sensitivity through tumor blood vessel normalization in tumor mouse model. July 1-6, 2019, 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto

松永慎司, 富田修平, The effect of PHD inhibitor on tumor microenvironment and tumor immune response. 2019年3月14日-16日, 第92回日本薬理学会年会, 大阪

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/dept-pharmacology/> link

## 6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 富田 修平

ローマ字氏名: TOMITA, shuhei

研究協力者氏名: 塩田 正之

ローマ字氏名: SHIOTA, masayuki

研究協力者氏名: 西出 峻治

ローマ字氏名: NISHIDE, shunji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。