

論文要旨

Roxithromycin inhibits angiogenesis of human hepatoma cell in vivo by suppressing VEGF production

ロキシスロマイシン(RXM)は in vivo において VEGF 産生を
抑えることでヒト肝癌細胞の血管新生を抑制する

青木 大

はじめに

14員環系マクロライド抗生剤であるロキシスロマイシン(RXM)は広域スペクトルの抗菌作や免疫調節作用を有する。その他に、慢性炎症性肺疾患などに対し抗炎症作用も報告されている。さらに最近では、抗腫瘍効果や抗血管新生作用を有することが注目されている。しかしながら hypervascular な腫瘍として知られるヒト肝癌において RXM が血管新生を抑制するかは十分には解明されていない。今回ヒト肝癌細胞における RXM の血管新生抑制を in vivo で検討した。

材料および方法

1. 細胞、動物、薬剤

ヒト肝癌細胞の cell line である HepG2 細胞を M199 媒液で培養し使用した。in vivo モデルには BALB/c マウス(7 週齢、雄)を使用した。RXM(エーザイ, 東京)とともに、よく知られた血管新生抑制剤 TNP-470(武田, 大阪)を対比試験として使用した。

2. 腫瘍血管新生阻害

in vivo の腫瘍血管新生モデルとして Mouse dorsal air sac model を作成した。BALB/c マウスの背部皮下に空気を注入しスペースを作り、HepG2 細胞($2.0 \times 10^5/150 \mu\text{ml}$ PBS)を入れた millipore chamber を埋め込んだ。RXM(40 & 100mg/kg/day)と TNP-470 (50mg/kg/day)を 12 時間毎 5 日間・腹腔内投与した(n=6)。5 日後に屠殺し背部皮下にできた新生血管(3mm 以上で蛇行)を指数化した。

3. RXM の HepG2 細胞に対する影響

RXM の存在下(1~1000 μM)で HepG2 を 48 時間培養し、その細胞障害(毒性)を MTT assay で確認した。

4. RXM による HepG2 細胞の VEGF 産生抑制

RXM 存在下(1~100 μM)で HepG2 細胞を 24・48・72 時間培養しその培養液中の VEGF 量を ELISA 法で定量化した。

5. RXM による HepG2 細胞の VEGF-mRNA 発現抑制

RXM 存在下(1~100 μ M)で 48 時間培養後の HepG2 細胞を AGPC 法に従い total RNA を抽出した。そして、その total RNA を電気泳動後ナイロン膜に転写し 5' -[α -³²P]-dCTP でラベルしたヒト VEGF cDNA プローブとハイブリダイゼーション後得られたイメージプレートより遺伝子発現を検討した(Northern blot analysis)。

結果

- 1) Dorsal air sac model において、RXM 40mg/kg 投与群(3.3 \pm 0.82)、RXM 100mg/kg 投与群(3.0 \pm 0.89)および TNP-470 50mg/kg 投与群(2.2 \pm 1.17)は、Control 群(5.2 \pm 0.98)に比べ有意(p<0.05)に血管新生が抑えられた。PBS のみの chamber を入れたマウスには血管新生は認められなかった。RXM 投与中マウスは健康で毒性の変化や体重減少は認められなかった。
- 2) RXM 濃度が 100 μ M までは HepG2 細胞に細胞障害は認めず。それを超えると毒性が出現した。100 μ M が最大安全量と考えられた。
- 3) RXM 100 μ M 添加により、培養液中 VEGF 濃度は有意に抑制された。
- 4) RXM 100 μ M 添加により、HepG2 の VEGF-mRNA の発現が明らかに減弱した。

考察

マクロライド系抗生物質は IL-4 の産生や IL-12 の産生誘導を通して、マクロファージや NK 細胞など免疫細胞を賦活化することにより抗腫瘍効果を起こすとの報告がある。また腫瘍細胞、白血球などの浸潤に関係する IL-8 の抑制効果などの報告がある。今回、RXM は Dorsal air sac model において、容量依存的に HepG2 細胞の血管新生を抑制した。RXM 100mg/kg 投与の場合には、TNP-470 50mg/kg 投与と同等の効果を有すると考えられた。in vitro でも、HepG2 の VEGF の産生抑制を認め、これは mRNA レベルで抑制されていた。我々の報告は、マクロライド系抗生物質がヒト肝癌にも有用である可能性を明らかにし、またその抗血管新生作用の機序を明らかにしたものである。

この研究結果から、RXM は通常簡便に使用されうる薬剤でもあり、ヒト肝癌に対する臨床応用が期待される。今回の RXM 使用量は、ヒト通常投与量の 10 倍であったことから、至適な投与方法(例えば経肝動脈化学療法や肝動脈塞栓療法などにより高用量をターゲットのみに投与する)の研究・試験も期待される。

(Anticancer Research 25: 133-138, 2005 掲載)

論文審査の要旨

| | | | |
|------|---------------|-------|-------|
| 報告番号 | 医論第 1 4 3 9 号 | 氏名 | 青木 大 |
| 審査委員 | 主査 | 秋山 伸一 | |
| | 副査 | 山田 勝士 | 河野 嘉文 |

Roxithromycin inhibits angiogenesis of human hepatoma cell in vivo by suppressing VEGF production

〔 ロキシスロマイシンは in vivo において VEGF 産生を
抑えることでヒト肝癌細胞の血管新生を抑制する 〕

14 員環系マクロライド抗生剤であるロキシスロマイシン(RXM)は広域スペクトルの抗菌作用や免疫調節作用を有する。その他に、慢性炎症性肺疾患の治療に効果があると報告されたことから抗炎症作用も分ってきた。最近では、抗腫瘍効果や抗血管新生作用を有することが注目されている。しかしながら hypervascular な腫瘍として知られるヒト肝癌においてロキシスロマイシンが血管新生を抑制するかは十分には分っていない。今回ヒト肝癌細胞におけるロキシスロマイシンの血管新生抑制を in vivo で検討した。

1. Dorsal air sac model において、RXM40mg/kg 群(3.3±0.82)、RXM100mg/kg 群(3.0±0.89)、TNP-470 50mg/kg 群(2.2±1.17)は Control 群(5.2±0.98)に比べ有意(p<0.05)に血管新生が抑えられた。PBS のみの chamber を入れたマウスには血管新生は認められず、RXM 投与中マウスは健康で毒性の変化や体重減少は認められなかった。
2. RXM 濃度が 100 μM までは HepG2 細胞に増殖阻害は起こらず、それを超えると阻害した。100 μM が最大無毒性濃度と考えられる。
3. 培養液の VEGF 量は RXM100 μM で産生が抑えられた。
4. VEGFmRNA の発現は RXM100 μM 加えることで明らかに減弱した。

マクロライド系抗生物質は IL-4 の産生や IL-12 の産生誘導を通しマクロファージや NK 細胞の活性化により抗腫瘍効果を起こすと考えられる。また、IL-8 の抑制効果などの報告がある。

今回、RXM は Dorsal air sac model において濃度依存的に HepG2 細胞の血管新生を抑えることが明らかになった。In vitro でも VEGF の産生減弱、mRNA レベルでの抑制があることが分った。ただ今回の血管新生抑制をみとめた量は普段治療で使用する量の 10 倍以上の量である。それゆえ肝臓癌治療への可能性としてリピオドールに溶かし使用する経動脈的化学塞栓術への応用が期待される。

以上のごとく、本研究は RXM が in vivo において VEGF 産生を抑えることでヒト肝癌細胞の血管新生を抑制することを明らかにした。本研究結果は、今後の肝臓癌治療に役立つことが期待され、高く評価されるべきと思われ、学位論文に相当すると判定された。

試験(学力確認)の結果の要旨

| | | | |
|------|---------------|-------|-------|
| 報告番号 | 医論第 1 4 3 9 号 | 氏名 | 青木 大 |
| 審査委員 | 主査 | 秋山 伸一 | |
| | 副査 | 山田 勝士 | 河野 嘉文 |

主査及び副査の3名は、平成18年11月24日、学位申請者 青木 大君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- ① Roxithromycin, TNP-470 存在下での HepG2 細胞の培養液中の VEGF 測定について、サブタイプ別に測定したのか全て混ざったものなのか？

サブタイプ別での測定は行わず、VEGF family member の総量を測定した。VEGF-A は血管内皮細胞の増殖促進と間質における、管腔形成の促進や細胞遊走を引き起こし、個体レベルでは血管新生、血管透過性亢進を誘発する。VEGF-B は VEGFR-1 のみを受容体とするが、このキナーゼ活性が低いことを反映して生物学的活性は弱く *in vitro* の内皮細胞増殖、透過性亢進活性は VEGF-A の 10 分の 1 か、それ以下である。VEGF-C および VEGF-D はリンパ管内皮細胞の増殖・分化、リンパ管新生、リンパ行性転移に関与している。

- ② 病的血管新生と生理的血管新生とでは、例えば蛇行しやすいとか血流速度に差があるのか？

腫瘍などで見られる病的新生血管は壁細胞の内皮細胞への接着が多くの領域で欠失しており、そのために血管の走行は乱れ(不整に拡張、蛇行)、大中小血管の階層性も失われ、無秩序な血管構造を示すようになる。このため正常血管に比べて病的血管は血流が乱れており正常血流とは異なり、血流速度は著しく遅く、かつ不規則である。

- ③ 血管新生阻害剤薬には様々あるが TNP 470 を選択した理由は？

多くの文献報告において使用されており、よく知られた阻害薬であることと、同様の実験で positive control として使用されていたためである。

- ④ TNP-470 の血管新生阻害の作用機序は？

血管形成における過程において内皮細胞を傷害し、それ自体の遊走、増殖・分裂が抑制され、さらには管腔形成が抑制されるため血管新生が阻害される。

- ⑤ 他報告でクラリスロマイシンとロキシスロマイシンを比べた結果、クラリスロマイシンの方が血管新生抑制は強いとの報告があったが、今回なぜロキシスロマイシンを使用したのか？

クラリスロマイシンにはすでに多く報告例があることと、共同研究者と共に同薬剤の効果を検討してきたためである。

⑥ HepG2 細胞の VEGF 産生の測定時と VEGFmRNA の測定時のとき、なぜ培養液中の FBS 濃度を 1%としたのか？

FBS 内に存在する様々な growth factor の影響をなるべく排除するためである。

⑦ Dorsal air sac model の観察部位はどこか、またどのような原理で血管新生が起こるのか？

観察部位は皮膚の裏側で chamber の接着面である。実験の原理としては chamber 両側の filter を通して chamber 内 HepG2 細胞が産生する VEGF が滲出することで血管新生が促進される。

⑧ 5%ethanal を control に使う理由は？

control にだけ使用しているのではなく、薬剤の溶媒として使用している。Roxithromycin も TNP-470 も水に溶けにくく使用しづらい。そのため薬剤提供元よりの使用方法に沿って実施した。

⑨ 腹腔内に注入した薬剤の血中濃度はどの程度になるのか？

具体的には検討しておらず、今後の検討が必要と思われるが、ヒト常用量 (6mg/kg) の約 16 倍の投与が行われたことになる。

⑩ MTT assay で 100 μ M が最大安全量としているが、この濃度で細胞活性が非常に低下しているため、以下のデータになったとは考えられないか？

MTT assay のデータ上最大濃度であるため活性がまったく低下していないとは言えないが、このような検討法の場合、100 μ M を最大安全量とする。

⑪ 今回の実験において VEGF 以外の血管新生因子の検討は、その他に血管新生阻害因子の検討は？

IL-8 に対し、ELIZA による検討を行ったが、明らかな差異は認めなかった。他の FGF や PDGF、血管新生阻害因子 Angiostatin, Endostatin についても今後検討する必要があると思われる。

⑫ Roxithromycin は血管内皮細胞に作用するのか？

Roxithromycin が、血管内皮細胞の管腔形成を阻害することが報告されている。

⑬ 今後の臨床応用は？

現在のところ薬剤の提供元であるエーザイ薬品の方でリピオドールに溶解した際の安定性・安全性について検討している。最近さらに発癌過程において NF- κ B 活性の抑制効果による iNOS 活性抑制、NO 抑制効果が報告され chemoprevention の可能性が広がり、今後臨床応用への期待が高まっている

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。