

# 口腔扁平上皮癌に対する血管新生阻害剤の抗腫瘍効果に関する実験的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: 作成者: 柿原, 謙一郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9396">http://hdl.handle.net/2297/9396</a>

## 口腔扁平上皮癌に対する血管新生阻害剤の 抗腫瘍効果に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

柿原謙一郎

口腔扁平上皮癌の血管新生とその阻害剤による抗腫瘍効果を明らかにする目的で、高転移性のヒト口腔扁平上皮癌細胞株 OSC-19 をヌードマウスの口底に移植する正所性移植モデルを用いて実験的に検討した。その結果、移植腫瘍の血管新生は移植後4日目より生じ、それ以後経日的に腫瘍血管は樹枝状から網目状に構築され、血管密度も経日的に増加した。移植腫瘍組織における血管新生因子の発現は血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) は移植後7日目以降に、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) は移植後14日目以降に認められた。また、移植腫瘍における増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の陽性細胞率 (labeling index, LI) は移植後2日目から21日目までほぼ一定の値を示し、腫瘍の増大や血管密度とは関連性が認められなかったが、頸部リンパ節転移率は経日的に高くなる傾向を示し、腫瘍の増大や血管密度との関連性が示唆された。一方、血管新生阻害剤である TNP-470 を移植後4日目より 30 mg/kg の容量で隔日皮下投与したところ、移植腫瘍における血管新生は抑制され、移植後21日目には薬剤を投与しなかった対照群と比較して腫瘍血管密度が有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。また、背部皮下移植腫瘍の相対的体積増加率および口底移植腫瘍の PCNA LI とともに TNP-470 投与群では対照群に比べて有意に低く、TNP-470 の投与により移植腫瘍の増殖が抑制されたことが示された。さらに移植後21日目の頸部リンパ節転移率は対照群の 91.7% に対して、TNP-470 投与群では 40% であり、TNP-470 の投与により頸部リンパ節への転移が抑制された ( $p < 0.025$ )。以上の結果から、口腔扁平上皮癌では腫瘍の増大に伴って血管新生が促進し、頸部リンパ節への転移頻度も高くなることが示され、血管新生阻害剤による抗血管新生療法が口腔扁平上皮癌の増殖と転移を抑制する新しい治療法となる可能性が示唆された。

**Key words** oral squamous cell carcinoma, orthotopic implantation model, cervical lymph node metastasis, angiarchitecture, anti-angiogenic agent

腫瘍細胞が生体内で増殖し続けるためには酸素や栄養などを補給するための新たな血管が必要であり、このため腫瘍細胞は自ら血管新生因子を生産分泌して内皮細胞の増殖と血管の新生を盛んに促していると考えられている<sup>1)</sup>。この血管新生因子としては、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) インターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8)、血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)、腫瘍増殖因子ベータ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) など数多くがこれまで報告されている<sup>2)~6)</sup>。最近の研究では、乳癌<sup>7)</sup>をはじめ子宮内膜癌<sup>8)</sup>、大腸癌<sup>9)</sup>、膀胱癌<sup>10)</sup>でこれらの血管新生因子の発現が認められており、その発現の程度と予後との相関関係が報告されている。さらに腫瘍組織内の血管密度が転移や予後と相関することが乳癌<sup>11)</sup>、食道癌<sup>12)</sup>、大腸癌<sup>13)</sup>など多くの固形腫瘍で示され、血管新生の程度が癌患者の予後を左右する重要な因子であることが次第に

明らかにされつつある。

通常、成人期の生体では血管内皮細胞はよく分化した静止期の状態にあり、子宮および創傷治療過程の組織を除き血管新生は認められない。また、正常血管の内皮細胞の生理的再生に要する時間は数ヶ月から数年の単位であることから、腫瘍組織における血管の新生を抑制することによって固形腫瘍の治療を目指す抗血管新生療法が新たな癌治療法の有力な候補として注目されるようになってきた。現在まで多くの血管新生阻害物質が研究されているが、その中でもアンジオスタチンやエンドスタチン<sup>14)</sup>、サリドマイド<sup>15)</sup>、マリマスタット (BB-2516)<sup>16)</sup>、TNP-470 (AGM-1470)<sup>17)</sup>などによる癌治療の臨床試験が既に欧米において行われており、癌治療薬として認可される日もそれほど遠くはないものと推察される。

一方、口腔癌においても腫瘍血管に関する研究は進められつつあるが、腫瘍血管密度と転移や予後との間に相関を認めたという報告<sup>18)~21)</sup>や逆に相関はないとするもの<sup>22)~25)</sup>もあり、血管

平成10年11月27日受付, 平成11年1月5日受理

Abbreviations : b-FGF, basic fibroblast growth factor; DMBA, 9,10-dimethyl-1, 2-benzanthracene; FBS, foetal bovine serum; LI, labeling index; MEM, minimum essential medium; MTT, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-dophenyl tetrazolium bromide; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor

新生の程度と口腔癌の臨床的悪性度との関係は未だ明らかではない。また、口腔癌に対する抗血管新生療法の効果について検討された報告も少ない<sup>26)</sup>。そこで本研究では、口腔癌における血管新生と腫瘍の増殖や転移との関係を明らかにする目的で、口腔扁平上皮癌の正所性移植モデルを用いて血管新生の経日的な変化を観察するとともに、VEGFとb-FGFの各血管新生因子の発現の様相、および腫瘍血管密度と増殖や転移との関係について検討した。さらに血管新生阻害剤であるTNP-470を用いて、本剤投与による腫瘍の増殖および転移に対する効果について実験的に検討を行った。

## 材料および方法

### I. 細胞株

実験には61歳男性の舌癌患者の頸部リンパ節転移巣より樹立されたヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるOSC-19細胞<sup>27)</sup>を用いた。この細胞は高分化型であり、Yamamotoら<sup>28)</sup>の浸潤様式分類において4C型(結合組織中に索状の腫瘍胞巣を形成し浸潤する)を呈する細胞である。

本細胞をヌードマウスの舌または口底に移植することにより、癌細胞は索状の胞巣を形成して深部組織へ浸潤し、頸部リンパ節へ高率に転移することを当教室のKawashiriら<sup>29)</sup>が報告している。実験では本細胞を10%牛胎児血清(foetal bovine serum, FBS)(CSL, Victoria, Australia)を加えたイーグル最小必須培地(Eagle's minimum essential medium, MEM)(日本製薬, 東京)でインキュベーター内(37°C, 5% CO<sub>2</sub>条件下)において継代培養し、対数増殖期の細胞を必要に応じて実験に供した。また本学第二生化学講座より分与していただいた新生児皮膚血管内皮細胞をFBS, b-FGF, ヘパリンを加えたHuMedia-EB2培地(クラボウ, 大阪)で37°C, 5% CO<sub>2</sub>条件下において増殖抑制実験に用いた。

### II. 実験動物

実験動物には雌, 5週齢のBALB/c-nu/nuヌードマウス(体重15~19g)(日本チャールズリバー, 横浜)60匹を金沢大学医学部動物実験施設内で室温25±2°C, 湿度50±5%, 特定病原体除去(specific pathogen-free, SPF)環境下にて飼育し用いた。

### III. 血管新生阻害剤

血管内皮細胞の増殖に対して強い抑制作用を有するフマギリンの合成誘導体TNP-470(AGM1470)(武田薬品工業, 大阪)を用いた。

### IV. 実験方法

#### 1. 移植腫瘍における血管新生の検討

##### 1) ヌードマウスへの癌細胞移植法

OSC-19細胞を0.25% EDTA(和光純薬, 大阪)及び0.25%トリプシン溶液(Sigma, St Louis, USA)にて単離し, 10% FBS加MEM中で細胞数が $8 \times 10^6$ 個/mlとなるように調整した後, ジエチルエーテル(和光純薬)麻醉下にて26ゲージ針付ディスプレイ注射器(テルモ, 東京)でヌードマウスの口底粘膜下に $2 \times 10^6$ 個, また左側背部皮下に $1 \times 10^6$ 個を移植した。

##### 2) 血管内墨汁注入法

OSC-19細胞移植後2, 4, 7, 14, 21日目の各群6匹中の3匹ずつ, また, 薬剤投与実験では投与群と対照群の各群15匹中の3匹ずつに対し5%ペントバルビタール溶液(大日本製薬, 大阪)をヌードマウスの腹腔内に0.5ml投与し, 全身麻酔を施した上で血管内墨汁注入法を行った。すなわち開胸後, 心尖から

上行大動脈に24ゲージのカテーテル(テルモ)を挿入し5-0絹糸(日本商事, 大阪)で結紮固定するとともに, 左右の心耳を切開し, 血液及び注入剤の流出路を確保した。次に, 40°Cに加温した生理食塩水を90~100 mmHgの注入圧でカテーテルより10分間注入し, 十分に灌流および瀉血を行った。その後, 同じく40°C浸透圧が300 mOsでpH7.4に調節された生体墨汁液(大阪開明社, 大阪)を同圧でカテーテルより20分間注入し, 舌および口腔粘膜が十分染色されるのを確認した。灌流後, 15分間静置し, 口底部組織と頸部リンパ節を摘出した。

#### 3) 組織標本作製法

摘出した組織の固定はペリオデイト-リジン-パラホルムアルデヒド(periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP)固定液にて4°Cで24時間行った。さらに顎骨を含む口底部の組織は0.5 MのEDTA(和光純薬)にて室温で72時間脱灰を行った。その後, 通法に従って4 μmと100 μmのパラフィン連続切片を作製した。4 μmの切片についてはHE染色および免疫組織化学染色を行い, 100 μmの切片は無染色でキシレン(和光純薬)にて透徹し, 透明標本として微細血管像の観察に用いた。

#### 4) 血管密度の算定法

血管密度の算定には血管内墨汁注入法を施行した4 μmのHE染色標本を用いた。すなわち, 腫瘍宿主境界部を無作為に3ヶ所ずつ選び, 400倍顕微鏡下1視野中の墨汁粒子を認める毛細血管の数を測定し, その平均を各腫瘍の血管密度とした。

#### 5) 免疫組織染色

血管新生因子の検討はVEGFとb-FGFについて, また腫瘍細胞の増殖能を検討するために増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)に対する免疫組織染色をそれぞれ行った。すなわち4 μmパラフィン切片をキシレン・エタノール系列にて脱パラフィンし, PCNA染色用切片以外は0.05 M, pH7.6のトリス塩酸塩(Sigma)に0.1%の濃度で溶解したトリプシン(Sigma)液中で37°C 20分間酵素処理した。その後, 0.3%過酸化水素水(大和薬品, 大阪)による内因性ペルオキシダーゼブロックを行い, ウシ血清アルブミン(ダコ・ジャパン, 京都)による非特異的反応のブロック後, それぞれ一次抗体を4°Cで24時間反応させた。一次抗体にはウサギ抗ヒトb-FGFポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, San Diego, USA), ウサギ抗ヒトVEGFポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology), マウス抗ヒトPCNAモノクローナル抗体(ダコ・ジャパン)をそれぞれ30倍, 100倍, 50倍に希釈して用いた。一次抗体の反応後ペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギおよび抗マウスIgG・ヤギ抗体を含有したENVISIONポリマー試薬(ダコジャパン)で室温中で50分間反応させ, 0.1% 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)(和光純薬)で発色させた。核染色にはヘマトキシリン(和光純薬, 大阪)を使用した。また, これらの染色の特異性は, 一次抗体をリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS)(日本製薬)で置換し, 反応が陰性化することで確認した。

#### 2. 血管新生阻害剤による抗腫瘍効果の検討

##### 1) MTTアッセイ

基礎的検討としてTNP-470のOSC-19細胞と新生児皮膚血管内皮細胞のそれぞれに対する細胞増殖抑制試験を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ドフェニルテトラゾリウムブロミド[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-dophenyl tetrazolium bromide,

MTT] アッセイ<sup>30)</sup>を用いて行った。すなわち96穴平板マイクロプレートにOSC-19細胞、血管内皮細胞を1穴あたり $1.5 \times 10^3$ 個それぞれ分注した。TNP-470は0.1%ジメチルスルフォキシド(dimethylsulfoxide, DMSO)(和光純薬)で希釈し、最終的に $10 \mu\text{g/ml} \sim 1 \text{pg/ml}$ の8段階の濃度になるよう2倍濃縮液を作成して1穴あたり $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し細胞と接触させた。37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で4日間培養後、MTTキット(Chemicon, Temecula, USA)を用い、吸光度をマイクロプレートリーダーBio Radモデル550(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ, 大阪)にて測定した。

2) TNP-470の投与スケジュール

移植後4日目よりTNP-470投与群として15匹のヌードマウスの右側背部皮下にTNP-470を3%エタノール(和光純薬)添加5%アラビアゴム生理食塩水(和光純薬)で溶解し30 mg/kgの容量で隔日皮下投与した。また15匹は対照群として右側背部皮下にTNP-470の溶解液に用いた3%エタノール添加5%アラビアゴム生理食塩水単独を隔日皮下投与し、両群とも移植後21日目に犠牲死または血管内墨汁注入法を行い、背部皮下腫瘍、口底腫瘍、頸部リンパ節を摘出した。

3) 移植腫瘍の血管新生に及ぼす影響の検討

100 μmの透明標本を用い、TNP-470投与による血管構築像を対照群と比較検討した。また、血管密度、VEGFおよびb-FGFの発現の程度(腫瘍細胞中における陽性細胞がわずかなものを軽度発現、胞巣の一部が染色されたものを中程度発現、胞巣全体が染色されたものを高度発現として評価)についても比較を行い、TNP-470の投与が移植腫瘍の血管新生に及ぼす影響について検討した。

4) 移植腫瘍の増殖に対する効果の検討

TNP-470の移植腫瘍に対する増殖抑制効果を検討するために背部皮下腫瘍の相対的体積増加率と口底腫瘍におけるPCNA陽性細胞率(PCNA labeling index, PCNA LI)を求めた。すなわち、相対的体積増加率は移植後21日目の腫瘍の体積(長径×短径×高径×π/6)を移植後4日目の同一腫瘍の体積で除し、その平均値とした。PCNA LIは抗PCNA抗体による免疫組織化学染色の標本から腫瘍宿主境界部を無作為に2ヶ所ずつ選び、腫瘍細胞500個に対するPCNA陽性細胞数の百分率を算定し、その平均値とした。対照群とTNP-470投与群の相対的体積増加率とPCNA LIを比較検討し、増殖能に対する効果を判定した。

5) 頸部リンパ節転移抑制効果の検討

ヌードマウス1匹あたり最低4個の頸部リンパ節を摘出し、組織学的に腫瘍細胞を認めたものを転移陽性として、TNP-470投与群と対照群の転移率を求め比較検討した。さらに転移を認めたリンパ節すべてについて転移腫瘍の組織学的進展度を本問の分類<sup>31)</sup>(表1)に従って判定し、頸部リンパ節転移腫瘍の進展に対する効果についても検討した。

6) 副作用の検討

TNP-470投与による副作用を検討する目的でOSC-19細胞の移植後21日目までの両群のヌードマウスの体重を測定し比較を行った。

V. 統計学的解析法

各群間の有意差検定はMTTアッセイについてはT検定にて、移植腫瘍の血管密度および相対的体積増加率とPCNA LIについてはMann-Whitney U検定にて、頸部リンパ節転移についてはFisherの直接確率法にて行い、いずれも5%未満の危険率をも

って有意差ありとした。

成 績

I. 移植腫瘍における血管新生

1. 移植腫瘍の血管構築像及び血管密度

OSC-19細胞移植後2日目では腫瘍細胞の周辺にはまだ血管新生が認められないが、移植後4日目になると移植腫瘍の周辺に新生血管の出現が認められた(図1A)。移植後7日目になると腫瘍宿主境界部の血管は太さを増し、腫瘍内部にも樹枝状の新生血管を認め、さらに移植後14日目には腫瘍内部全域に血管が網目状に形成されていた(図1B)。しかし、移植後21日目には腫瘍の増殖に伴って腫瘍中心部は壊死に陥り、その部位の血管は消失していた。一方、腫瘍・宿主境界部における血管密度(±標準偏差)(図2)は移植後2日目では $15.8 \pm 3.0$ 、移植後4日目では $22.8 \pm 4.3$ 、移植後7日目では $27.7 \pm 3.5$ 、移植後14日目では $38.8 \pm 2.1$ と経時的に増加する傾向にあったが、移植後21日目では $38.5 \pm 3.8$ となり移植後14日目と比較して血管密度の増減は認められなかった(表2)。

2. 血管新生因子の免疫組織化学的発現

VEGFとb-FGFの発現は血管新生が始まる移植後4日目では共に認められず、VEGFは移植後7日目に腫瘍胞巣の一部の腫瘍細胞の細胞質で発現を認め、以後、経時的に腫瘍胞巣中における陽性細胞が増加する傾向にあった。b-FGFは移植後14日目以降に腫瘍胞巣中の大部分の腫瘍細胞の細胞質で発現を認め、移植後21日目においても同様の局在性を示した(図3, 表3)。

3. 血管新生と増殖および転移との関係

腫瘍細胞の増殖能の指標となるPCNA LIは移植後2日目から移植後21日目まで $31.0 \sim 36.3\%$ とほぼ一定の値を示し、有意な変化は認められなかった。また頸部リンパ節転移は移植後7日目から認め、移植後7日目では6匹中1匹(16.7%)に、移植後14日目では6匹中2匹(33.3%)に、移植後21日目では6匹中5匹(83.3%)に組織学的に転移を認めた(表2)。

II. 血管新生阻害剤による抗腫瘍効果

1. 培養細胞における増殖抑制作用

血管内皮細胞、OSC-19細胞ともにTNP-470に対して低濃度から感受性を示し、濃度依存的に細胞数の減少が認められた。すなわち、 $100 \text{pg/ml} \sim 100 \text{ng/ml}$ の濃度においてOSC-19細胞では16.6~22.5%の細胞増殖抑制を認めたのに対し、血管内皮細胞では31.1~39.2%の細胞増殖抑制を認め、 $1 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の濃度では両細胞とも急激に細胞数が減少するという二相

Table 1. Histological staging of metastatic tumor<sup>a)</sup>

Stage	Histological findings
I	Limited to the afferent lymphatic vessel or the marginal sinus
II	Invasion and proliferation from the marginal sinus to the paracortex or the cortical sinus
III	Replacement and disappearance of most of the lymph tissue
IV	Extralympathic invasion and proliferation

<sup>a)</sup> Criteria by Honma.

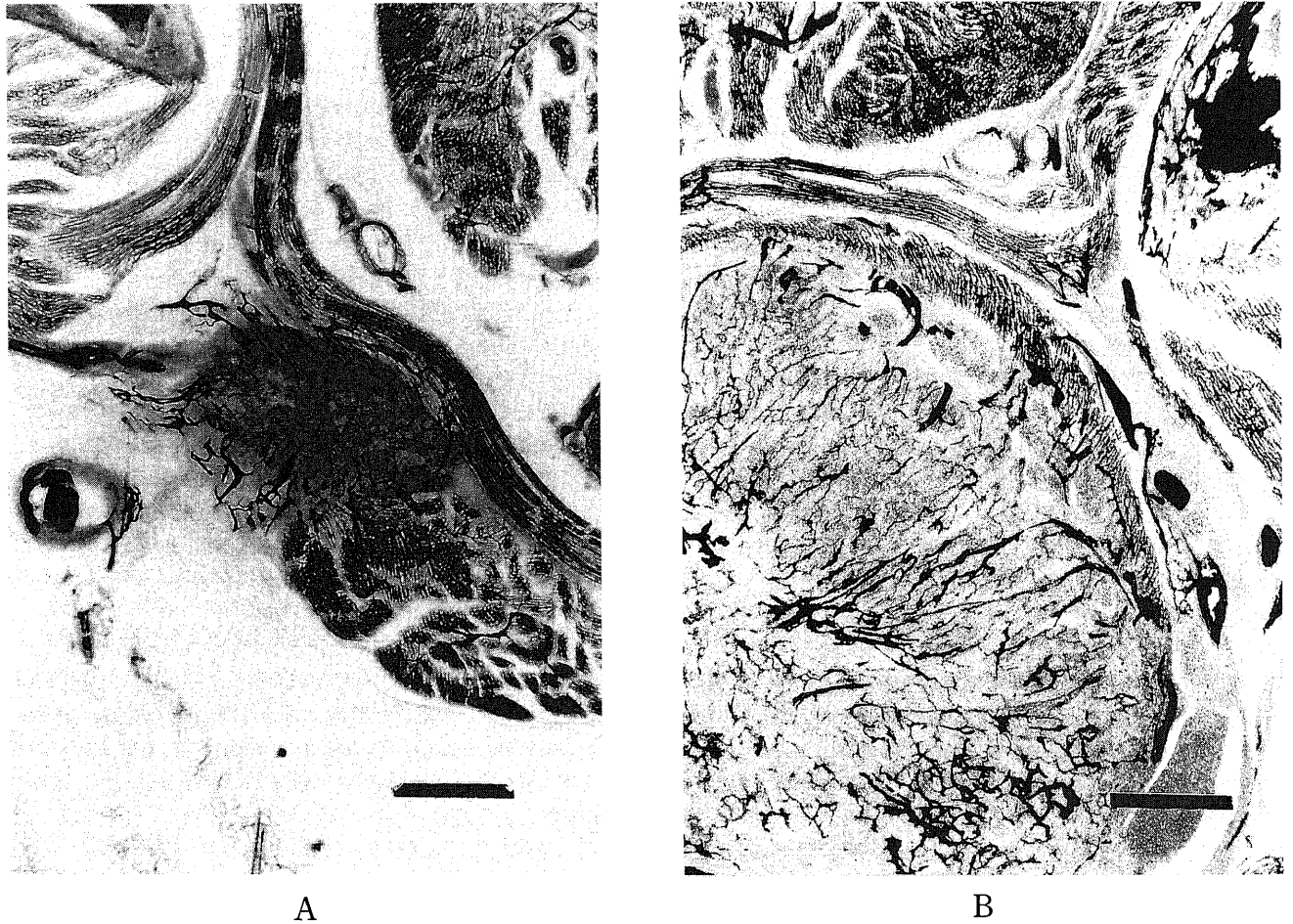


Fig.1. Photomicrographs of the oral floor tumor showing microangioarchitecture by the indian-ink injection method. Tumor angiogenesis was observed at the 4th day postimplantation (A), and 14th day postimplantation (B). Scale bar indicates 500  $\mu$ m.

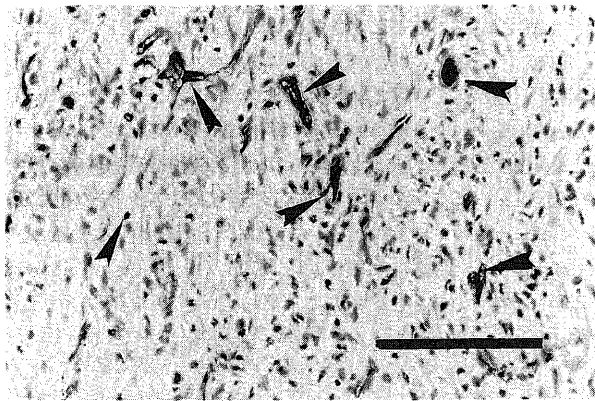


Fig.2. Photomicrograph of the distribution of microvessels in oral floor tumor by the indian-ink injection method. Microvessels are identified as the indian-ink particles (arrow). HE stain. Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

Table 2. Relationship between the vessel density and PCNA LI and incidence of lymph node metastasis

Day of post implantation (days)	Vessel density ( $\bar{x} \pm SD$ )	PCNA LI ( $\bar{x} \pm SD$ )	Incidence of lymph node metastasis (%)
2	15.8 ( $\pm 3.0$ )	35.0 ( $\pm 6.1$ )	0
4	22.8 ( $\pm 4.3$ )	31.7 ( $\pm 1.2$ )	0
7	27.7 ( $\pm 3.5$ )	36.3 ( $\pm 5.5$ )	16.7
14	38.8 ( $\pm 2.1$ )	31.0 ( $\pm 6.6$ )	33.3
21	38.5 ( $\pm 3.8$ )	30.0 ( $\pm 3.6$ )	83.3

Table 3. Relationship between VEGF expression and b-FGF expression

Day of post implantation (days)	Degree of intensity of VEGF expression (%)			Degree of intensity of b-FGF expression (%)		
	Low	Moderate	High	Low	Moderate	High
7	4 (66.7)	2 (33.3)	0	0	0	0
14	1 (16.7)	2 (33.3)	3 (50.0)	2 (33.3)	4 (66.7)	0
21	0	1 (16.7)	5 (83.3)	0	0	6 (100)

性の曲線を呈した (図4). また100 pg/ml以上の濃度において両細胞間の増殖抑制率に有意差が認められた ( $p < 0.05$ ).

2. 移植腫瘍の血管新生に及ぼす影響

対照群の血管構築像は壊死に陥った中心部を除いて腫瘍全域

にわたって血管網が形成されていたが, TNP-470投与群では腫瘍・宿主境界部に樹枝状の血管を認めるのみであった (図5). またTNP-470投与群におけるHE染色像では腫瘍組織や腫瘍細胞に変性や壊死などは認められなかった (図6). 血管密度 (±

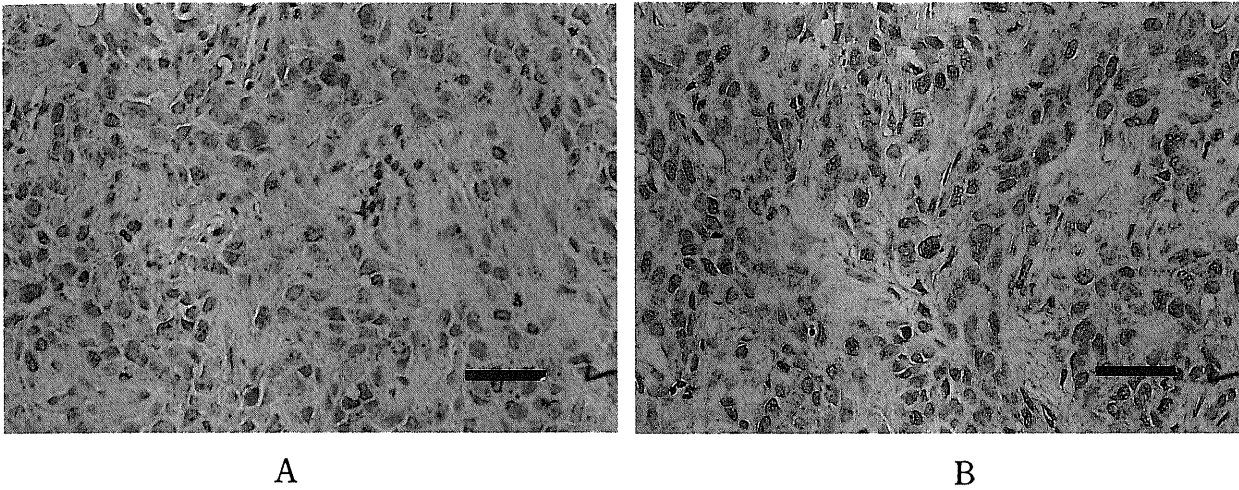


Fig.3. Photomicrographs of immunohistochemical staining for angiogenic factors. The cytoplasm of immunoreactive cells were stained as brown color. (A) Expression of VEGF. (B) Expression of b-FGF. Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

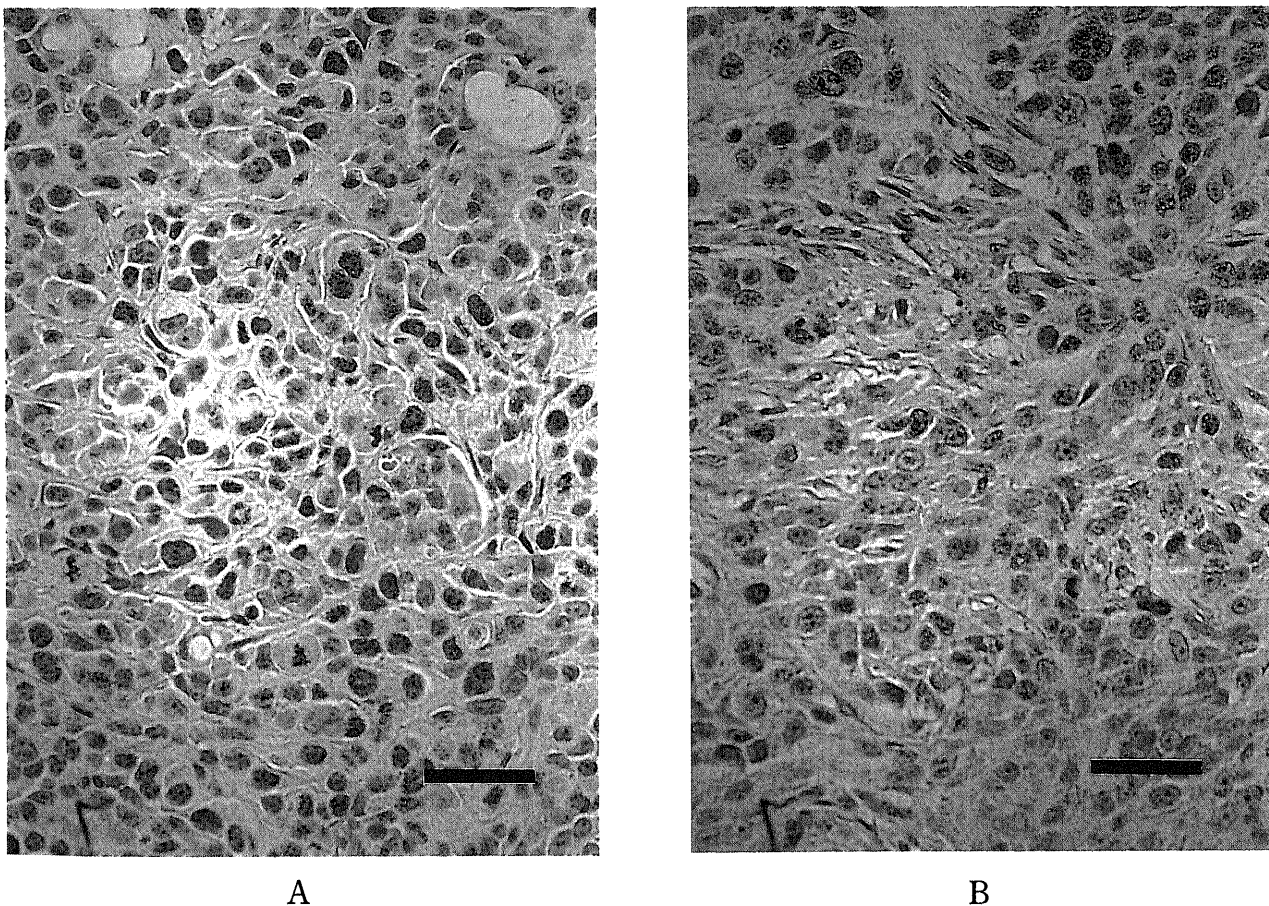


Fig.7. Photomicrographs of immunohistochemical staining for PCNA. PCNA LI of the experiment group have markedly decreased. (A) Control group. (B) TNP-470 treated group. Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

標準偏差)は対照群では38.5(±3.8)であったのに対しTNP-470投与群では28.0(±3.6)と有意に低値を示した( $p<0.05$ ).また対照群とTNP-470投与群におけるVEGFおよびb-FGFの発現に差異は認められなかった.

### 3. 移植腫瘍の増殖に対する抑制効果

対照群では15匹中3匹が移植後2週目の後半に腫瘍死したため、残りの12匹について検討を行った. 背部皮下腫瘍の相対的体積増加率の平均値(±標準偏差)は対照群では6.2(±2.5)であったのに対しTNP-470投与群では2.6(±2.0)であり、TNP-470投与群で有意に低い値を示した( $p<0.05$ ) (表4). また口底腫瘍におけるPCNA LIの平均値(±標準偏差)は対照群では34.8(±6.8)%であったのに対しTNP-470投与群では19.1(±6.4)%と有意に低値を示した( $p<0.01$ ) (図7). すなわち、背部皮下腫瘍、口底腫瘍ともにTNP-470の投与により増殖が抑制されていた(表4).

### 4. 頸部リンパ節転移に対する効果

対照群の頸部リンパ節転移形成率は12匹中11匹(91.7%)であったのに対して、TNP-470投与群では15匹中6匹(40.0%)であり対照群に比べて有意に低値を示した( $p<0.025$ ) (表5). また転移巣の進展度は、対照群ではI期(stage I)が45.5%、II期(stage II)が54.5%であったのに対して、薬剤投与群では83.3%がI期(stage I)にとどまっていた(図8). すなわち、TNP-470の投与により頸部リンパ節への転移が抑制されたことが示された.

### 5. 副作用

対照群では15匹中3匹(20%)が移植後2週目の後半に腫瘍死したのに対して、TNP-470投与群ではすべてのマウスが移植後21日目の犠牲死時まで生存していた. 移植後21日目まで生存していたマウスについて移植時の体重と比較すると、対照群では平均13.9%の体重減少が認められたのに対し、TNP-470投与群では平均5.6%の体重減少にとどまっており、体重の変化を副作用の指標とする限りにおいてTNP-470投与による明らかな副作用は認められなかった.

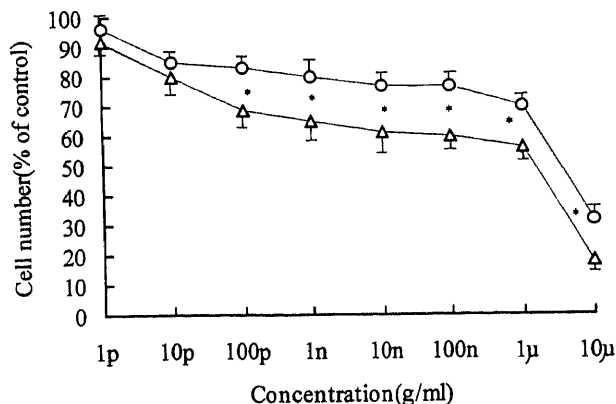


Fig. 4. Inhibition of OSC-19 cells (open circles) and endothelial cells (open triangles) growth by TNP-470. Each cells were plated in 96-well plates, and TNP-470 (1pg~10 μg/ml) was added to the cultures on the next day. Four days later, relative cell number was determined by the MTT method. The  $\bar{x} \pm SD$  of the value of three independent experiments are shown. \* $p<0.05$  between OSC-19 and endothelial cell.



Fig. 5. Photomicrograph of the oral floor tumor treated with TNP-470 showing microangioarchitecture by the indian-ink injection method. The vessels growing towards the implanted tumor come to a stop at the tumor surface. Scale bar indicates 500 μm.

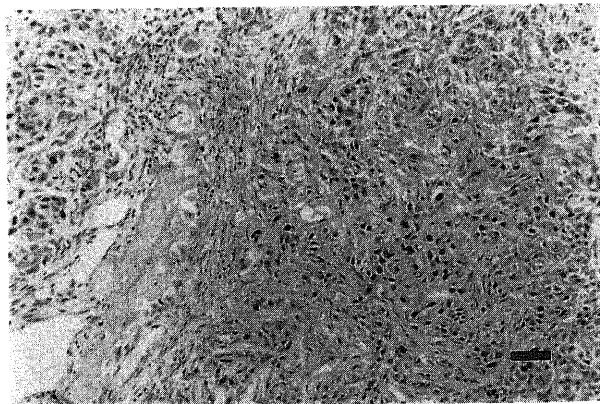


Fig. 6. Photomicrograph of the oral floor tumor treated with TNP-470 showing histological findings by HE stain. No characteristic changes are observed in tumor cells. Scale bar indicates 100 μm.

Table 4. Inhibitory effect of TNP-470 on growth of subcutaneous tumor and PCNA LI of oral floor tumor and vessel count

Group	Rate of the relative growth <sup>a)</sup> ( $\bar{x} \pm SD$ )	PCNA LI ( $\bar{x} \pm SD$ )	Vessel density ( $\bar{x} \pm SD$ )
Control	6.2 ( $\pm 2.5$ )	34.8 ( $\pm 6.8$ )	38.5 ( $\pm 3.8$ )
TNP-470	2.6 ( $\pm 2.0$ ) ]*	19.1 ( $\pm 6.4$ ) ]†	28.0 ( $\pm 3.6$ ) ]*

<sup>a)</sup> volume of 4days post-implantation=1.

\*p<0.05, †p<0.01 by Mann-Whitney's U-test.

Table 5. Inhibitory effect of TNP-470 on lymph node metastasis

Group	Total number (%) of mice with lymph node metastasis	Histological staging <sup>a)</sup> (%) of lymph node metastasis	
		I	II
Control	11/12 (91.7) ]*	5 (45.5)	6 (54.5)
TNP-470	6/15 (40.0) ]*	5 (83.3)	1 (16.7)

<sup>a)</sup> Criteria by Honma.

\*p<0.025 by Fishers exact probability method.

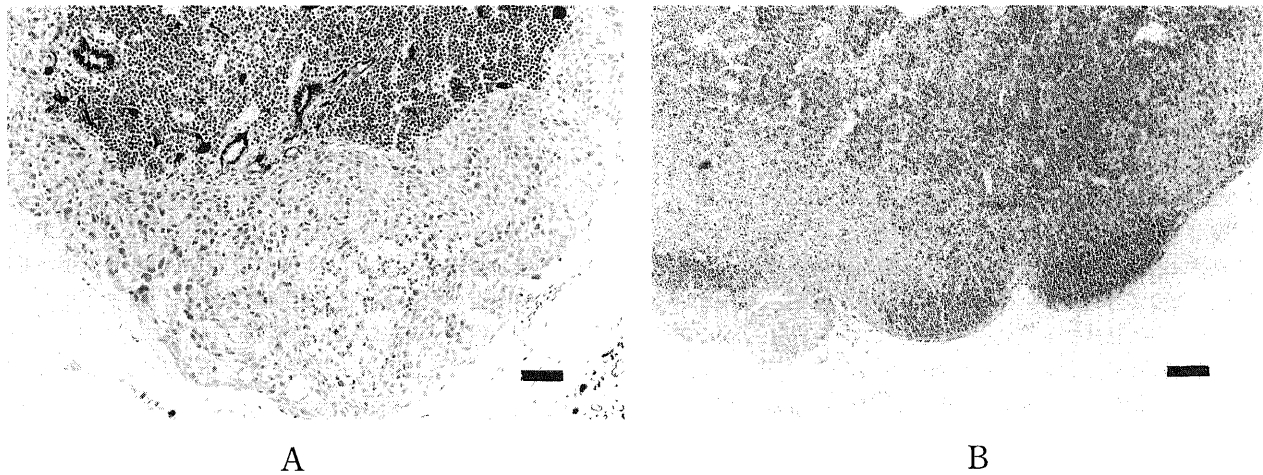


Fig.8. Photomicrographs of the metastatic lymph node tumor showing histological findings by HE staining. (A) Control group. (B) TNP-470 treated group. Scale bar indicates 100  $\mu$  m.

考 察

腫瘍における血管新生は、まず腫瘍細胞の産生する血管誘導因子が周囲の既存の血管の内皮細胞に作用し、活性化された内皮細胞がプロテアーゼを産生・分泌して基底膜をはじめとする細胞外マトリックスを分解し、腫瘍細胞へ向かって遊走、増殖して管腔を形成する。新生された血管は初めは樹枝状であるが、隣接する血管同士が吻合し、次第に網目状の血管構築像をつくることラット透明窓で観察され<sup>32)</sup>、ほとんどの固型癌は基本的に同様のプロセスで腫瘍血管が形成されていくものと考えられている。

一方、口腔癌における腫瘍血管に関する基礎的研究はこれまで主に化学誘発舌癌モデルを用いて行われてきた。松嶋<sup>33)</sup>はジ

メチルベンズアントラセン (dimethylbenzantbracene, DMBA) 誘発ハムスター舌癌モデルを用いて正常粘膜から発癌に至るまでの血管構築の変化を段階的に検討している。また茶谷<sup>34)</sup>は同様にDMBA誘発ハムスター舌癌モデルに血管内墨汁注入法を用いて腫瘍血管と浸潤像との関係について検討を行っている。しかしながら、口腔癌において初期増殖巣から腫瘍の増大に伴う経時的な血管の形成過程を詳細に検討した報告は見当たらない。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌の正所性移植モデルを用いて腫瘍の増殖に伴う血管新生の様相を経日的に観察した。その結果、本モデルではOSC-19細胞移植後4日目より移植腫瘍の周辺に新生血管の出現が認められ、腫瘍の増大とともに腫瘍血管は樹枝状から網目状へと構築されていくことが判明した。また、腫瘍血管密度も経日的に増加する傾向にあり、腫瘍

の増大に伴って血管新生が亢進していることが伺えた。しかし、移植後21日目の腫瘍では腫瘍中心部が壊死に陥り、その部位の血管は消失していた。これは、腫瘍の増大とともに腫瘍血管の透過性が亢進して、血漿成分が血管外に漏出し浮腫を生じ、その結果、腫瘍間質圧が高まり、腫瘍血管が圧迫されて血流が低下することによって局所壊死が生じたためと考えられる。

Moriyamaら<sup>35)</sup>は臨床材料を用いた検討から、口腔扁平上皮癌組織ではVEGFが発現しており、その発現強度が頸部リンパ節転移と関連性があったことを報告している。また、茶谷<sup>34)</sup>もDMBA誘発ハムスター舌癌においてVEGFの発現を認めており、VEGFが口腔癌における血管新生因子の一つである可能性を示唆している。そこで本研究ではVEGFが口腔扁平上皮癌の移植腫瘍の血管新生にどのように関与しているかを検討する目的でVEGFの発現を経目的に観察した。その結果、VEGFは新生血管の出現が認められる移植後4日目では認められず、7日目になって腫瘍細胞の一部に認められるに過ぎなかった。また、多くの腫瘍で重要な血管誘導因子の一つとされているb-FGFの発現についても検討を行ったが、b-FGFは癌細胞移植後7日目までには認められず、14日目以降に腫瘍細胞に認められるようになった。したがって血管新生の初期にはこれら両因子以外の因子が血管の誘導に関与している可能性が示唆された。培養細胞系の実験ではb-FGFとVEGFは微小血管形成に相乗的に作用し<sup>36)</sup>、また乳癌ではVEGFとPD-ECGFなどの複数の血管新生因子の同時発現を認めており<sup>37)</sup>、腫瘍の増大に伴う血管の新生にはいくつかの因子が相互的あるいは相乗的に作用して血管新生が促進されるものと考えられた。

腫瘍血管密度は腫瘍血管新生の臨床的指標として用いられている。口腔癌においては血管密度の高い腫瘍ほど腫瘍細胞のPCNA陽性細胞率は高く、頸部リンパ節転移を生じやすく、予後が不良であったとする報告<sup>19)</sup>がある一方で、血管密度とリンパ節転移は関係しないとする報告<sup>23)</sup>や低分化の腫瘍ほど血管密度は低いとする報告<sup>19)35)</sup>もあり、まだ一致した見解を得るに至っていない。これは茶谷<sup>34)</sup>が述べているように、口腔扁平上皮癌ではその浸潤様式によって血管構築像が異なっていることが原因の一つではないかと推察される。そこで本研究では、移植する癌細胞株によって同一の浸潤像を再現することのできる口腔扁平上皮癌の正所性移植モデルを用いて、血管密度とPCNA陽性細胞率および頸部リンパ節転移との関係について検討した。その結果、PCNA陽性細胞率は移植後2日目から21日目まではほぼ一定の値を示し、腫瘍の増大や血管密度とは関連性が認められなかったが、頸部リンパ節転移率は血管密度の増加とともに高くなる傾向を示した。すなわち、個々の腫瘍が本来有する増殖能は血管密度の変化に関係なく一定であるが、腫瘍組織中の血管密度の増加は、腫瘍細胞がリンパ管や血管内へ侵入する可能性を増加させているのではないかと推察された。したがって、口腔扁平上皮癌では同一腫瘍における血管密度は腫瘍の増大やリンパ節と深く関与しているものの、浸潤像や血管構築像の異なる複数の腫瘍について血管密度の多寡のみで臨床的悪性度や予後を評価することは困難ではないかと考えられた。

一方、抗血管新生療法は固型癌における増殖と転移が血管新生に依存しているという理解から生まれた新しい癌治療法である。本療法は、腫瘍細胞を直接の標的としてきた放射線療法や化学療法とは異なり、主に血管内皮細胞の増殖を阻害して新生血管の誘導を抑え、癌の栄養補給路と転移の道を絶つことを目

標としている。また、化学療法にみられるような薬剤耐性や副作用の問題を避けうる長所を有していることから、長期間にわたる治療や、化学療法や放射線療法との併用も可能であり、これまで難治性であった進行性癌や再発癌などに対しても画期的な治療法となる可能性が期待されている。本研究に用いたTNP-470 (AGM-1470) は真菌である*aspergillus fumigatus*の培養上清から単離したフマガリンの合成誘導体で、血管内皮細胞の増殖を抑制することが知られており米国において臨床試験が始まっている。第I相試験で骨髄抑制、網膜出血、体重減少、脱毛等の重篤な副作用は認めず、投与量によっては吐気・悪心、めまい等の軽度の中樞神経毒性を認めたのみで<sup>38)</sup>、現在、既にカボジ肉腫、頸部癌、前立腺癌に対して第III相試験が進められている。TNP-470の詳細な作用機序については未だ解明されていないが、TNP-470により、血管内皮細胞のG<sub>1</sub>期での停止<sup>39)</sup>、さらに血管内皮細胞のG<sub>1</sub>中期でのサイクリンD1の発現の抑制が認められている<sup>40)</sup>。また、血管内皮細胞のG<sub>1</sub>後期に作用し、サイクリンAおよびサイクリンEのmRNAの発現を抑制するという報告や<sup>41)</sup>、内皮細胞の増殖に重要な役割を持つとされるメチオニンアミノペプチダーゼ2の活性を阻害することが報告されている<sup>42)43)</sup>。TNP-470を担瘤マウスに用いた実験では、Katoら<sup>44)</sup>はLewis肺癌とB16BL6メラノマを移植したモデルを用いて、TNP-470 (150 mg/kg)にマイトマイシンC、アドリアマイシンおよび5-フルオロウラシルをそれぞれに併用投与し、いずれも相加的に抗腫瘍効果の増強を報告している。また、Konnoら<sup>45)</sup>はBALB/cマウスの盲腸・結腸癌であるTK-4細胞を移植し、TNP-470を30mg/kgで隔日皮下投与したところ、投与群で有意に肝転移が抑制されたことを報告している。さらに、ヒト胃癌<sup>46)</sup>やヒト線維肉腫<sup>47)</sup>を用いた実験でもTNP-470の抗腫瘍効果が認められており、多くの固型癌に対する有用性が示唆されている。その一方で、TNP-470が血管内皮細胞に対してだけではなく、腫瘍細胞に対しても増殖抑制作用を示すことが培養細胞系の実験で認められ、また腫瘍細胞によってもその感受性が異なっていることが報告されている<sup>48)</sup>。そこで本研究では、TNP-470に対する血管内皮細胞とOSC-19細胞の感受性を比較検討したところ、いずれの細胞もTNP-470に対して低濃度から感受性を示し、濃度依存的に細胞数の減少を認めたが、100 pg/ml以上の濃度においては血管内皮細胞の方がOSC-19細胞に比べて有意に増殖が抑制されており、血管内皮細胞の方がTNP-470に対して高い感受性を有していることが示された。また、移植腫瘍においては、腫瘍血管密度は対照群に比べてTNP-470投与群で有意に低く、TNP-470の投与によって血管の新生が抑制されたことが示された。対照群とTNP-470投与群との腫瘍細胞のVEGFおよびb-FGFの発現に差異が認められなかったことから、この血管新生の阻害はTNP-470の30 mg/kgの隔日皮下投与が主に血管内皮細胞の増殖を抑制したためと考えられる。一方、移植腫瘍の増殖に対しては皮下腫瘍、口底腫瘍ともTNP-470投与によって強い抑制効果が認められたが、これはMTTアッセイの結果からもTNP-470が血管内皮細胞の増殖に対してだけでなく、OSC-19細胞の増殖に対してもある程度抑制的に働いたためと考えられた。さらに、頸部リンパ節転移に対しては小島<sup>49)</sup>も同モデルを用いた化学療法効果について報告しており、シスプラチン、硫酸ペプロマイシンをOSC-19細胞移植後それぞれ腹腔内投与し、その効果について検討したところ両群とも45.5%までリンパ節転移率が抑制されたことを報

告しており、本実験においてもほぼ同様のリンパ節転移抑制効果を認めている。ただ小島の実験では抗癌剤の原発巣に対する組織学的抗腫瘍効果が高く、浸潤様式の低下を示す割合が多かったが今回の実験では組織学的抗腫瘍効果は認めず、浸潤様式も高転移性を有す4C型のままであることからTNP-470によるリンパ節転移抑制の機序は、転移経路の遮断や転移巣における腫瘍細胞の増殖抑制などが考えられる。

以上のように、TNP-470は口腔扁平上皮癌の移植腫瘍における腫瘍血管の新生を抑制し、腫瘍細胞の増殖と転移を抑制したことから、抗血管新生療法が口腔扁平上皮癌における新しい治療法になり得る可能性が示唆された。しかし、堀ら<sup>32)</sup>が述べているように、実際の生体では癌が生じる部位には最初から相当数の既存の血管が存在しており、また腫瘍によっては腫瘍細胞が自らの増殖のために既存の血管を利用すべく周囲組織へ浸潤を繰り返している可能性も否定できない。Moriyamaら<sup>33)</sup>によれば口腔扁平上皮癌では、よりび漫性に浸潤するYamamotoら<sup>28)</sup>の分類の4D型に属する腫瘍においては腫瘍血管密度が最も低く、また原田<sup>50)</sup>は4D型の癌細胞が自己分泌型運動因子を産生して極めて高い運動能を有していることを示している。したがって口腔扁平上皮癌における浸潤様式4D型の腫瘍では血管の新生を誘導するよりも癌細胞自身がその高い運動能を生かして増殖のための酸素や栄養を求めて深部組織へ浸潤してゆくのではないかと推察され、このような腫瘍では抗血管新生療法による効果はあまり期待できないのではないかと考えられる。しかしこれらの点に関しては今後の解明を待たねばならない。

## 結 論

口腔癌における腫瘍血管の新生と腫瘍の増殖や転移との関係を明らかにする目的で、高浸潤性を有するヒト口腔扁平上皮癌細胞株OSC-19を用いてヌードマウス正所性移植モデルを作製し、移植腫瘍の増殖に伴う血管新生の経目的変化と血管新生因子の発現の様相、および腫瘍血管密度と増殖や転移との関係について検討した。さらに血管新生阻害薬であるTNP-470を用いて、その抗腫瘍効果について検討を行い、以下の結論を得た。

1. 移植腫瘍の血管新生は移植後4日目より生じ、以後経目的に樹枝状から網目状に腫瘍血管が構築され、血管密度も移植後4日目から14日目にかけて $22.8 \pm 4.3$ から $38.8 \pm 2.1$ と経目的に増加した。

2. 血管新生因子の発現は、VEGFは移植後7日目以降に、bFGFは移植後14日目以降に腫瘍細胞中の発現が認められ、これらの因子が移植腫瘍における血管新生の促進に相乗的に作用しているものと考えられたが、初期の血管新生の誘導にはこれら両因子以外の因子が血管の誘導に関与している可能性が示唆された。

3. 移植腫瘍のPCNA陽性細胞率は移植後2日目から移植後21日目まで31.0～36.0%とほぼ一定の値を示し、腫瘍の増大や血管密度とは関連性が認められなかったが、頸部リンパ節転移率は移植後7日目で16.6%、14日目で33.3%、21日目で83.3%に認め、腫瘍の増大や血管密度と関連していることが示された。

4. 新生児皮膚血管内皮細胞、OSC-19細胞ともにTNP-470に対して低濃度から感受性を示し、濃度依存的に細胞数の減少を認めたが、100 pg/ml以上の濃度においては血管内皮細胞の方

がOSC-19細胞に比べて有意に増殖が抑制されていた。また移植腫瘍においては、移植後21日目の腫瘍血管密度は対照群では $38.5 \pm 3.8$ であったのに対してTNP-470投与群では $28.0 \pm 3.6$ と有意に低値を示した ( $p < 0.05$ ) ことから、TNP-470の投与により血管内皮細胞の増殖が抑制されて血管新生が阻害されたことが示された。

5. 背部皮下腫瘍の相対的体積増加率は、対照群では $6.2 \pm 2.5$ であったのに対してTNP-470投与群では $2.6 \pm 2.0$ と有意に低く ( $p < 0.05$ )、また口底腫瘍のPCNA陽性細胞率においても対照群では $34.8 \pm 6.8\%$ であったのに対してTNP-470投与群では $19.1 \pm 6.4\%$ と有意に低かった ( $p < 0.01$ ) ことより、TNP-470の投与により移植腫瘍の増殖が抑制されたことが示された。

6. OSC-19細胞移植後21日目の頸部リンパ節転移率は対照群では91.7%であったのに対して、TNP-470投与群では40.0%であり有意に低値を示し ( $p < 0.025$ )、TNP-470の投与により頸部リンパ節への転移が抑制されたことが示された。

以上より、口腔扁平上皮癌では経目的な腫瘍の増大に伴って血管新生が促進し、頸部リンパ節への転移の頻度も増加することが明らかとなった。また、血管新生阻害薬による抗血管新生療法が口腔癌の増殖と転移を抑制する新しい治療法になり得る可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師山本悦秀教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始直接御指導、御助言を頂きました金沢大学医学部歯科口腔外科学講座・熊谷茂宏講師、川尻秀一助手に心から深謝致します。更に、本研究の遂行にあたり御支援、御協力頂きました本学生化学第二講座・米倉秀人助教授、武田薬品工業株式会社に篤く御礼申し上げます。最後に御協力頂きました当講座の大学院生ならびに医局員の各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨の一部は、第52回日本口腔科学会総会(1998年4月、愛媛)、第22回日本頭頸部腫瘍学会(1998年6月、愛知)において発表された。

## 文 献

- 1) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6, 1990
- 2) Czubayko F, Smith RV, Chung HC, Wellstein A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J Biol Chem* 269: 28243-28248, 1994
- 3) Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362: 841-844, 1993
- 4) Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W, Heldin CH. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338: 557-562, 1989
- 5) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, Dipietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-1801, 1992
- 6) Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 90: 649-652, 1994

- 7) Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57: 963-969, 1997
- 8) Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (Vascular Endothelial Growth Factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer* 78: 454-460, 1996
- 9) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968, 1995
- 10) O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Different angiogenesis pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 55: 510-513, 1995
- 11) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 12) Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimomatsuya T, Lu C, Muraoka R, Tanaka T. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 79: 220-225, 1997
- 13) Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 57: 1043-1046, 1997
- 14) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285, 1997
- 15) D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4082-4085, 1994
- 16) Gore M, A'Hern R, Stankiewicz M, Slevin M. Tumour marker levels during marimastat therapy. *Lancet* 348: 263-264, 1996
- 17) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348: 555-557, 1990
- 18) 三上康和, 佃守, 持松いずみ, 小勝敏幸, 矢後忠之, 澤木修二. 頭頸部腫瘍における血管新生についての研究. *日耳鼻会報* 96: 645-650, 1993
- 19) 新谷悟, Rafael A, 吉澤泰斗, 大月要, 松村智弘. ヒト口腔扁平上皮癌における微小血管に関する免疫組織化学的検討. *日口外誌* 40: 645-650, 1994
- 20) Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derose PB, Hunter S, Jurkiewicz MJ. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 168: 373-380, 1994
- 21) Penfold CN, Partridge M, Rojas R, Langdon JD. The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 34: 37-41, 1996
- 22) Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JJ. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111: 417-422, 1994
- 23) Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 724-729, 1995
- 24) Gleich LL, Biddinger PW, Pavelic ZP, Gluckman JL. Tumor angiogenesis in T1 oral cavity squamous cell carcinoma. Role in predicting tumor aggressiveness. *Head Neck* 18: 343-346, 1996
- 25) Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma. A clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 19: 276-280, 1997
- 26) 上田直弘, 鎌田伸之, 横山和博, 林英司, 長山勝. 血管新生阻害剤TNP-470の口腔扁平上皮癌細胞に対する影響. *頭頸部腫瘍* 24: 279, 1998
- 27) Yokoi T, Yamaguti A, Odajima T, Furukawa K. Establishment and characterization of a human cell line derived from a squamous cell carcinoma of the tongue. *Tumor Res* 23: 43-57, 1988
- 28) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-2180, 1983
- 29) Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, Yamamoto E. Development of a new invasion and metastasis model of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* 31B: 216-221, 1995
- 30) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983
- 31) 本間義郎. 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する研究. *日口外誌* 28: 1667-1684, 1982
- 32) 堀勝義, 鈴木磨郎, 斎藤祥子, 丹田滋. 腫瘍血管の構築とその循環特性. *癌と化学療法* 17: 554-563, 1990
- 33) 松嶋典彦. 実験的舌癌における血管構築ならびに腫瘍血管の超微構造. *日口外誌* 28: 175-191, 1982
- 34) 茶谷修平. 実験舌癌における腫瘍血管構築像の検討—特に浸潤増殖像との関連について—. *十全医学誌* 107: 74-86, 1998
- 35) Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri K, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 33: 369-374, 1997
- 36) Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 824-831, 1992
- 37) 戸井雅和, 山本豊, 谷口忠明, 佐治重衡, 林和雄, 富永健. 乳癌における血管新生誘導因子の発現と調節. *癌と化学療法* 23: 75-79, 1996
- 38) Kudelka AP, Levy T, Verschraegen CF, Edwards CL, Piamsomboon S, Termrungruangert W, Freedman RS, Kaplan

- AL, Kieback DG, Meyers CA, Jaeckle KA, Loyer E, Steger M, Mante R, Mavligit G, Killian A, Tang RA, Gutterman JU, Kavanagh JJ. A phase I study of TNP-470 administered to patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *Clin Cancer Res* 3: 1501-1505, 1997
- 39) Antoine N, Greimers R, De Roanne C, Kusaka M, Heinen E, Simar LJ, Castronovo V. AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 54: 2073-2076, 1994
- 40) Hori A, Ikeyama S, Sudo K. Suppression of cyclin D1 mRNA expression by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 1067-1073, 1994
- 41) Abe J, Zhou W, Takuwa N, Taguchi J, Kurokawa K, Kumada M, Takuwa Y. A fumagillin derivative angiogenesis inhibitor, AGM-1470, inhibits activation of cyclin-dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma gene product but not protein tyrosyl phosphorylation or protooncogene expression in vascular endothelial cells. *Cancer Res* 54: 3407-3412, 1994
- 42) Sin N, Meng L, Wang MQ, Wen JJ, Bornmann WG, Crews CM. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6099-6103, 1997
- 43) Griffith EC, Su Z, Turk BE, Chen S, Chang YH, Wu Z, Biemann K, Liu JO. Methionine aminopeptidase (type2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. *Chem Biol* 4: 461-471, 1997
- 44) Kato T, Sato K, Kakinuma H, Matsuda Y. Enhanced suppression of tumor growth by combination of angiogenesis inhibitor O-(chloroacetylcarbamoyl) fumagillol (TNP-470) and cytotoxic agents in mice. *Cancer Res* 54: 5143-5147, 1994
- 45) Konno H, Tanaka T, Matsuda I, Kanai T, Maruo Y, Nishino N, Nakamura S, Baba S. Comparison of the inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor, TNP-470, and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *Int J Cancer* 61: 268-271, 1995
- 46) Shishido T, Yasoshima T, Denno R, Sato N, Hirata K. Inhibition of liver metastasis of human gastric carcinoma by angiogenesis inhibitor TNP-470. *Jpn J Cancer Res* 87: 958-962, 1996
- 47) Ohta Y, Watanabe Y, Tabata T, Oda M, Hayashi Y, Endo Y, Tanaka M, Sasaki T. Inhibition of lymph node metastasis by an anti-angiogenic agent, TNP-470. *Br J Cancer* 75(4): 512-515, 1997
- 48) Kusaka M, Sudo K, Matsutani E, Kozai Y, Marui S, Fujita T, Ingber D, Folkman J. Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). *Br J Cancer* 69: 212-216, 1994
- 49) 小島 潔. 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移に対する化学療法効果に関する実験的研究. *十全医学誌* 106: 84-95, 1997
- 50) 原田博紀. 浸潤様式との関連から見たヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動促進因子の解析. *十全医学誌* 107: 163-173, 1998

### Experimental Study of the Antitumor Effect of an Angiogenic Agent on Oral Squamous Cell Carcinoma.

Kenichirou Kakihara, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Juzen Med Soc., **108**, 37 - 47 (1998)

**Key words** oral squamous cell carcinoma, orthotopic implantation model, cervical lymph node metastasis, angioarchitecture, anti-angiogenic agent

#### Abstract

Angiogenesis of oral squamous cell carcinomas and the antitumor effect of an antiangiogenic agent were evaluated in nude mouse metastases induced by means of the orthotopic implantation of OSC-19 cells, a highly metastatic type of human oral squamous cell carcinoma. Initiation of tumor angiogenesis was observed on day 4 after implantation, after which the angioarchitecture developed from dendriform to mesh-type. The vessel density increased from day 4 through day 14. Expression of VEGF in tumor cells was observed from day 7 on, and expression of b-FGF from day 14 on. The PCNA labeling index remained stable from day 2 through day 21, and therefore did not correlate with tumor growth or vessel density. However the cervical lymph node metastasis rate increased in a time-dependent manner from day 7 through day 21, which suggests a correlation with the tumor growth or the vessel density. Angiogenesis inhibitor TNP-470 (30mg/kg) was administered subcutaneously to some of the mice on alternate days from day 4 after implantation. Not only was inhibition of angiogenesis observed in the TNP-470 group, but also a reduction in the vessel density as compared to the control group ( $p < 0.05$ ). There was a significant reduction in both the rate of relative growth of the subcutaneous tumor of the back and in the PCNA labeling index of the oral floor tumor in the TNP-470 group as compared to the control group, thus demonstrating suppression of tumor growth by TNP-470. For the control group, the cervical lymph node metastasis rate was 91.7% at 21 days after implantation. In contrast, the lymph node metastasis rate for the TNP-470 group was only 40.0% ( $p < 0.025$ ). This study found that oral squamous cell carcinoma promotes not only angiogenesis but also a higher incidence of lymph node metastasis leading to increased tumor growth. These results suggest that anti-angiogenic therapy with an anti-angiogenic agent may represent a promising treatment against the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinomas.