

# The therapeutic effect of anti-VEGF neutralizing antibody against carcinomatosa pleuritis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-02-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ohta, Yasuhiko メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00056757">https://doi.org/10.24517/00056757</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN  
2001  
74

胸膜播種に対する光力学治療と抗VEGF中和抗体を併用した  
治療効果の検討

(課題番号 12671302)

平成12～平成13年度科学研究費補助金（基盤研究C2）研究成果報告書

平成14年3月

研究者代表 太田安彦  
(金沢大学医学部附属病院助手)

## は し が き

肺癌の転移様式として原発部位より胸腔内の胸膜に転移を形成する胸膜播種がある。その転移機序は転移経路も含めて以前不明確だが、肺癌細胞の胸腔内への直接的な散布播種の他、近年になり血管膜透過性作用を有する Vascular endothelial growth factor (VEGF) が悪性胸水の形成に関与する可能性が指摘されている。豊富な血行路あるいはリンパ路を有する胸膜に転移の形成された本病態下の患者の多くは発症後1年以内に癌死することが多い。治療の主体は多くの場合、癌性胸水のコントロールであり、肺癌治療の主軸である従来の外科治療、化学療法および放射線治療に極めて抵抗性の難治性進行癌病態である。これまで、温熱化学療法や光線力学療法(Photodynamic therapy, PDT)等の様々な試みが治療手段として試行されてきたが、未だ有効性の期待できる確固たる治療法はなく、新たな治療法の開発は重要且つ緊急的課題といえる。本病態に対し積極的な外科的治療の適応は、他に遠隔転移やリンパ節転移がない場合に考慮されるが、外科的に病変を完全切除するためには患側肺と胸膜(臓側+壁側)を取り除く Panpleuropneumonectomy が必要となる。しかし、この術式は手術侵襲が多岐である上、治療成績は必ずしも良好とは言えないのが現状である。また、本病態下では患者の全身状態が必ずしも良好でないことが多く、この術式が認容されない場合も多い。我々は本病態に対する外科的な治療手段として、原発巣を肺部分切除により取り除き、可及的に肺機能を温存させた上で壁側胸膜切除を加えた縮小手術を展開し、肺と胸膜をすべて取り除く Panpleuropneumonectomy に比し良好な手術成績の期待できることを報告した(Ohta et al., Ann Thorac Surg, 2000)。しかし、本治療方法の問題点は、肺側の胸膜である臓側胸膜を残すことより、ここに癌遺残が生じる点にある。臓側胸膜に対して何らかの有効性の期待できる補助的治療を追加できれば、治療成績をさらに向上させることが可能と考える。ここに、我々は抗 Vascular endothelial growth factor (VEGF) 中和抗体の治療法として可能性と応用性に着目した。近年、肺癌を含めた多くの悪性腫瘍において癌進展に関わる腫瘍血管新生因子として VEGF の重要性が確認されている。肺癌組織での VEGF の発現性は血管内皮とともに腫瘍細胞自身に強い発現性がみられ、癌性胸膜炎において VEGF の高発現性を既に確認している(Ohta et al, Ann Thorac Surg 2000)。1)の癌により特異的な治療法を推進する上で、本研究ではヌードラットを用いた癌性胸膜炎モデルから、抗 VEGF 中和抗体を用いた治療実験を展開し、治療効果のの評価を行った。

#### 研究組織

研究代表者 : 太田安彦 (金沢大学医学部附属病院助手)  
研究分担者 : 小田 誠 (金沢大学医学部附属病院講師)  
研究分担者 : 常塚宣男 (金沢大学医学部附属病院助手)

#### 研究経費

平成 12 年度	1,800 千円
平成 13 年度	1,600 千円
計	3,400 千円

#### 研究発表

- (1) 学会誌等 (発表者名、テーマ名、学会誌名、巻号、年月日)
- (2) 口頭発表 (発表者名、テーマ名、学会等名、年月日)
- (3) 出版物 (著者名、書名、出版者名、年月日)

[学会誌等]

Yasuhiko Ohta et al. Can tumor size be a guide for limited surgery in patients with peripheral non-small cell lung cancer? – Assessment from the point of view of nodal micrometastasis – *J Thorac Cardiovasc Surg* (印刷中)

Masaya Tamura, Yasuhiko Ohta, et al. Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncology Rep* 8, 1097-1102, 2001.

Jian Wu et al. Nodal micrometastasis in patients with primary peripheral lung adenocarcinoma of 2.0 cm or less in diameter. *Ann Thorac Surg* 71, 1772-1778, 2001..

Yasuhiko Ohta et al. The predictive value of vascular endothelial growth factor and nm23 for the diagnosis of occult metastasis in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res*, 92, 361-366, 2001.

Murat Kara, Yasuhiko Ohta et al. Autocrine motility factor receptor expression in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 71, 944-948, 2001.

Yasuhiko Ohta et al. Biological characteristics of carcinomatosa pleuritis in orthotopic model systems using immune-deficient rats. *Int J Oncology*, 18, 499-505, 2001.

Yasuhiko Ohta et al. Autocrine motility factor receptor expression associates with tumor progression in thymoma. *Int J Oncology*, 17, 259-264, 2000.

Yasuhiko Ohta et al. Clinicopathological and biological assessment of lung cancers with pleural dissemination. *Ann Thorac Surg*, 69, 1025-1029, 2000.

Yasuhiko Ohta et al. Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-C and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 119, 804-813, 2000.

[口頭発表]

太田安彦 他、一ワークショップ 肺がんの新たな予後因子—  
血管新生(VEGF 等)と肺癌の予後、第 40 回日本呼吸器学会総会, 2000 年 3 月

太田安彦 他、一サージカルフォーラム 癌浸潤転移の分子機構—  
胸膜播種形成における VEGF 発現の意義、第 100 回日本外科学会総会, 2000 年 4 月

太田安彦 他、ヌードラットを用いた癌性胸膜炎モデルからみた胸膜播種形成における  
VEGF の関与、第 59 回日本癌学会総会, 2000 年 10 月

太田安彦 他、抗 VEGF 中和抗体による胸膜播種抑制効果、  
第 41 回日本肺癌学会総会, 2000 年 9 月, 東京

Yasuhiko Ohta et al. Anti-VEGF neutralizing antibody inhibits pleural dissemination in the model  
using immune deficient rat. 9<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2000 September

太田安彦 他、胸膜播種を伴った肺癌に対する縮小手術の適応と妥当性  
第 17 回日本呼吸器外科学会総会, 2000 年 5 月

[著書]

Yasuhiko Ohta et al. Current concept of angiogenesis related to primary lung cancer, **Lung Cancer :  
Principles and Practice (2<sup>nd</sup> ed)**, Lippincott Williams & Wilkins, pp119-210, 2000.

## [実験方法]

### 1. 実験動物

実験動物は8週齢雌のF344/NJcl-rnu/rnu (CLEA, Tokyo, Japan)を用い、無病原体飼育条件下(specific pathogen free)で滅菌飼料および滅菌水道水にて飼育した。

### 2. 移植腫瘍細胞と培養

ヒト低分化型肺腺癌細胞株 PC-14 は、10%(v/v)非働化ウシ胎児血清とグルタミンを含んだ RPMI1640 培地中にて培養した。

### 3. 胸膜播種モデルの作成

ペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して麻酔した後にレスピレータ管理下に左側開胸を行ない、第1モデルでは肺摘除後、壁側胸膜下に PC-14 を  $1 \times 10^7$  個移植した。第2モデルでは、開胸時胸腔内に PC-14 を同数個直接胸腔内に散布した。移植後1週目にラットを無作為に治療群・非治療群の2群に分けた。

### 4. 治療実験

治療群に対し抗 VEGF 中和抗体を  $250 \mu\text{g/body}$  にて週2回のべ 1mg を第1モデルでは胸腔内、第2モデルでは腹腔内投与し、腫瘍移植後4週目に autopsy した。また、第2モデル系を用いて腫瘍移植後1週目にフォトフリンII, 40mg/kg を腹腔内投与し、48時間後に再度ペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して麻酔を行ない、肺摘後の胸腔内に全方向型のレーザープローベ（浜松フォトにクス社製）を挿入してエキシマダイレーザーにて  $100 \text{ J/cm}^2$  の照射を試行し、光力学療法を行った。なお、本群では、フォトフリン投与後1週間の遮光下での飼育を行った。

### 5. 治療効果の評価

胸膜播種の程度は、胸腔内における胸膜結節数および広がりから評価した。広がりには、胸腔膜面を胸壁側、縦隔側および横隔膜側の3領域に分け、播種のみられた領域の数から、Grade 1: 1領域のみ、Grade 2: 2領域に広がりのあるもの、Grade 3: 3領域すべてに播種の見られたもの、以上3段階にわけて評価した。第1モデル系では、壁側胸膜下の移植腫瘍のサイズを計測し、 $\text{Tumor volume (cm}^3\text{)} = \text{length} \times \text{width}^2$  として評価した。

## 6. RT-PCR 解析

移植腫瘍細胞における VEGF 遺伝子発現を RT-PCR 法にて行った。TRIzol(Life Technology, Inc.)を用いて PC-14 より Standard acid-guanidium-phenol-chloroform 法にて RNA を抽出し 200  $\mu$ g/ml に調整した後、RNA 溶液 5  $\mu$ l にオリゴ dT プライマー 2.5  $\mu$ l を加え 68°C で 15 分間、RNA の変性とアニーリングを行った。逆転写反応後 cDNA を作成した。

## 7. 免疫組織染色

腫瘍組織中の VEGF, AMFR (autocrine motility factor receptor) および Factor VIII の発現を免疫組織染色法にて評価した。用いた 1 次抗体は VEGF: Santa Cruz Biotechnology 100 倍希釈、AMFR: 岐阜薬科大学、羽賀新世先生より譲与 200 倍希釈、Factor VIII: Dako Corp. 200 倍希釈。腫瘍切片は 10  $\mu$ m 幅に切りだし、連続切片にて各 1 次抗体を 1 時間反応させた。陰性コントロールは 1 次抗体を除いて反応させ、VEGF と AMFR は腫瘍細胞の 10% 以上に染まりがみられた場合を陽性とした。0-10% を (-)、10-50% を (+)、50% 以上を (2+) として多段階評価した。腫瘍内微小血管密度は 200 倍視野にて Hot spot 3 ヶ所の平均値とした。

## 8. Western blot 解析

壁側胸膜下移植腫瘍 1 mg より 5% 2-メルカプトエタノールを含む SDS 緩衝液に溶解し蛋白を抽出した。10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、ポリビニリデンジフルオライド膜に転写した。1,000 倍希釈した抗 AMFR 抗体と室温で 2 時間反応させた。2 次抗体と反応後、TBS-T にて洗浄し ECL ウェスタンブローディング検出試薬にて抗原抗体複合体を検出した。

## 9. 統計解析

変値間の差の検定は Mann-Whitney U 検定を用いた。

## 【結果と考察】

PC-14 細胞およびラットに移植後正着した腫瘍組織における VEGF の発現性が確認された (Figure 1, 2)。第 1 のモデルでは、全ラットにおいて移植部位での腫瘍の生着と原発巣とは不連続な胸膜面における多発性の結節性腫瘤の形成が確認された (Figure 3)。病理組織学的所見にて播種の成立が確認できた (Figure 4)。



第1のモデルでは、胸膜下移植腫瘍のサイズは治療群で縮小の傾向を認めた。Dissemination の数は、抗 VEGF 中和抗体投与群で有意に減少し、胸腔内に chest wall, mediastinal, diaphragmatic area の3領域に分け、dissemination の認められた領域の数から広がり の程度を検討しますと、非治療群は全例 Grade 3 であったのに対し、中和抗体投与群の場合、Grade3 は1匹とひろがりにおいても治療群の抑制傾向が認められました(Table 1)。第2のモデルでは、全ラットにおいて胸腔内に多発性の播種の形成が認められました。第2の直接散布モデルでは、播種の平均個数に両群間の有意差は認めなかった。ただし、非治療群8匹中5匹に胸水の貯留が認められ、さらに中2匹が悪性胸水であったのに対し(Figure 5)、抗 VEGF 中和抗体投与群においては、胸水貯留例は認められず、VEGF が悪性胸水の防止に有効性の期待できる分子標的となる可能性が示された (Table II)。第1のモデルにおいて、中和抗体投与群における腫瘍組織内の血管密度が有意に減弱していることが確認されました。また、Initial site における腫瘍組織内での自己分泌型運動因子受容体 AMFR の発現性を免疫組織学的に検討した結果、興味深いことに、抗 VEGF 中和抗体投与群において AMFR の発現性の減弱が示唆された(Figure 6)。この点に関しては、さらに Western blot 解析にても確認を行ったが、同様の結果が得られた(Figure 7)。VEGF が AMFR を介して癌細胞の走化性ないし運動能に関与し胸膜播種の形成に影響を及ぼしている可能性が考慮された。なお、光力学療法を施行したラットはすべて死亡した。治療法としての侵襲が肺摘除を行ったラットには大きすぎたものと考えた。現在、超音波を用いた治療法の併用の可能性を検討中である。

#### 【結語】

ヌードラットを用いた2種類の播種モデルの検討から、VEGF と癌性胸膜炎との相関性が支持された。その機序として、血管膜透過性以外に胸膜における vessel route を介した複合的転移経路の関与が示されるとともに AMFR を介し癌細胞の走化性に影響を及ぼし播種形成を促進している可能性が示された。VEGF 活性の抑制は、癌性胸膜炎の防止に有効な治療手段となる可能性が示された。