



Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival

Takamoto, Takeshi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-12-31

(Date of Publication)

2013-06-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2418

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002418>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 6 3 】

氏 名・(本 籍) 高本 剛 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1385号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年12月31日

【学位論文題目】

**Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416)inhibited the growth of
GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival**

(移植ラット脳グリオーマ (GS9L) に対するFlk-1 得意
リン酸化阻害剤SU5416の増殖抑制効果と生存延長効果)

審 査 委 員

主査 教授 久野 高義

教授 黒田 嘉和

教授 伊東 宏

〔目的〕腫瘍の増殖や転移には血管新生が関与しているものと考えられる。血管新生は種々の促進因子と抑制因子とのバランスによって制御されており、通常の状態では後者が優位である。しかし、腫瘍や虚血状態、外傷後のような状態では、前者が優位となる。現在、様々な分野で血管新生に関係する個々の分子を標的とした治療が行われてきている。SU5416 は血管内皮増殖因子(VEGF)の受容体の1つである Flk-1/KDR のチロシンキナーゼ活性を選択的に阻害する薬剤である。SU5416 は頭蓋外のいくつかの腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果が確認されているが、生体内における脳腫瘍モデルでの腫瘍増殖抑制効果は確認されていない。今回、我々はラットグリオーマ細胞である GS-9L を用いた脳腫瘍モデルを作成し、SU5416 の治療効果を検討した。

〔方法〕GS9L $5 \times 10^4 / 5 \mu l$ を定位的手術により雄ラット (Fisher 344、合計 63 匹) の脳内 (右尾状核) に移植し、第 1 日および第 8 日より SU5416 による治療を開始した。治療は、SU5416 を DMSO で 3 段階 (12.5, 25.0, 50.0mg/kg bw) の濃度に溶解希釈し、1 日 1 回腹腔内に投与し、症状が出現するまで投与を続けた。麻痺や摂食不能などの症状が出現した時点で安楽死処分とした。ラットは、無治療群を Group 1 (n=7)、DMSO のみ腹腔内投与した対照群を Group 2 (n=14)、SU5416 12.5mg/kg bw 投与群を Group 3 (n=14)、25.0mg/kg bw 投与群を Group 4 (n=14)、50.0mg/kg bw 投与群を Group 5 (n=14) とした。Group 2 から Group 5 において、第 1 日治療開始群を Group A、第 8 日治療開始群を Group B に分けて、それぞれの平均生存期間を対照群と比較検討した。また、病理組織学的に腫瘍組織の変化を観察するとともに、抗 CD31 抗体を用いて血管

内皮細胞を選択的に染め、血管密度を定量的に評価した。また、TUNEL 法により、腫瘍組織内におけるアポトーシス細胞の増減について観察した。

〔結果〕症状出現までに、Group 1 では 16.3 ± 0.5 日であった。治療群では、第 1 日治療開始群 (Group A) においては、Group 2 で 16.8 ± 2.3 日 (NS)、Group 3 で 24.3 ± 5.7 日 ($p < 0.05$)、Group 4 で 25.2 ± 2.6 日 ($p < 0.0005$)、Group 5 で 24.5 ± 5.4 日 ($p < 0.05$) であった。第 8 日治療開始群 (Group B) においては、Group 2 で 14.3 ± 0.8 日 ($p < 0.00001$)、Group 3 で 17.9 ± 1.4 日 ($p < 0.01$)、Group 4 で 16.6 ± 1.3 日 (NS)、Group 5 で 17.0 ± 2.2 日 (NS) であった。この結果、第 1 日治療開始群 (Group A) において、濃度依存性ではないものの、SU5416 による治療群では有意に生存期間を延長する効果が確認できた。また、第 8 日治療開始群 (Group B) でも、DMSO のみ投与した群と比較すると、SU5416 による治療群では有意に生存期間を延長した (Group 3; $p < 0.0001$, Group 4; $p < 0.001$, Group 5; $p < 0.01$)。病理組織学的には、無治療群 (Group 1) では、腫瘍組織内に壊死巣はほとんど認められなかったが、第 1 日治療開始群 (Group A) の Group 5 では、腫瘍組織内に多くの広範な壊死巣が認められた。また、抗 CD31 抗体を用いた血管密度の観察では、無治療群では $87.4 \pm 4.4 / \text{field} \times 200$ に対して治療群では $21.5 \pm 7.5 / \text{field} \times 200$ と著明な低下が認められた。TUNEL 法によるアポトーシスの検索では、腫瘍組織におけるアポトーシス細胞の増加が認められた。また、使用した濃度では、脳室脈絡叢および腎糸球体など Flk-1 を恒常的に発現している組織においても明らかな副作用の出現を認めなかった。

〔考察〕第1日治療開始群 (Group A) においては対照群よりも有意に生存期間を延長させたが、第8日治療開始群 (Group B)では効果は少なかった。このことは、Group B ではすでに腫瘍はかなり増大しており、増殖速度が薬剤の抗腫瘍効果よりもかなり上回っていたものと考えられた。また、今回の研究では、SU5416の血管新生阻害作用により抗腫瘍効果を示したものであるが、結果より、この薬剤の効果として、腫瘍の大きさや、投与時期に影響されるものと考えられた。また、薬剤の特性として、効果は腫瘍の種類、血管密度、増殖速度や VEGF 以外の血管増殖因子の関与など、様々な要因により影響を受けるものと予想された。治療効果が濃度依存性でなかったことについては、もっとも少ない薬剤を用いた群 (Group 3, 12.5mg/kg bw)でも有効治療量を超えていたものと考えられた。

〔結論〕今回、SU5416 が腫瘍内壊死を誘導し、有意に生存期間を延長させたことは、血管新生阻止を目的とした悪性グリオーマの補助療法のひとつとして期待できる薬剤であると思われた。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1386号	氏 名	高本 剛
論文題目	Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival 移植ラット脳グリオーマ(GS-9L)に対する Flk-1 特異リン酸化阻害剤 SU5416 の増殖抑制効果と生存延長効果		
審査委員	主 査 久野高義、 副 査 黒田嘉和 副 査 伊東 宏		
審査終了日	平成 13 年 12 月 4 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

〔目的〕腫瘍の増殖や転移には血管新生が関与しているものと考えられる。血管新生は種々の促進因子と抑制因子とのバランスによって制御されており、通常の状態では後者が優位である。しかし、腫瘍や虚血状態、外傷後のような状態では、前者が優位となる。現在、様々な分野で血管新生に関係する個々の分子を標的とした治療が行われてきている。SU5416 は血管内皮増殖因子(VEGF)の受容体の1つである Flk-1/KDR のチロシンキナーゼ活性を選択的に阻害する薬剤である。SU5416 は頭蓋外のいくつかの腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果が確認されているが、生体内における脳腫瘍モデルでの腫瘍増殖抑制効果は確認されていない。今回、我々はラットグリオーマ細胞である GS-9L を用いた脳腫瘍モデルを作成し、SU5416 の治療効果を検討した。

〔方法〕GS9L $5 \times 10^4/5 \mu l$ を定位的手術により雄ラット (Fisher 344、合計 63 匹) の脳内 (右尾状核) に移植し、第 1 日および第 8 日より SU5416 による治療を開始した。治療は、SU5416 を DMSO で 3 段階 (12.5, 25.0, 50.0mg/kg bw) の濃度に溶解希釈し、1 日 1 回腹腔内に投与し、症状が出現するまで投与を続けた。麻痺や摂食不能などの症状が出現した時点で安楽死処分とした。ラットは、無治療群を Group 1 (n=7)、DMSO のみ腹腔内投与した対照群を Group 2 (n=14)、SU5416 12.5mg/kg bw 投与群を Group 3 (n=14)、25.0mg/kg bw 投与群を Group 4 (n=14)、50.0mg/kg bw 投与群を Group 5 (n=14) とした。Group 2 から Group 5 において、第 1 日治療開始群を Group A、第 8 日治療開始群を Group B に分けて、それぞれの平均生存期間を対照群と比較検討した。また、病理組織学的に腫瘍組織の変化を観察するとともに、抗 CD31 抗体を用いて血管内皮細胞を選択的に染色、血管密度を定量的に評価した。また、TUNEL 法により、腫瘍組織内におけるアポトーシス細胞の増減について観察した。

〔結果〕症状出現までに、Group 1 では 16.3 ± 0.5 日であった。治療群では、第 1 日治療開始群 (Group A) においては、Group 2 で 16.8 ± 2.3 日 (NS)、Group 3 で 24.3 ± 5.7 日 ($p < 0.05$)、Group 4 で 25.2 ± 2.6 日 ($p < 0.0005$)、Group 5 で 24.5 ± 5.4 日 ($p < 0.05$) であった。第 8 日治療開始群 (Group B) においては、Group 2 で 14.3 ± 0.8 日 ($p < 0.00001$)、Group 3 で 17.9 ± 1.4 日 ($p < 0.01$)、Group 4 で 16.6 ± 1.3 日 (NS)、Group 5 で 17.0 ± 2.2 日 (NS) であった。この結果、第 1 日治療開始群 (Group

A) において、濃度依存性ではないものの、SU5416 による治療群では有意に生存期間を延長する効果が確認できた。また、第 8 日治療開始群 (Group B) でも、DMSO のみ投与した群と比較すると、SU5416 による治療群では有意に生存期間を延長した (Group 3; $p < 0.0001$, Group 4; $p < 0.001$, Group 5; $p < 0.01$)。病理組織学的には、無治療群 (Group 1) では、腫瘍組織内に壊死巣はほとんど認められなかったが、第 1 日治療開始群 (Group A) の Group 5 では、腫瘍組織内に多くの広範な壊死巣が認められた。また、抗 CD31 抗体を用いた血管密度の観察では、無治療群では 87.4 ± 4.4 / field $\times 200$ に対して治療群では 21.5 ± 7.5 / field $\times 200$ と著明な低下が認められた。TUNEL 法によるアポトーシスの検索では、腫瘍組織におけるアポトーシス細胞の増加が認められた。また、使用した濃度では、脳室脈絡叢および腎糸球体など Flk-1 を恒常的に発現している組織においても明らかな副作用の出現を認めなかった。

〔考察〕第 1 日治療開始群 (Group A) においては対照群よりも有意に生存期間を延長させたが、第 8 日治療開始群 (Group B) では効果は少なかった。このことは、Group B ではすでに腫瘍はかなり増大しており、増殖速度が薬剤の抗腫瘍効果よりもかなり上回っていたものと考えられた。また、今回の研究では、SU5416 の血管新生阻害作用により抗腫瘍効果を示したものであるが、結果より、この薬剤の効果として、腫瘍の大きさや、投与時期に影響されるものと考えられた。また、薬剤の特性として、効果は腫瘍の種類、血管密度、増殖速度や VEGF 以外の血管増殖因子の関与など、様々な要因により影響を受けるものと予想された。治療効果が濃度依存性でなかったことについては、もっとも少ない薬剤を用いた群 (Group 3, 12.5mg/kg bw) でも有効治療量を超えていたものと考えられた。

〔結論〕本研究は、新規チロシンキナーゼ阻害薬 SU5416 のラット脳腫瘍モデルに対する効果を調べたものであるが、SU5416 が腫瘍内壊死を誘導し、ラット脳腫瘍モデルの生存期間を延長させたことを示す最初の結果を示したものであり、血管新生阻害を目的とした悪性グリオーマの補助療法のひとつとして期待できる薬剤であることを示唆する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。