



Vascular Endothelial Growth Factor Increased by Pulmonary Surgery Accelerates the Growth of Micrometastases in Metastatic Lung Cancer

真庭, 謙昌

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-10-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2274

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002274>

※ 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。



氏名・（本籍）	ま 真 庭 謙 昌	（島根県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1653号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成10年10月14日	
学位論文題目	Vascular Endothelial Growth Factor Increased by Pulmonary Surgery Accelerates the Growth of Micrometastases in Metastatic Lung Cancer (肺手術時に上昇する血管内皮増殖因子による微小肺転移巣の増大)	
審査委員	主査 教授 岡 田 昌 義 教授 伊 東 宏 教授 石 井 昇	

論文内容の要旨

転移性肺腫瘍に対する外科手術はすでに確立されているが、現在その適応も拡大され多発性の転移に対しても実施されている。しかし、症例によっては肺転移巣切除後の早期に再発することがあり、その治療は極めて困難である。我々は転移性肺腫瘍手術の120症例を検討した結果、初回肺手術から6ヶ月以内に12例（10%）に肺転移巣の再発を認めたが、これらの予後は極めて不良である。

このような現況下に、われわれは肺手術後における腫瘍血管増生の抑制作用の低下が重要な役割を演じているのではないかと考え、肺転移巣の再発に関する血管内皮増生因子（VEGF）の役割について、臨床的および実験的研究を行った。その結果、肺手術により上昇する VEGF が潜在する微小肺転移巣の急速な増大をもたらすという事実を証明した。

対象並びに方法

臨床研究として、肺切除術が施行された13症例について、術前、術直後、術後6時間、12時間、18時間、24時間、48時間に末梢血を採取し、直ちに遠心分離後、血清を凍結保存し、血清中の VEGF₁₆₅濃度を、ELISA キットを用いて測定した。

実験には、BDF-1 マウス、8 週齢、メスを使用した。一方、細胞培養は、Lewis lung carcinoma 細胞を培地内で培養し、実験使用直前に 1.0×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を作成した。VEGF として、recombinant human VEGF₁₆₅を用い、生理食塩液10μl 中に VEGF が10ng, 200ng, 1,000ng 含有される溶液を作成し、各々をマウスの腹腔内に投与した。血管増生阻止剤としてフマギリン由来の血管増生阻止剤 AGM-1470 (30mg/kg/day) をマウスの皮下に注入した。

1.0×10^4 の Lewis lung carcinoma 細胞をマウスの尾静脈に注入することにより血行性肺転移モデルを作成した（第0日）。微小転移巣に対する VEGF の効果を検討するため、第11日目に VEGF を腹腔内投与した。A 群；VEGF10ng, B 群；200ng, C 群；VEGF 1 μg, D 群；VEGF200ng および AGM-1470 を VEGF 注入日より4日間連続して30mg/kg を皮下投与した。コントロール群は腫瘍細胞注入後は治療を行わなかった。第20日目に直径2.0mm を超える肺転移巣の個数を測定した。

血管新生の病理学的検討をするため、第Ⅷ因子関連抗原による免疫組織化学染色を行い、腫瘍血管

密度を測定した。ホルマリン固定後にパラフィン封埋されたマウス実験標本について、avidin-biotin peroxidase 法により染色した。腫瘍血管密度は 1 mm^2 あたりの平均血管数で呈示した。

統計処理として、すべてのデータを平均±標準誤差で表示した。統計的有意差は analysis of variance により $p<0.05$ をもって判定した。

結果

臨床例において、手術後に VEGF 値の上昇が認められた。術後の血清 VEGF 濃度は13例中12例で術前値よりも上昇しており、術後12時間値の平均は $33.1\pm 19.9\text{ pg/ml}$ で、術前値の $12.9\pm 3.9\text{ pg/ml}$ よりも有意に上昇していた ($p<0.05$)。

血行性肺転移モデルにおける VEGF および血管増生阻止剤の効果としては、予備実験において第11日目に微小肺転移巣が肺内に確認された。また実験群では、いずれも第20日目に肺転移の成立が確認され、また治療の食餌摂取への影響は認めなかった。

直径 2.0 mm を超える肺転移巣の数は B 群で 5.2 ± 1.7 , C 群で 7.5 ± 2.0 と、コントロール群の 0.8 ± 0.3 よりも有意に多くみられた。また D 群では、AGM-1470 の投与により、VEGF の効果が完全に抑制された。

一方、腫瘍血管密度は、どの群においても直径 2.0 mm を超える腫瘍内で有意に高値を示した。

考察

悪性腫瘍の遠隔転移の成立に際しては、いくつかの段階を経過しなければならないが、標的組織内での増殖はその中での最終の段階である。この段階では腫瘍血管新生が必要で、血管新生がなければ転移巣が直径 2 mm 以上に増大することはないと考えられる。事実、悪性腫瘍の患者では、血管新生の抑制によって微小転移巣が臨床的に確認されず潜在していることがある。

この理論は転移性肺腫瘍の患者にも該当するものと考えられる。肺実質内に数多くの微小転移が起こっていても、血管新生により増大し臨床的に転移巣として確認されるものはその一部に過ぎない。この肉眼的転移巣に対して切除術を行う場合、数多くの微小転移巣が潜在している可能性が高い。手術を契機として微小転移巣に血管新生が促進されるならば、それらが急速に増大することになる。

VEGF は血管内皮細胞に特異的な増殖因子であり、中でも165個のアミノ酸からなる isoform が最も活性が強いとされている。VEGF は血管内皮細胞や血管平滑筋などから分泌され、そのレセプターとして血管内皮細胞表面の fms-like tyrosine kinase 1 (flt-1) あるいは kinase insert domain-containing receptor (kdr) が存在している。VEGF は血管新生に関して autocrine または paracrine 的な効果を有しており、この血管新生は創傷治癒や虚血領域における側副血行や網膜症などの生理学的、病理学的な反応にも関わっており、腫瘍血管新生に関しても重要な役割を果たすものと考えられる。

血流供給が不十分であったり、組織中の酸素濃度が低下すると、VEGF が分泌し血管新生を惹起する。このようなメカニズムにより、培養中の腫瘍細胞でも低酸素により数時間で VEGF の mRNA が著明に増加することになる。さらに摘出肺において、低酸素が肺組織中の VEGF mRNA の上昇および VEGF receptor の増加を引き起こすという報告もみられる。このように VEGF は虚血ないしは低酸素状態における重要な血管新生因子である。

本研究において、肺切除術後に血清中で VEGF が上昇した事実は低酸素に対する生理的な反応であったと考えられる。開胸手術では、片肺の虚脱など肺組織を低酸素状態にする操作が必要となり、これにより VEGF の分泌が生じる。我々が確認した血清中の VEGF の上昇は虚血に陥った肺組織内の VEGF が血液中に遊出した結果と考えられる。

血行性肺転移モデルは、腫瘍細胞を静脈内に投与することにより作成された。一方、皮下に移植し

て肺転移モデルを作製する手段もあるが、VEGF の効果のみを検索しうる点でわれわれのモデルがはるかに優れていると考えている。本実験において、腫瘍注入後11日目に VEGF を投与したのは、その時期に肺内に微小転移巣が発生している事実が確認されていたためである。また VEGF の効果を判定するために直径 2 mm を超える転移巣の数を測定した理由は、この径を超えるのには血清新生が不可欠であるという根拠による。

結語

- 1) 腫瘍血管密度の測定は血管新生と腫瘍増大との関係を呈示した。
- 2) 本実験において VEGF は、転移巣において prevascular phase から proliferating phase への移行を促すトリガーとして働いた事実が証明された。
- 3) 実験結果から、肺手術後早期の VEGF の上昇が潜在性の肺転移巣に対して、血管新生を促し急速な増大を引き起こすことが示唆された。
- 4) AGM-1470は強力な血管新生阻止剤であり、転移性肺腫瘍手術後に投与することにより、術後早期の再発が抑制される可能性が大きく示唆された。

論文審査の結果の要旨

転移性肺腫瘍に対する手術はすでに確立されているが、現在その適応も拡大され多発性の転移にも実施されている。しかし、症例によっては肺転移巣切除後の早期に再発することがあり、その治療は極めて困難である。

このような現況下、著者らは肺手術後における腫瘍の血管増生の抑制作用の低下が重要な役割を示していると考え、肺転移巣の再発に関する血管内皮増生因子 (VEGF) の役割について、臨床的および実験的研究を行った。その結果、肺手術により上昇する VEGF が潜在する微小肺転移巣の急速な増大をもたらす事実を証明した。

【対象並びに方法】

臨床研究として、肺切除術が行われた13症例について、術前、術直後、術後6時間、12時間、18時間、24時間、48時間に末梢血を採取し、直ちに遠心分離後、血清を凍結保存し、血清中の VEGF₁₆₅濃度を、ELISA キットを用いて測定した。

実験的研究では、BDF-1 マウス、(8週齢、メス)を使用した。一方、細胞培養は、Lewis lung carcinoma 細胞を培地内で培養し、実験使用直前に 1.0×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を作成した。VEGF として、recombinant human VEGF₁₆₅を用い、生理食塩液10 μ l 中に VEGF が10ng, 200ng, 1,000ng 含有される溶液を作成し、各々をマウスの腹腔内に投与した。血管増生阻止剤としてフマギリン由来の血管増生阻止剤 AGM-1470 (30mg/kg/day) をマウスの皮下に注入した。

1.0×10^4 の Lewis lung carcinoma 細胞をマウスの尾静脈に注入し、血行性肺転移モデルを作成した(第0日)。微小転移巣に対する VEGF の効果を検討するため、第11日目に VEGF を腹腔内投与した。A 群; VEGF10ng, B 群; 200ng, C 群; VEGF 1 μ g, D 群; VEGF200ng および AGM-1470を VEGF 注入日より4日間連続して30mg/kg を皮下投与した。コントロール群は腫瘍細胞注入後は治療を行わなかった。第20日目に直径2.0mm を超える肺転移巣の個数を測定した。

血管新生の病理学的検討をするため、第Ⅷ因子関連抗原による免疫組織化学染色を行い、腫瘍血管密度を測定した。ホルマリン固定後にパラフィン封埋されたマウス実験標本について、avidin-biotin peroxidase 法により染色した。腫瘍血管密度は1 mm²あたりの平均血管数で呈示した。

統計処理として、すべてのデータを平均±標準誤差で表示した。統計的有意差は analysis of variance により $p<0.05$ をもって判定した。

【結果】

臨床例では、手術後に VEGF 値の上昇が認められた。術後の血清 VEGF 濃度は13例中12例で術前値よりも上昇しており、術後12時間値の平均は $33.1\pm 19.9\text{pg/ml}$ で、術前値の $12.9\pm 3.9\text{pg/ml}$ よりも有意に上昇していた ($p<0.05$)。

血行性肺転移モデルにおける VEGF および血管増生阻止剤の効果としては、予備実験において第11日目に微小肺転移巣が肺内に確認された。また実験群では、いずれも第20日目に肺転移の成立が確認され、また治療の食餌摂取への影響は認めなかった。

直径2.0mmを超える肺転移巣の数は、B群で 5.2 ± 1.7 、C群で 7.5 ± 2.0 と、コントロール群の 0.8 ± 0.3 よりも有意に多くみられた。またD群では、AGM-1470の投与により、VEGFの効果が完全に抑制された。

一方、腫瘍血管密度は、どの群においても直径2.0mmを超える腫瘍内で有意に高値を示した。

【考察】

悪性腫瘍の遠隔転移の成立に関しては、いくつかの段階を経過するが、標的組織内での増殖は最終の段階である。この段階では血管新生がなければ転移巣が直径2mm以上に増大することはないと考えられる。事実、悪性腫瘍の患者では、血管新生の抑制によって微小転移巣が臨床的に確認されず潜在していることがある。

この理論は転移性肺腫瘍の患者にも該当するものと考えられる。肺実質内に数多くの微小転移があっても、血管新生により増大し臨床的に転移巣として確認されるものはその一部に過ぎない。この肉眼的転移巣に対して切除術を行う場合、数多くの微小転移巣が潜在している可能性が高い。手術を契機として微小転移巣に血管新生が促進されるならば、それらが急速に増大することになる。

VEGFは血管内皮細胞に特異的な増殖因子であり、中でも165個のアミノ酸からなる isoform が最も活性が強い。VEGFは血管内皮細胞や血管平滑筋などから分泌され、そのレセプターとして血管内皮細胞表面の fms-like tyrosine kinase 1 (flt-1) あるいは kinase insert domain-containing receptor (kdr) が存在している。VEGFは血管新生に関して autocrine または paracrine 的な効果を持ち、この血管新生は創傷治癒や虚血領域における側副血行や網膜症などの生理学的、病理学的な反応にも関わっており、腫瘍血管新生に関しても重要な役割を果たすものと考えられる。

血流供給が不十分であったり、組織中の酸素濃度が低下すると、VEGFが分泌し血管新生を惹起する。このようなメカニズムにより、培養中の腫瘍細胞でも低酸素により数時間で VEGF の mRNA が著明に増加することになる。さらに摘出肺において、低酸素が肺組織中の VEGF mRNA の上昇および VEGF receptor の増加を引き起こすという報告もみられる。このように VEGF は虚血ないしは低酸素状態における重要な血管新生因子である。

本研究において、肺切除術後に血清中で VEGF が上昇した事実は、低酸素に対する生理的な反応であったと考えられる。開胸手術では、片肺の虚脱など肺組織を低酸素状態にする操作が必要となり、これにより VEGF の分泌が生じる。我々が確認した血清中の VEGF の上昇は虚血に陥った肺組織内の VEGF が血液中に遊出した結果と考えられる。

血行性肺転移モデルは、腫瘍細胞を静脈内に投与することにより作成された。一方、皮下に移植して肺転移モデルを作製する手段もあるが、VEGF の効果のみを検索しうる点でわれわれのモデルがはるかに優れていると考えている。本実験において、腫瘍注入後11日目に VEGF を投与したのは、そ

の時期に肺内に微小転移巣が発生するという事実が確認されていたためである。また VEGF の効果を判定するために直径 2 mm を超える転移巣の数を測定した理由は、この径を超えるのには血清新生が不可欠であるという根拠による。

【結語】

- 1) 腫瘍血管密度の測定は血管新生と腫瘍増大との関係性を呈示した。
- 2) 本実験で VEGF は、転移巣において prevascular phase から proliferating phase への移行を促すトリガーとして働いた事実が証明された。
- 3) 肺手術後早期の VEGF の上昇は潜在性の肺転移巣に対して、血管新生を促し急速な増大を引き起こす可能性が大であった。
- 4) AGM-1470 は、強力な血管新生阻止剤であり、転移性肺腫瘍手術後に投与することにより、術後早期の再発が抑制される可能性が大きく示唆された。

本研究は、転移性肺腫瘍のメカニズムを解明したものであり、その貢献は大きく、本研究者は博士（医学）の学位をうける資格があるものと認める。