

平成29年9月

小山哲史 学位論文審査要旨

主査 片岡英幸
副主査 竹内裕美
同 今村武史

主論文

Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model

(腫瘍マウスモデルにおいてプロリル水酸化酵素阻害剤による腫瘍血管の正常化は化学療法に対する感受性を回復させた)

(著者：小山哲史、松永慎司、今西正樹、前川洋一、北野博也、竹内裕美、富田修平)

平成29年 Scientific Reports DOI:10.1038/srep45621

参考論文

1. Submucosal abscess of the esophagus caused by piriform sinus fistula treated with transoral video laryngoscopic surgery

(経口的ビデオ喉頭鏡手術を施術した下咽頭梨状陥凹瘻に起因する食道の粘膜下膿腫)

(著者：小山哲史、藤原和典、森崎剛史、福原隆宏、河本勝之、北野博也、竹内裕美)

平成28年 ORL 78巻 252頁～258頁

2. Basaloid squamous cell carcinoma arising in an inverted papilloma in the nasal cavity: A case report and review

(鼻腔内反性乳頭腫に生じている類基底細胞扁平上皮癌：症例報告と検討)

(著者：小山哲史、中村陽祐、横山裕子、森崎剛史、福原隆宏、藤原和典、北野博也、竹内裕美)

平成29年 Auris Nasus Larynx 44巻 624頁～628頁

学 位 論 文 要 旨

Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model

(腫瘍マウスモデルにおいてプロリル水酸化酵素阻害剤による腫瘍血管の正常化は化学療法に対する感受性を回復させた)

癌を栄養する腫瘍血管は、正常組織と比較し血管数は多いが小さく、密着結合や周皮細胞が乏しく機能的には未熟で、透過性が高い。その結果、酸素供給が低下し低酸素領域は増す。こうしてできた腫瘍内微小環境は化学療法感受性低下の原因となる。血管の性状決定には低酸素誘導因子(HIF)が関連しており、HIFの制御により腫瘍血管の正常化が可能と示された。一方、遺伝子改変マウスを用いた研究が主で、薬剤によるHIFの制御と正常化の報告はない。Dimethylloxaloylglycine(DMOG)は、HIFの分解酵素であるプロリル水酸化酵素(PHD)阻害剤である。本研究では、DMOGの投与により腫瘍血管が正常化され、化学療法の感受性が向上するかについて検討を行った。

方 法

8-12週齢C57BL/6マウスに、ルイス肺癌細胞株 1×10^6 を側腹部皮下に移植し肺癌モデルマウスを作成した。移植日を1日目とし、10日目に400 mg/kgのDMOGを腹腔内に投与した。

1. 腫瘍体積の変化

PHD阻害剤が腫瘍の発育に影響するか、腫瘍移植1日目から15日目まで2日に1度腫瘍径を測り、以下の公式で体積を求め比較した： $V(\text{mm}^3) = \pi (\text{長径} \times \text{短径}^2) / 6$

2. 腫瘍血管の形態および性状

移植15日目時点で、以下①～⑤を比較した。

①血管数、血管径：腫瘍を摘出し8 μm 切片を作成して、抗CD31抗体で蛍光免疫染色を行い単位面積あたりの血管数と血管径を検討した。②密着結合と周皮細胞：薄切切片を抗CD31抗体と抗ZO-1抗体、または抗NG2抗体で染色し共染色された領域を検討した。③血管透過性：デキストラン-FITCを尾静注し10分後に腫瘍を摘出した。抗CD31抗体で染色を行い間質に漏出したデキストラン-FITCの量を検討した。④薬物送達：ヘキスト33342 50 mg/kgを尾静注し10分後に腫瘍を摘出し、核が染色された領域を検討した。⑤低酸素領域：ピモニダゾール 60 mg/kgを腹腔内に投与し90分後に腫瘍を摘出した。抗ピモニダゾール抗体を用い

て染色し低酸素領域を検討した。

3. PHD阻害剤投与が化学療法感受性に及ぼす影響

DMOG投与、抗がん剤投与の有無で4群に分けて比較検討を行った。DMOG投与は移植10日目、シスプラチン2.5 mg/kgの3日間連続投与は移植15日目に行った。

①アポトーシス、DNA損傷：シスプラチン投与24時間後のアポトーシスおよびDNA障害を、抗CC3抗体または抗 γ H2AX抗体で染色を行い総核数に対する割合を評価した。②腫瘍体積の変化：2日に1度腫瘍径を測定し体積を比較した。測定は移植23日目、または腫瘍体積が4,500 mm³に到達するまで行った。

結 果

1. PHD阻害剤は腫瘍体積に影響を与えない

移植1日目から15日目までの観察ではPHD投与の有無で腫瘍体積に差はなかった。

2. PHD阻害剤による腫瘍血管の正常化

①血管数、血管径：PHD阻害剤の投与は有意に血管数を減少させ、血管径を大きくした。②密着結合と周皮細胞：PHD阻害剤の投与は有意に密着結合と周皮細胞を増加させた。③血管透過性：PHD阻害剤の投与は血管透過性を低下させた。④薬物送達：PHD阻害剤の投与は薬物送達を有意に向上させた。⑤低酸素領域：PHD阻害剤の投与は有意に低酸素領域を減少させた。

3. PHD阻害剤による腫瘍血管の正常化は化学療法の感受性を向上させる

①アポトーシス、DNA障害：PHD阻害剤のみ、抗癌剤のみの投与はアポトーシスおよびDNA障害に影響を与えなかった。PHD阻害剤と抗癌剤の両者を投与した群のみアポトーシスおよびDNA障害が有意に増加した。②腫瘍体積：PHD阻害剤のみ、抗癌剤のみの投与は腫瘍体積に影響を与えなかった。PHD阻害剤と抗がん剤の両者を投与した群のみで腫瘍体積の増加が有意に抑制された。

考 察

PHD阻害剤の全身投与は腫瘍血管を正常化させた。腫瘍血管の性状決定にはPHDシグナル経路の内、特に血管内皮細胞内のHIF2 α の関与が報告されている。PHD阻害剤は腫瘍血管内皮に働きかけ、PHD-HIF2 α 経路を活性化させることで腫瘍血管を正常化したと考えられた。また、形態的正常化は機能的正常化にも関係し、血管透過性の低下、薬物送達の改善、低酸素領域の減少など腫瘍内微小環境を改善した。

PHD阻害剤による腫瘍血管の正常化は化学療法の感受性向上に寄与した。これは、腫瘍内

微小環境が改善したことに加え、抗癌剤の薬物送達が向上したことも要因として考えられた。今回シスプラチンの投与量は過去の報告より少なく設定しており、有害事象を増やすことなく化学療法の効果を高める可能性が示された。

結 論

PHD阻害剤の投与は腫瘍の発育を助長することなく腫瘍血管を正常化させた。また、PHD阻害剤による腫瘍血管の正常化は化学療法の感受性を向上させた。