The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的研究
Author(s)	小泉, 桂一
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169335
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Ⅷ 7407

癌組織血管を標的とした
新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的研究

2000年

小泉　桂一

目次

始めに 1

第一部 抗体を用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に向けた基礎的検討 2

緒論 2

本論

第一章 癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体の作製と特性評価 5

第一節 癌組織血管内皮細胞に対する特異モノクローナル抗体の作製 5

第二節 ラット KMT-17 繊維芽肉腫に対する TES-23 の特異性に関する検討 7

第三節 小括 9

第二章 TES-23 の異なった動物種、癌種に対する交差性に関する検討 10

第一節 各種マウス腫瘍およびヌードマウスにおけるヒト癌細胞株移植モデルに対する TES-23 の集積性に関する検討 10

第二節 ヒト癌組織血管内皮細胞への交差性に関する検討 13

第三節 小括 14

第三章 Immunoconjugate TES-23-NCS の作製と *in vivo* 抗腫瘍効果に関する検討 17

第一節 TES-23-Immunoconjugate 作製における最適な抗癌剤の選択 17

第二節 抗体の糖鎖修飾による TES-23-NCS Immunoconjugate の作製 19

第三節 Immunoconjugate TES-23-NCS の *in vivo* 抗腫瘍効果 21

第四節 小括 25

第二部　細胞を用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に向けた基礎的検討　27

緒論　27

本論

第一章　Fractalkine レセプター(CX3CR1)を利用した癌組織血管に対する指向性を有する血管内皮細胞作製のための基礎的検討　30

第一節　CX3CR1 発現細胞の活性化血管内皮細胞に対する接着性亢進の確認　31

第二節　*in vivo* における CX3CR1 発現細胞の癌組織に対する指向性の評価　32

第三節　小括　34

第二章　ヒト大動脈血管内皮細胞がマウス癌組織血管に組み込まれる証拠　35

第一節　ヒト大動脈血管内皮細胞がマウス癌組織血管に組み込まれる証拠　35

第二節　小括　40

総括　42

結論　45

謝辞　47

引用文献　48

初めに

1971 年に Folkman は、癌組織が直径 1～2 mm を越えたところで血管新生の誘導因子(Tumor Angiogenesis Factor; TAF)を分泌し、それまでの静止状態から指数関数的に増殖していくという概念を提唱した [1)]。その際に、癌組織に近接した既存の毛細血管が酸素や栄養の供給源となり、また、老廃物を除去するための経路として用いられる。いったん癌組織が巨大になると癌組織中心部は血流の供給が間に合わず低酸素状態に陥るが、それが SOS シグナルになって血管新生のスイッチが ON になり癌組織内に新生血管が誘導される。毛細血管の内腔を裏打ちしているわずかな薄い血管内皮細胞が、これらの現象の主役を演じていることが数々の研究から明らかにされた [2)-3)]。また、癌組織内の 1 本の毛細血管は 10^4 個もの癌細胞の酸素や栄養分の供給および老廃物の排出を行っていることが知られていることから [4)]、癌組織血管を破綻させることにより、この癌組織のライフラインを遮断することで癌細胞を 1 つ 1 つ障害せずとも癌組織を壊死あるいは退縮させることが期待できる [5)]。以上の事実から癌の治療法の一つとして、癌組織血管内皮細胞、癌組織血管を標的とした治療戦略が考案されてきた。そこで、本研究では、全く新しい二つのストラテジーのもとに癌組織血管に薬物を送達させる薬物キャリアーとして、第一部では抗体を、第二部では細胞自身を利用することで、抗体および細胞を用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に向けた基礎的検討を行った(Fig.1)。

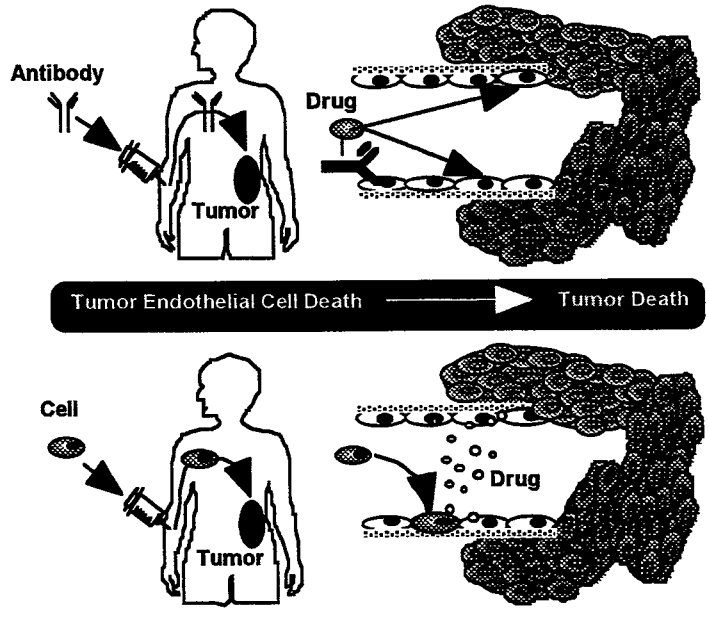

Fig. 1. Schematic Strategy of Tumor Vascular Targeting Using Antibody and Cell

第一部

抗体を用いた癌組織血管を標的とした
新規癌ミサイル療法の開発に向けた基礎的検討

緒論

現在、臨床で実際に用いられている 5- Fluorouracil などの抗癌剤は顕著な抗腫瘍効果を有しているものの、静脈内投与されたこれらの抗癌剤は血流を介してあらゆる組織に分布してしまうため、標的とする癌組織に到達できる量は極めて微量であることが知られている。そのため、抗癌剤に対する感受性が高い組織においては、必然的に重篤な副作用を招いてしまっている。したがって、抗癌剤に癌組織へのターゲティング能を付与し選択的に癌組織へ送達することによって、優れた薬効と高い安全性を発揮できる Drug Delivery System (DDS)の開発が切望されている。このような観点から、様々な癌ターゲティング療法の開発が試みられてきた。この中で、特に癌細胞に対するモノクローナル抗体に抗癌剤を結合した、いわゆる癌ミサイル療法は最も魅力的なアプローチとして多大な努力が行われてきた。しかしながら、実際には期待されたような成果は得られていないのが現状である [6)-7)]。この原因として以下の点が考えられる。第一に、血中に投与されたミサイルキャリアー(抗体ー抗癌剤複合体；Immunoconjugate)は、抗体の分子量が 15 万以上であるため、血管の内腔を一層で覆う血管内皮細胞層が透過の障壁となってしまい、癌組織への移行量は著しく制限されてしまうことが挙げられる [8)-10)]。実際に、ヒトにおいては Immunoconjugate の癌組織への到達量は投与量のわずか 0.001～ 0.01% 程度でしかない。第二に、癌細胞の抗原多様性が挙げられる [11)-13)]。すなわち、ある癌抗原に対するモノクローナル抗体をミサイルキャリアーとした場合、その抗原を発現している限られた癌種、癌細胞にしか適用できないために広く一般的なキャリアーとはなり得ないのである。著者らはこれらの問題点を克服するために、癌細胞自体を標的とするのではなく、癌組織内の血管内皮細胞を標的とする新しいストラテジーを構築した。すなわち、癌細胞自身に対する抗体を用いるのではなく、癌組織内の血管内皮細胞に対する抗体をミサイルキャリアーとして用い、癌組織のライフラインである血管を破綻させることにより癌組織を壊死させようとするアプローチである(Fig. 2)。癌組織内の 1 本の毛細血管は、10^4 個もの癌細胞の酸素や栄養分の供給および老廃物の排出を行っていることが知られて

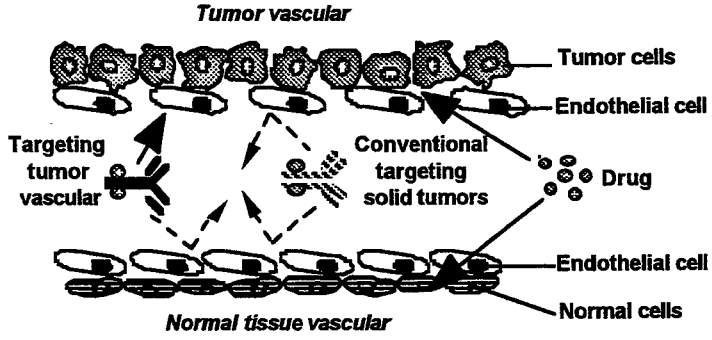

Fig. 2. New Approach to the Targeting Therapy of Cancer with Monoclonal Antibody against Tumor-derived Endothelial Cells

いることから [4]、癌組織血管を破綻させることによりこの癌組織のライフラインを遮断することで、癌細胞を 1 つ 1 つ障害せずとも癌組織を壊死あるいは退縮させることが期待できる [5),14)-16)]。さらに、癌組織の血管内皮細胞は一般に癌種によらず、正常組織に比べ物質透過性が亢進している [17)-27)]といった数多くの共通した特性を有しているため、癌組織血管内皮細胞上にはこれらの特性を制御するような共通の特異分子が発現していることが示唆される。したがって、この癌組織血管内皮細胞上の共通した特異分子に対する抗体をミサイルキャリアーとして用いれば、あらゆる種類の癌組織への薬物送達が可能な標的指向型薬剤が創製できると考えられる。そのうえ、癌組織の血管内皮細胞を標的とした場合、癌組織血管は直接血流にさらされているためミサイルキャリアーは直接抗原と結合可能となり癌組織への移行性を考慮する必要もなくなる。しかしながら、これまでは癌組織の血管内皮細胞に対する特異抗体はおろか、その抗原となる癌組織の血管内皮細胞の単離・培養さえも行われてはいなかった。そこで、当研究室では、これまでに、ラット KMT-17 線維芽肉腫より癌組織血管内皮細胞（Tumor-derived endothelial cells ; TEC)の単離、培養法の確立を行ってきた [28)]。

従って、第一章では、この TEC を免疫原として用いることで癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体の作製を行い、この抗体の特性を評価した。第二章では、著者のストラテジー通り、作製した癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体 TES-23 が多くの癌種を認識し得ることを、各種マウス癌組織に対する TES-23 の集積性を検討することにより評価した。さらに、ヒト癌組織血管内皮細胞にも共通特異抗原が発現していることを確認するために様々なヒト癌組織切片の免疫組織化学染色を行い、その結果をもとに、TES-23 のヒトへの臨床応用に対する可能性を検討した。第三章では、タンパク性抗癌剤であるネオカルチノスタチン(NCS)との Immunoconjugate

(TES-23-NCS) を作製し、TES-23 を用いた癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法のヒトへの臨床応用を視野に入れて、TES-23 が適応可能なミサイルキャリアーとなり得る可能性を示すために Meth-A 線維芽肉腫担癌マウスに対して TES-23-NCS による抗腫瘍効果を検討した。

本論

第一章　癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体の作製と特性評価

著者らはこれまでに、ラット KMT-17 繊維芽肉腫より癌組織血管内皮細胞(Tumor-derived endothelial cells; TEC)の単離・培養法の確立を行っており [28]、また、この培養 TEC は *in vivo* における癌組織血管の特性を発現・維持していることが、物質透過性の亢進 [29](Fig.3)、TNF-αに対する感受性の増大などよって既に確認されている。従って、この TEC を免疫原として用いることで癌組織血管内皮細胞に特異的に反応性を示す、癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体の作製を試みた。

第一節　癌組織血管内皮細胞に対する特異モノクローナル抗体の作製

本節では、TEC の膜タンパク質を免疫原としてマウスに免疫を施し、脾細胞とミエローマ細胞とを融合させることにより TEC に対するモノクローナル抗体を作製した。

実験材料と方法

癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体の作製

癌組織血管内皮細胞特異抗体を産生するハイブリドーマは、初代培養ラット正常血管内皮細胞であるラット精巣上体脂肪由来血管内皮細胞(FCEC)と著者らが単離培養した TEC を用いて作製した。得られたハイブリドーマ TES-23(IgG1)とマウス形質細胞腫 MOPC-31C(ATCC CCL 130)を BALB/c マウスの腹腔に移植し、腹水より得られた抗体はプロテイン A アフィニティーカラム(Bio Rad Laboratory、Richmond、CA)により精製した。なお、マウス形質細胞腫 MOPC-31C より得られたマウス IgG1 モノクローナル抗体(MOPC-31C)を negative control 抗体として以後の検討に用いた。

免疫組織化学的検討による癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体の特性評価

KMT-17 癌組織を摘出した後、細片した組織を O.C.T.Compound(Tissue TEK、Miles、Elkhart、IN)に包埋した。直ちに液体窒素に浸し凍結し、5 μm のクリオスタット切片とし、4 ℃ のアセトンに 10 分間浸して固定した後、内因性パーオキシダーゼをブロ

ックするため 0.3% 過酸化水素水含有メタノール溶液で室温、15 分間処理した。それを、1.5% ウマ血清(Vector、Burlingame、CA)含有 PBS 溶液で室温、20 分間ブロッキングを行い、ハイブリドーマの培養上清中で 37 ℃ 、30 分間インキュベートした。その後、パーオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を室温、30 分間作用させた後、基質(0.125 mg/ ml 3.3'- diaminobenzidine、0.01% 過酸化水素水含有 50 mM Tris- HCl (pH 7.2))を添加して発色させた。また、ヘマトキシリンで核染色を施した。

結果および考察

TEC を免疫原として用いることで、癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体、TES- 23 を得ることができた。実際に、この TES- 23 を産出するハイブリドーマの培養上清を用いて、KMT- 17 繊維芽肉腫担癌ラットから摘出した癌組織、肝臓、腎臓の凍結組織切片を免疫染色したところ、肝臓、腎臓などの正常組織の血管内皮細胞にはほとんど交差性は示さなかった。しかしながら、癌組織に関しては TES- 23 は増殖の停止した血管内皮細胞(矢頭)とそこから伸びる増殖中の血管内皮細胞と思われる細胞(矢印)も染色されており、TES- 23 は増殖の停止した血管内皮細胞と増殖中の新生血管の内皮細胞どちらも認識することが示唆された(Fig.4)。

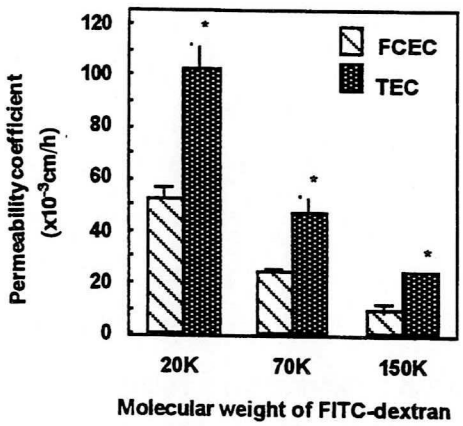

Fig. 3 Permeability of Each Molecular Weight of FITC- dextran to Rat Endothelial Monolayers
FCEC and TEC were cultured in permeation chamber,Intercell™. The permeability coefficients were measured, when cells reached confluent. * P<0.001 compared to FCEC

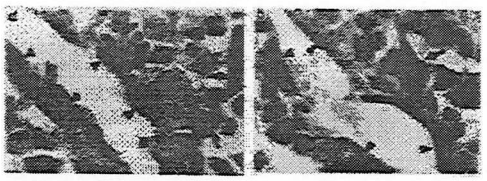

Fig. 4. Immunostaining of Tissue Sections of KMT-17 Tumor with TES-23
KMT-17 tumor tissue sections were fixed with acetone and stained with TES-23. ×1000.

最近、VEGF レセプターの様に増殖中の新生血管内皮細胞に比較的多く発現する分子を標的としたターゲティング療法の試みがなされているが [30]、*in vivo* での治療効果

についての報告は未だ公表されていない。これは、発現部位の特異性の低さと、新生血管のみをターゲットとしたのでは十分な抗腫瘍効果が得られないためと考えられる[31)-38)]。しかしながら、TES-23 は本検討において癌組織内の全ての血管内皮細胞を認識する可能性があることから、極めて有効なミサイルキャリアーとなり得ると考えられる。従って、TES-23 をミサイルキャリアーとして用いて癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法を確立するために、以後の検討を行うこととした。

第二節　ラット KMT-17 繊維芽肉腫に対する TES-23 の特異性に関する検討

前節では、癌組織血管内皮細胞を全て認識できる、癌組織血管内皮細胞特異抗体、TES-23 を作製することができた。本節では、その TES-23 が癌組織血管内皮細胞を特異的に認識する有効なミサイルキャリアーとなり得るか否かを評価する目的で、^{125}I ラベル化 TES-23 を用いて KMT-17 繊維芽肉腫担癌ラットに対する TES-23 の生体内挙動に関する詳細な検討を行った。

実験材料と方法

^{125}I ラベル化抗体の作製

TES-23 およびマウス形質腫細胞 MOPC-31C の産生する IgG1(MOPC-31C)は常法に従い、プロテイン A アフィニティーカラムにより行った。抗体の ^{125}I ラベル化は Iodogen 法により行った。すなわち、2.5 μg/vial で Iodogen/CH_3Cl を添加し、一晩風乾してコーティングした V-vial に 100 μg TES-23/50 μl 0.1 M リン酸緩衝液と 0.5 mCi/5 μl Na^{125}I を添加し、30 秒毎に撹拌させながら室温で 5 分間反応させた。その後、5 mg/ml KI、0.02% Tween20、0.1% BSA/PBS を 500 μl 加えて、エッペンドルフチューブに回収し、脱塩カラムにより 10 mM Hepes、1% BSA/PBS で分画分取した。

^{125}I ラベル化抗体の臓器分布

腹水継代していた KMT-17 繊維芽肉腫を 1x10^6 cells/head で WKAH/Hkm ラット(メス、6 週齢)に皮下移植し、移植後 4 日目から、投与後の遊離 ^{125}I の非特異的な取り込

みを防ぐために飲料水として 0.1% KI 水溶液を与えた。腫瘍重量が 1～2 g となった腫瘍移植後 9 日目に、^{125}I ラベル化 TES-23 (^{125}I-TES-23、5.86 μg/0.85 μg)、MOPC-31C(^{125}I-MOPC-31C、5.96 μCi/1 μg)を各々の非標識抗体 99 μg/rat と混合し、150 ng/head でそれらを尾静脈内投与した。投与後 1 時間に血液、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、肺、筋肉および癌組織を摘出し、放射活性を測定した。

結果および考察

Iodogen 法により ^{125}I-TES-23 と ^{125}I-MOPC-31C を作製し、これら ^{125}I ラベル化抗体を用いて KMT-17 担癌ラットにおける TES-23 の体内動態を検討したところ、negative control 抗体である MOPC-31C はほとんど癌組織に移行しなかったのに対して、TES-23 は投与後わずか 1 時間で組織当たりの投与量にして 20%もの癌組織集積性を示した(Fig.5)。

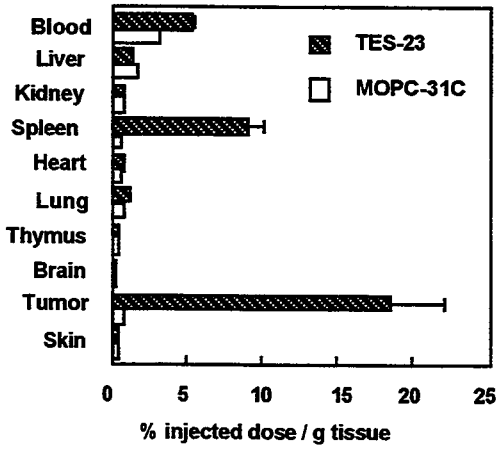

Fig. 5. Tissue Distribution of ^{125}I-labeled TES-23 in WKAH/Hkm Rats Bearing KMT-17 Fibrosarcoma 1 h after Intravenous Injection
150 ng of ^{125}I-labeled TES-23 and MOPC-31C, 1.5×10^6 cpm injected intravenously into WKAH/Hkm rats. Average of 4 animals sacrificed at 1h. All data are expressed as the mean % injected dose / g tissue; *bars*, SE.

また、正常組織にはほとんど移行が認められず TES-23 は癌組織に著しく集積することが明らかとなった。一般に癌細胞自身に対するモノクローナル抗体では投与後 24 時間においても 0.001～0.01%の癌組織集積性を示すにすぎないことからも [39]、本結果は、癌細胞自体ではなく癌組織血管内皮細胞を標的とすることの有用性を示唆してい

るものと考えられる。その際、脾臓へも若干の集積が確認されたことから血球系への副作用が若干懸念されるものの、TES-23 がわずか 1 時間という短時間で癌組織特異的に高集積性を示したことで、TES-23 が癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法を確立するうえでの有用なミサイルキャリアーとなり得ることが示唆された。

第三節　小括

第一節では、癌組織血管内皮細胞に対するモノクローナル抗体の作製を試みた結果、TEC に対する特異性の高い TES-23 の作製に成功した。これまでに、癌組織血管に発現している Endoglin や Endosialin をはじめとする様々な抗原を認識する抗体が報告されてきたが [40)-44)]、これらの抗体が認識する抗原は、正常組織血管内皮細胞や他の正常細胞にも高発現しているため、癌組織血管をターゲットとしたミサイルキャリアーとはなり得ない。しかしながら、TES-23 は肝臓、腎臓などの正常組織の血管内皮細胞には、ほとんど交差性は示さないにもかかわらず、癌組織においては、増殖の停止した血管内皮細胞とそこから伸びる増殖中の血管内皮細胞の両方を認識することが明らかとなった。また、第二節においては、KMT-17 繊維芽肉腫担癌ラットに対する TES-23 の生体内挙動に関する詳細な検討を行った結果、TES-23 は短時間で組織当たりの投与量にして 20%もの癌組織集積性を示すことが明らかとなった。従って、第一節で示した TES-23 は癌組織内の全ての血管内皮細胞を認識する可能性があることを考え併せると、TES-23 が癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法を確立するうえでの有用なミサイルキャリアーとなり得ると考えられる。

第二章　TES-23 の異なった動物種、癌種に対する交差性に関する検討

前章では、著者らが単離した癌組織血管内皮細胞の由来であるラット KMT-17 繊維芽肉腫に対して、TES-23 が有用なミサイルキャリアーとなり得ることが強く示唆されたが、冒頭において示した当初のストラテジー通り癌組織血管内皮細胞上に動物種や癌種を越えた共通の特異分子が発現しており、これを TES-23 が認識でき得るのならば、TES-23 は非常に優れたミサイルキャリアーとなり得るものと考えられる。そこで、本章では、動物種をラットからマウスに代え、TES-23 がさらに多くの癌種を認識し得ることを各種マウス癌組織で検討し、さらにヒト癌組織血管内皮細胞にも共通特異抗原が発現していることを確認するために、様々なヒト癌組織に対して免疫組織化学染色による評価を行うことで実際にヒト癌治療への可能性を検討した。

第一節　各種マウス腫瘍およびヌードマウスにおけるヒト癌細胞株移植モデルに対する TES-23 の集積性に関する検討

本節では、TES-23 が動物種によらず、さらに多くの種類の腫瘍においても集積性を示すかどうか、すなわち、癌組織血管内皮細胞に共通特異分子が発現しているかどうかを確認するために、Meth-A 線維芽肉腫、Colon 26 腺癌、Sarcoma180(S-180) 肉腫担癌マウスおよびヒト由来 HT-1080 線維芽肉腫に対して、TES-23 を用いての生体内挙動を検討した。

実験材料と方法

^{125}I ラベル化抗体の作製

TES-23 および MOPC-31C の ^{125}I ラベル化は、第一部第一章第二節に準じた。

TES-23 の生体内挙動に関する検討

予め腹水中で維持継代した Meth-A 線維芽肉腫を回収し、BALB/c マウス(メス、4 週齢)の腹部皮内に 5 × 10^5 cells/head で移植した。Colon 26 腺癌細胞は、予め 10% FCS を含む RPMI 1640 培地(日水製薬)で、培養し、BALB/c マウス(メス、4 週齢)の腹部皮内に 5 × 10^5 cells/head で移植した。 S-180 肉腫は、腹水中で維持継

代した細胞を、ddY マウス(メス、4 週齢)の腹部皮内に 5 × 10^5 cells/ head で移植した。また、ヒト由来 HT-1080 線維芽肉腫は、10% FCS、非必須アミノ酸(NEAA MIXTURE;和光純薬工業)を含むイーグル MEM 培地(日水製薬)により培養し、BALB/ c nude マウス(メス、6 週齢)の腹部皮内に 5 × 10^6 cells/ head で移植した。それぞれ 1 週間後、腫瘍径が 6〜8 mm に達したマウスを TES-23 および MOPC-31C の生体内挙動の検討に用いた。Meth-A 線維芽肉腫担癌マウス、Colon 26 担癌マウス、S-180 担癌マウス、および HT-1080 担癌マウスに対して、^{125}I-TES-23 および ^{125}I-MOPC-31C をそれぞれ 20 ng/ head(2 × 10^5 cpm/ head)で、各々尾静脈内投与した。1 時間後に、pentobarbital sodium(Nembutal Injection、DINABOT)を投与して麻酔し、腹部大動脈切断により脱血後、各臓器を摘出した。各サンプルの放射活性は、自動γカウンター(COBRA II、PACKARD)により測定した。

結果および考察

TES-23 は Meth-A 線維芽肉腫に対して、わずか 1 時間という短時間で、112% of injected dose/ g もの量が癌組織に集積し、control 抗体の MOPC-31C と比較した場合、50 倍もの癌組織集積性を示すことが判明した(Fig.6)。この TES-23 の集積性は非ラベル化 TES-23 を前投与することで完全に拮抗阻害されたが、非ラベル化 MOPC-31C の前投与では TES-23 の集積性に全く影響を与えなかった。また、正常組織への集積性には全く影響しなかったことから、癌組織血管内皮細胞にのみ TES-23 によって認識される分子が発現している可能性が示唆された(Fig.7)。同様に、Colon 26 腺癌、S-180 肉腫担癌マウスに関しても、Colon 26 腺癌においては 82% of injected dose/ g もの量が(Fig.8)、また、S-180 肉腫対しても 93% of injected dose/ g もの量が癌組織に集積することが判明した(Fig.9)。

次に、ヒト癌細胞株移植モデルでの検討を行った。ヒト HT-1080 線維芽肉腫をヌードマウスに移植して体内動態を検討したところ、82% of injected dose/ g も癌組織に集積することが判明した(Fig.10)。本実験系では、癌組織内に誘導された血管内皮細胞はマウス由来であるが、この結果は、ヒト癌細胞環境下において血管内皮細胞上に TES-23 が認識する共通分子の発現が誘導され得ることを示唆している。当研究室では、癌細胞のならし培地で正常血管内皮細胞を培養すると、物質透過性の上昇、TNF-α感受性の上昇など、癌組織血管内皮細胞様の性質を帯びてくることを見出しており、液性因子が癌組織血管の形質発現に関与する可能性を示している[45]。

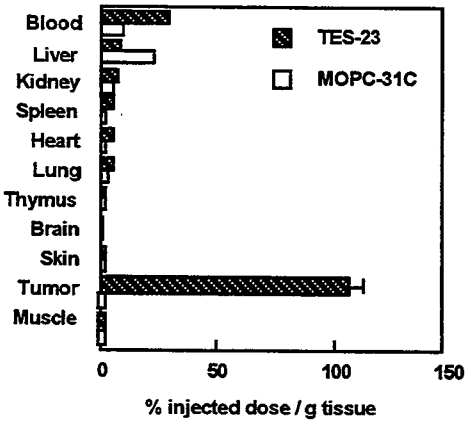

Fig. 6. Tissue Distribution of ^{125}I-labeled TES-23 in BALB/c Mice Bearing Meth-A Fibrosarcoma 1 h after Intravenous Injection
20 ng of ^{125}I-labeled TES-23 and MOPC-31C, 2.0×10^5 cpm injected intravenously into BALB/c mice. Average of 4 animals sacrificed at 1h. All data are expressed as the mean % injected dose / g tissue; bars, SE.

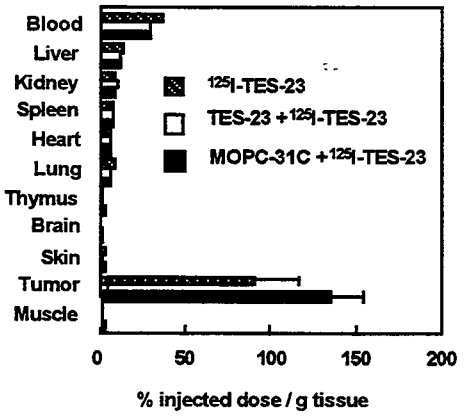

Fig. 7. Competitive Inhibition of Accumulation of ^{125}I-labeled TES-23 in BALB/c Mice Bearing Meth-A Fibrosarcoma 1 h after Intravenous Injection
20 ng of ^{125}I-labeled TES-23 and MOPC-31C, 2.0×10^5 cpm injected intravenously into BALB/c mice. Average of 4 animals sacrificed at 1h. All data are expressed as the mean % injected dose/ g tissue; bars, SE.

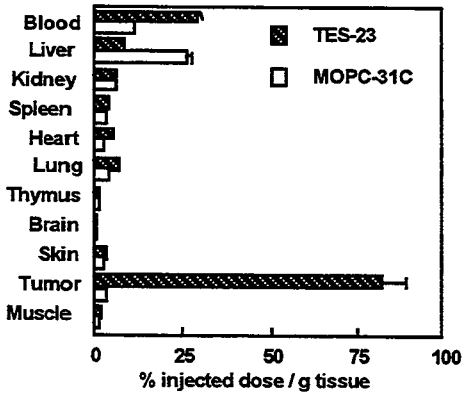

Fig. 8. Tissue Distribution of ^{125}I-labeled TES-23 in BALB/c Mice Bearing Colon 26 Adenocarcinoma 1 h after Intravenous Injection
20 ng of ^{125}I-labeled TES-23 and MOPC-31C, 2.0×10^5 cpm injected intravenously into BALB/c mice. Average of 4 animals sacrificed at 1h. All data are expressed as the mean % injected dose/ g tissue; bars, SE.

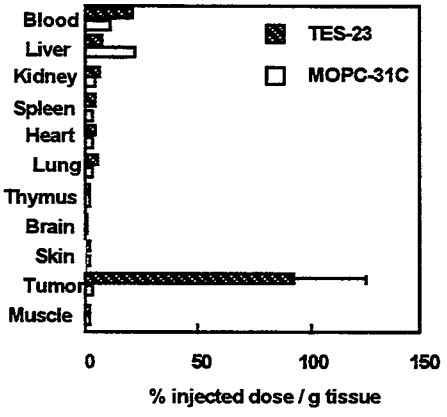

Fig. 9 Tissue Distribution of ^{125}I-labeled TES-23 in ddY Mice Bearing Sarcoma 180 1 h after Intravenous Injection
20 ng of ^{125}I-labeled TES-23 and MOPC-31C, 2×10^5 cpm injected intravenously into ddY mice. Average of 5 animals sacrificed at 1h. All data are expressed as the mean % injected dose / g tissue; *bars*, SE.

また、各組織細胞由来の細胞外マトリックスが各組織血管の特性の維持形成に関与していることも見出している。従って、前章において、動物種としてラット、癌種として KMT-17 繊維芽肉腫に対して、また、本章においては、動物種としてマウス、癌種として Meth-A 線維芽肉腫、Colon 26 腺癌、S-180 肉腫の様々な癌種においても、TES-23 は短時間で高集積性を示したことより、TES-23 が動物種、癌種を越えて適応可能なミサイルキャリアーとなりうる可能性が強く示唆された。さらに、ヒト癌細胞株移植モデルでの検討においても、TES-23 は短時間に著しく癌組織に集積するこ

とが確認できた結果から考え併せると、ヒト癌組織血管内皮細胞においても、TES-23 により認識され得る特異分子が誘導されることが強く示唆された

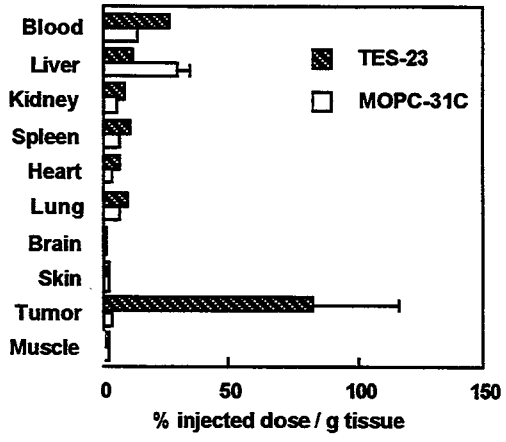

Fig. 10 Tissue Distribution of ^{125}I-labeled TES-23 in BALB/c Nude Mice Bearing HT-1080 Human Fibrosarcoma 1 h after Intravenous Injection
20 ng of ^{125}I-labeled TES-23 and MOPC-31C, 2×10^5 cpm injected intravenously into BALB/c mice. Average of 5 animals sacrificed at 1h. All data are expressed as the mean % injected dose / g tissue; *bars*, SE.

第二節　ヒト癌組織血管内皮細胞への交差性に関する検討

これまでに、TES-23 はラットおよびマウスの多くの癌種において、短時間で高い癌組織集積性を示すことが判明した。その中でも、ヒト癌細胞である HT-1080 線維芽肉腫移植モデルにおいても癌組織集積性を示したことは、ヒト癌組織血管においても TES-23 が認識する共通分子が発現している可能性を示唆している。そこで、本節では、様々なヒト癌組織凍結切片を用いて TES-23 により免疫組織化学染色を行うことで、TES-23 がヒト癌組織血管内皮細胞を認識し得るか否かを検討した。

実験材料と方法

TES-23 によるヒト癌組織の免疫組織化学染色

ヒト癌組織(食道癌、胃癌、大腸癌、乳癌)、およびその周辺部位の正常組織は、大阪大学医学部、塩崎均先生より御供与頂いた。TES-23 による各ヒト癌組織の免疫組織化学染色は、第一部第一章一節に準じて行った。なお、positive control として抗ヒ

ト Factor VIII 抗体を、negative control 抗体として MOPC-31C を用いた。

結果および考察

本節では、実際のヒト癌組織血管内皮細胞を TES-23 が認識し得るか否かを、免疫組織化学染色を行うことにより検討した。

Fig.11 にヒト食道癌組織における免疫組織化学染色写真を示した。TES-23 は、食道癌組織血管内皮細胞において、血管内皮細胞の マーカー抗原である Factor VIII に対する染色像と同様の染色パターンを示したことから、ヒト癌組織血管内皮細胞も TES-23 が認識することが明らかとなった。なお、ヒト癌組織周辺の正常組織の血管内皮細胞は、TES-23 ではほとんど染色されないことが判明している。また、データには示していないが、ヒト胃癌、大腸癌、乳癌に関しても同様であり、これらの結果より、TES-23 はヒト正常組織の血管内皮細胞にはほとんど交差せずに癌組織血管内皮細胞を認識しうること、すなわち、ヒト癌組織血管内皮細胞上にも TES-23 認識共通分子が発現していることが示唆された。したがって、TES-23 はヒトにおいても適応可能なミサイルキャリアーとなり得るものと期待される。

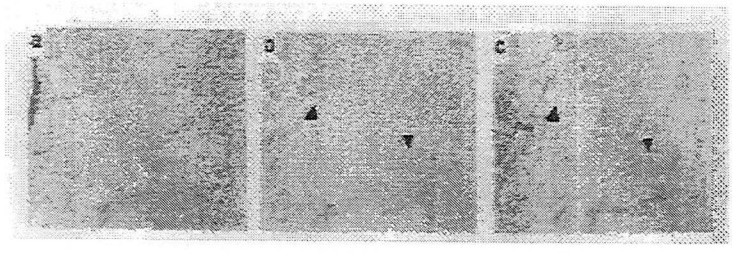

Fig. 11. Immunohistochemical Reactions of TES-23 to Human Tumor Tissues
Frozen tumor tissue sections of oesophagus (a, b, and c), stained with MOPC-31C (a), TES-23 (b), or anti human vWF IgG1 (c)*Arrowheads*, blood vessels.

第三節　小括

本章では、TES-23 の多くの癌種に対する適応、およびヒトの癌治療への応用を念頭において TES-23 の交差性について検討を行った。

第一節で示した様に、TES-23 は Meth-A 線維芽肉腫、 Colon 26 腺癌、および S-180 肉腫担癌マウスに対して癌組織へ高集積性を示すことが明らかとなり、TES-23 は広範囲な癌種で適応可能であることが示唆された。また、ヒト HT-1080 線維芽肉腫に対しても癌組織血管に高集積性を示すことが明らかとなり、ヒト癌細胞によっても、TES-23 により認識される分子が血管内皮細胞上に発現誘導されることが示唆された。また、第二節において、ヒト癌組織切片を TES-23 により免疫組織化学染色したところ、今回検討した食道癌、胃癌、大腸癌、乳癌の 4 種類、全ての癌組織において、癌組織血管内皮細胞が染色され、実際に、ヒト癌組織血管内皮細胞上にも TES-23 が認識する共通特異分子が癌種によらず発現していることが明らかとなった。さて、実際にヒトへの応用を考えていく際、異種タンパクを投与することによる抗原性の問題が生じてくる。ヒトにマウス抗体を投与した場合、抗マウス抗体(HAMA)の産生が認められることが報告されている [46]。また、異種抗体は一般に血中安定性が低いことから、近年、マウス抗体の Fc 部位をヒトキメラ型とすることで、血中半減期が大幅に延長することが報告されている [47)-48]。従って、現在、TES-23 が認識する抗原の同定を進めているところであり、既に、Ohizumi らは、ラット KMT-17 繊維芽肉腫由来の癌組織血管内皮細胞(TEC)を可溶化し、SDS-PAGE 後、western blot を行った結果、TEC ライゼートに分子量約 80kD の TES-23 認識抗原のバンドを確認しており [49]、現在、検討中ではあるが、本抗原のクローニングを行った結果 TES-23 が認識し得るラット抗原のうち少なくとも一つは CD44 分子であることが明らかとなりつつある(Fig.12)。

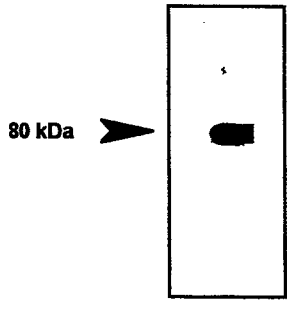

Fig. 12. Western Blot Analysis of Proteins of Cultured TEC by TES-23 In Unreduced Conditions
TEC were harvested and prepared for extraction in sodium dodecyl sulfate (SDS). Protein from samples (10μg) was used for electrophoresis separation in 4 to 20% SDS-PAGE. Then separated proteins on Gels were electroblotted to nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer blotting apparatus. Membranes were incubated first antibody, and then second horse radish peroxidase-conjugated anti-mouse-IgG. Subsequently the blots were visualized by exposure to a fleshly prepared solution containing ECL reagent.

しかしながら、CD44 分子に関しては主として血球系細胞で発現が確認されている normal type の CD44 だけでなく、10 個のエクソンの alternative splicing によりこれまでに 21 種類以上の異なったアミノ酸配列を有する多数のバリアントタイプが存在することが報告されている [50)-54]。従って、今後は TES-23 が多様な CD44 分子のうちど

の CD44 分子を認識しているかについての詳細な検討を行い、TES-23 認識抗原のさらなる追求を試みる予定である。この TES-23 が認識するあらゆる動物種の癌種で共通な癌組織血管内皮細胞上に発現している抗原の解明は、生理学的に非常に興味深いものであり、単にターゲティング療法への応用としてだけでなく、医学・薬学の分野に新たな知見をもたらすものと考えられる。

第三章　Immunoconjugate TES-23-NCS の作製と *in vivo* 抗腫瘍効果に関する検討

これまでに、癌組織血管内皮細胞に対して特異性の高いモノクローナル抗体 TES-23 はKMT-17担癌ラットに対する著しい癌組織集積性を示すばかりでなく、マウスの様々な腫瘍に対しても著しい癌組織集積性を示すことが明らかとなった。さらに、ヌードマウスにおけるヒト癌細胞株移植モデルに対しても癌組織血管高集積性を示すこと、および様々なヒト癌組織切片における免疫組織化学的な検討より、実際にヒト癌組織血管内皮細胞上にも、TES-23 が認識する共通特異分子が癌種によらず発現していることが明らかとなった。以上の結果より、TES-23 は実際にヒトへの臨床応用を考慮した場合においても、癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法の確立を目指す上での有用なミサイルキャリアーとなるものと強く考えられる。従って、本章では TES-23 を用いた癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法の確立を視野に入れて、タンパク性抗癌剤ネオカルチノスタチン(NCS)との Immunoconjugate(TES-23-NCS)を作製し、TES-23-NCS の Meth-A 線維芽肉腫担癌マウスに対する抗腫瘍効果を検討することで TES-23 のミサイルキャリアーとして有用性についての検討を行った。

第一節　TES-23-Immunoconjugate 作製における最適な抗癌剤の選択

TES-23 はこれまでに、癌組織血管を標的とした有用なミサイルキャリアーとなり得る可能性が明らかとなったが TES-23 を用いての癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法を達成するにおいては TES-23 と Immunoconjugate を作製する際に用いる抗癌剤の選択が非常に重要なものとなってくる。従って、本節では TES-23 の TEC への結合方法を解明することで最適な抗癌剤の決定を試みた。

実験材料と方法

^{125}I-TES-23 の細胞内への取り込みに関する検討

TEC を 1.5×10^5 cells/ well で 12 well plate に播種し、一晩培養した。培地を除去した後、37 ℃ に加温、もしくは氷冷した 10 μg/ ml ^{125}I-TES-23/ 10% FCS 含有 DMEM を 0.5 ml/ well 添加して 1 時間、0 ℃ 、もしくは 37 ℃ で培養した。抗体を除去し、

氷冷 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)で 3 回洗浄した後、氷冷した 0.1 M acetic acid、0.5 M NaCl (pH 2.8)で 5 分間、2 回処理し、細胞膜表面画分として回収した。そして、細胞を 0.1% Triton X- 100、0.1 N NaOH で溶解回収し、それを細胞内画分とし、細胞膜分画および細胞内画分の放射活性を経時的に測定した。

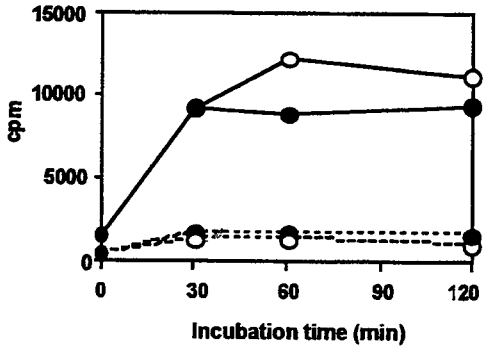

Fig. 13 Internalization of TES-23 in TEC
^{125}I-TES-23 was added TEC cultured plate, radio activity was measured after each time incubation.

—●— 37 °C, Total --●-- 37 °C, Intracellular
—○— 0 °C, Total --○-- 0 °C, Intracellular

結果および考察

抗体を用いたミサイル療法を行う際には、ミサイルキャリアーである抗体が細胞に取り込まれるか否かでその適用方法が異なってくる。^{125}I- TES- 23 を用いて細胞への取り込みについて検討した結果、僅かながらも細胞内に移行することが判明した(Fig.13)。氷温下で incubation した場合に比べ、37 ℃ では細胞内画分の放射活性が僅かではあるが高い傾向にあるものの量的には非常に少ないことが明らかとなった。そのため、Immunoconjugate に用いる抗癌剤として、細胞内に取り込まれなくとも殺細胞効果を示すもの、あるいは数分子でも取り込まれただけで殺作用を示すものを選択する必要性が示唆された。今後は、これらの特性を有するタンパク性抗癌剤である NCS と TES- 23 との Immunoconjugate(TES- 23- NCS)を作製することとした。

第二節　抗体の糖鎖修飾による TES-23-NCS Immunoconjugate の作製

Immunoconjugate を作製する際においての最大の問題点は、抗癌剤が抗体の抗原認識部位に結合してしまうために生じる抗体活性の低下であった。そこで、抗体活性の保持という点に着目し、TES-23 の Fc 部位にのみ存在する糖鎖を抗癌剤修飾部位とすることで、TES-23-NCS Immunoconjugate の作製を行った。

実験材料と方法

Immunoconjugate の作製

Immunoconjugate(TES-23-NCS、MOPC-31C-NCS)は抗体の Fc 部位に存在する糖鎖に NCS を導入する方法により合成した(Fig.14)。

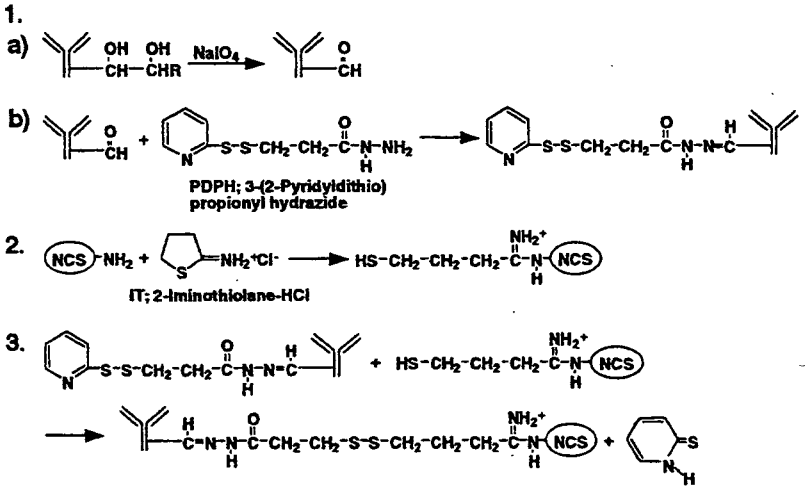

Fig.14. Synthesis of Antibody-Neocarzinostatin Immunoconjugate

8 mg/ml の抗体溶液を、終濃度 1 mM の過ヨウ素酸ナトリウム(和光純薬)と終濃度 3 mM 3-(2-pyridyldithio) propionyl hydrazide(PDPH;PIERCE)を含む pH 5.5 の 0.1 M 酢酸緩衝液中で 15 分間、0 ℃ で抗体の糖鎖を酸化し[55]、アルデヒド基を導入した。その後、脱塩カラム(Econo-Pac 10DG、Bio Rad Laboratory、Richmond、CA)により pH 8.0 の 0.1 M リン酸緩衝液で溶出し、反応物を精製した。次に、抗体に対し 10 倍モル量の PDPH を含む pH 8.0 の 0.1 M リン酸緩衝液を 2 時間毎に計 3 回添加し、25 ℃ で反応させることで、抗体に PDPH を導入した。12 時間後、脱塩カラム

により pH 7.2 の 0.1 M リン酸緩衝液で溶出、精製した。ネオカルチノスタチン(NCS) 0.7 mg(7×10^{-8} mol) は pH 8.0 の 0.1 M リン酸緩衝液中で、10 倍量の 2-iminothiolane(IT ; PIERCE)と 45 分間、25 ℃ 、暗所で反応させることにより、SH 基を導入し、脱塩カラムにより pH 7.2 の 0.1 M リン酸緩衝液で溶出、精製した。最後に、PDPH を導入した抗体溶液と、2.5 倍モル量の SH 基を導入した NCS を混合し、25 ℃ 、暗所で一晩反応後、ゲルろ過 HPLC(カラム ; TSK-gel G3000SWXL、TOSOH、Tokyo、Japan)により pH 7.2 の 0.1 M リン酸緩衝液で分子量 16～18 万の分画を conjugate として分取した。ゲルろ過分子量より抗体 1 分子に NCS が平均 2 分子結合していると算出した。なお、TES-23-NCS conjugate と MOPC-31C-NCS conjugate で、NCS の導入率は同じであった。

結果および考察

TES-23 は、120 分という短時間においてもわずかながら細胞内に取りこまれることが判明したため、Immunoconjugate に用いる薬物としては、細胞内に取り込まれなくとも殺細胞効果を示すもの、あるいは数分子でも取り込まれただけで殺作用を示す NCS を抗癌剤として選択した [56]。これまでの Immunoconjugate 作製方法は、抗体の Lys 残基を SMCC や SPDP といった架橋剤で修飾することで SH 反応基を導入していた [57)-58]。しかしながら、この方法では架橋剤を特定の Lys 残基に選択的に導入することは不可能であり、抗体の抗原認識部位を修飾した場合や抗体の Fab 領域を修飾した場合には確実に抗体活性を低下させてしまう。一方、抗体の Fc 部位に存在する糖鎖のシアル酸を酸化することで Fc 部位選択的に抗体を活性化することができ、全く抗体活性を低下させることなく抗体にタンパク性薬物を導入する方法が開発された(Fig.14)。また、タンパク性薬物への SH 基の導入法として、容易な反応で、かつ反応条件が緩和である IT を用いる方法が知られており、これらの方法を組み合わせることで Immunoconjugate を作製した。実際に、モデル抗体であるマウス IgG と種々の分子量のモデルタンパク質を用いて、本方法により Immunoconjugate を作製した結果、どの Immunoconjugate もモデル抗体であるマウス IgG と同様の抗体活性を有しており、本方法で作製された TES-23-NCS は当初の目的通り、癌組織血管内皮細胞対する高い結合性が残存されていることが示唆される。さらに、今回用いた NCS の基本骨格は、その活性を担う非タンパク性のクロモフォアと非活性部位であるタンパク質の apoprotein からなり [59]、本 Immunoconjugation 作製法において結合に関与する部位

は、apoprotein のアミノ酸配列 20 位に位置する Lys 残基であるため NCS の活性は保持されたままであること、また、NCS は細胞あたり数分子で殺細胞作用を示す程、高い抗腫瘍活性を有しているため、抗体 1 分子に対して数分子導入するだけで充分な活性を示すものと考えられる。従って、この TES-23-NCS を用いた癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法の有用性を、抗腫瘍効果を指標に検討していくこととした。

第三節　Immunoconjugate TES-23-NCS の *in vivo* 抗腫瘍効果

本節では、TES-23-NCS の Meth-A 線維芽肉腫担癌マウスに対する抗腫瘍効果を評価することで、実際に著者のストラテジー通りに TES-23 が癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法おける有用なミサイルキャリアーになり得るか否かを検討した。

実験材料と方法

TES-23-NCS conjugate による *in vivo* 抗腫瘍効果

予め腹水中で維持継代した Meth-A 線維芽肉腫を回収し、BALB/c マウス(メス、5 週齢)の腹部皮内に 5 × 10^5 cells/head で移植した。腫瘍長径が 6 mm 前後に達した移植後 9 日目より 2 日おきに合計 3 回各薬物を静脈内投与した。

投与薬物群は、TES-23-NCS conjugate(TES-23 ; 320 μg/kg、NCS ; 50 μg/kg)、TES-23-NCS conjugate(TES-23 ; 107 μg/kg、NCS ; 17 μg/kg)、TES-23-NCS conjugate(TES-23 ; 107 μg/kg、NCS ; 17 μg/kg)と遊離の TES-23(1070 μg/kg)の混合物、MOPC-31C-NCS conjugate(MOPC-31C ; 320 μg/kg、NCS ; 50 μg/kg)、MOPC-31C-NCS conjugate(MOPC-31C ; 107 μg/kg、NCS ; 17 μg/kg)、TES-23(320 μg/kg)、NCS(500 μg/kg)、NCS(50 μg/kg)、TES-23(320 μg/kg)と NCS(50 μg/kg)の混合物とし、control 群として pH 7.2 の 0.1 M リン酸緩衝液を投与した(n=4)。投与後、経日的に腫瘍径を測定して腫瘍体積を算出した。さらに、延命効果により、TES-23-NCS conjugate の治療効果を評価した。生存日数が 120 日を越えたものは完全治癒とみなした。なお、腫瘍体積は以下に示す方法により算出した。

(腫瘍体積)=1/2 × a × b^2

a；腫瘍の長径

b；腫瘍の短径

体重の測定

被検マウスの体重を経日的に測定し、投与開始日の体重に対する割合(%)で表した。

血球パラメーターの測定

薬物投与前および、投与開始後 9 日目に被検マウスの尾静脈からヘマトクリット管に採血し、ヘマトクリット値を算出した。赤血球、白血球、血小板数は、自動血球測定装置(PLATELET COUNTER PL-110、東亜医用電子)により測定した。

結果および考察

TES-23-NCS conjugate 投与群では、NCS 量にして 50 μg/kg、17 μg/kg のいずれの投与量においても、劇的な抗腫瘍効果が観察された(Fig.15)。

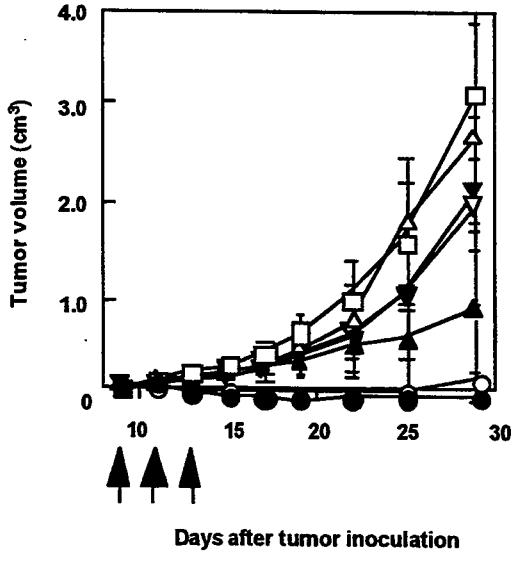

Fig. 15. Antitumor Effects of TES-23-NCS on Meth-A Solid Tumor in BALB/c Mice
Meth-A cells were implanted intradermally in the abdomen of BALB/c mice. TES-23-NCS conjugates (TES-23, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg)(●), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg)(○), NCS (500 μg/kg)(▲), NCS (50 μg/kg)(△), TES-23 (320 μg/kg)(▼), TES-23 (320 μg/kg) plus NCS (50 μg/kg)(▽), or control (phosphate buffer pH7.2)(□) was given intravenously on days 9, 11, and 13 after tumor inoculation. Treatments are indicated by the arrows. Each data point represents the mean tumor volumes of 4 animals; *bars*, SE.

しかしながら、NCS 50 μg/kg の単独投与では、全く抗腫瘍効果が認められなかった。さらに、10 倍量の 500 μg/kg の投与によっても、移植後 29 日目において、70% の増殖抑制効果が観察されたにすぎず、腫瘍退縮は得られなかった。なお、TES-23 単独投与、および単に TES-23 と NCS を混合した群では全く効果が認められなかった。また、TES-23-NCS conjugate(抗体量にして 107 μg/kg)と 10 倍量の

TES-23(1070 μg/kg)を同時に投与すると、TES-23-NCS conjugate の抗腫瘍効果は拮抗的に阻害された(Fig.16)。

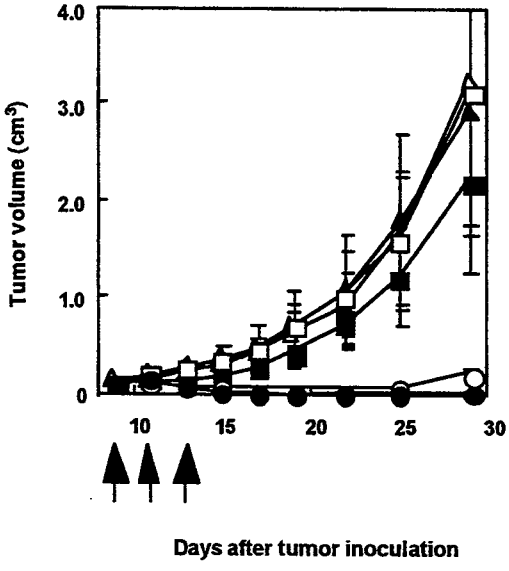

Fig. 16. Antitumor Effects of TES-23-NCS on Meth-A Solid Tumor in BALB/c Mice
Meth-A cells were implanted intradermally in the abdomen of BALB/c mice. TES-23-NCS conjugates (TES-23, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg)(●), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg)(○), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg) plus TES-23 (1070 μg/kg)(■), MOPC-NCS conjugates (MOPC-31C, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg)(▲), MOPC-NCS conjugates (MOPC-31C, 107 μg/kg;NCS, 17 μg/kg)(△), or control (phosphate buffer pH7.2)(□) was given intravenously on days 9, 11, and 13 after tumor inoculation. Treatments are indicated by the arrows. Each data point represents the mean tumor volumes of 4 animals; *bars*, SE.

さらに、negative control 抗体 MOPC-31C と NCS との Immunoconjugate である MOPC-31C-NCS conjugate 投与群では全く有効性を示さなかった。従って、TES-23-NCS conjugate による抗腫瘍効果増強は、単に、抗体と結合したことによる NCS の血中滞留性の向上に起因するのではなく、NCS にターゲティング能が付与され、TES-23-NCS conjugate が癌組織血管に集積し、これを障害することによって生じたものと考えられた。延命効果について検討した結果、平均延命日数は TES-23-NCS conjugate 投与群においてのみ control 群と比べて有意に延長されていた(Table 1)。さらに、TES-23-NCS conjugate 投与群では、NCS 量にして、50 μg/kg 投与した群で 4 例中 3 例、その 3 分の 1 量のわずか 17 μg/kg 投与群で 4 例中 2 例が完全治癒した。一方、腫瘍増殖抑制効果の観察された NCS 500 μg/kg の単独投与群では、4 例中 1 例は副作用と考えられる突然死が確認され、残り 3 例中 1 例は完全治癒したものの、それ以外の 2 例は立毛やふるえ等の重篤な副作用が観察された。また、NCS 500 μg/kg 投与群では、投与開始から全例において重篤な体重減少が認められた。一方、劇的な抗腫瘍効果を示した TES-23-NCS conjugate 投与群では、一般に重篤と定義されている 10% 以上の体重減少は認められず、安全性に優れていることが明らかとなった(Fig.17)。NCS は副作用として、血小板減少症をはじめとする血球減少を生じることが知られている。そこで、TES-23-NCS conjugate 投与によ

る血球系への影響を検討した。血小板数に関しては、NCS 500 μg/kg の投与において投与開始前の血小板数よりも約 40% に激減していたが、TES-23-NCS conjugate 投与群においては、完全治癒の得られた投与量においても血小板減少は全く認められずむしろ上昇傾向にあった。これは、癌組織血管の出血壊死に伴う血栓形成時に、血小板が癌組織部位へ集積したことによる血小板数の減少後のリバウンド現象であると推測される。赤血球、白血球に関しては、どの群においても有意な差は認められなかった(Fig.18)。以上のことから、TES-23-NCS conjugate は劇的な抗腫瘍効果を示すうえ、NCS による副作用もほとんど示さないことが明らかとなった。

Table 1. Antitumor Effects of TES-23-NCS in Terms of Survival Days after Meth-A Tumor Inoculation

	Injection dose (μg/kg) [a]		Survival time [b] (days)		Complete [c] regression
	Ab	NCS			
control	-	-	53 ± 6	(39, 48, 59, 65)	0/4
TES-23-NCS	320	50	103 ± 19 [d]	(53, 120<, 120<, 120<)	3/4
	107	17	95 ± 17 [d]	(67, 72, 120<, 120<)	2/4
TES-23-NCS + TES-23 (1070 μg/kg)	107	17	46 ± 5	(34, 46, 50, 55)	0/4
MOPC-NCS	320	50	50 ± 3	(45, 49, 50, 57)	0/4
	107	17	45 ± 3	(38, 46, 47, 48)	0/4
NCS	-	500	63 ± 25	(15, 48, 68, 120<)	1/4
	-	50	49 ± 6	(31, 45, 51, 52)	0/4
TES-23	320	-	45 ± 4	(39, 39, 46, 53)	0/4
TES-23+NCS	320	50	51 ± 3	(46, 49, 50, 57)	0/4

[a] Groups of four mice received each treatment intravenously at days 9, 11, and 13.
[b] Days after tumor inoculation (mean ± SE).
[c] Complete regression was defined as no tumor regrowth for more than 120 days.
[d] Significant difference from control group ($p < 0.05$).

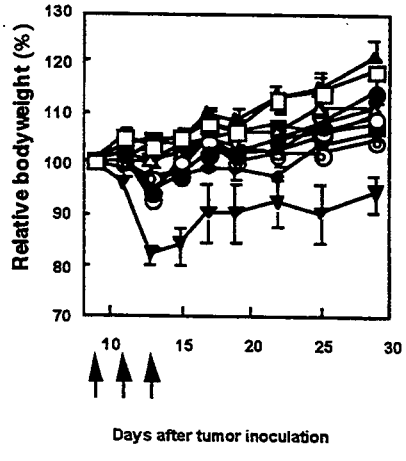

Fig. 17 Change of Body Weight of BALB/c Mice Bearing Meth-A Solid Tumors Treated with TES-23-NCS
Meth-A cells were implanted intradermally in the abdomen of BALB/c mice. TES-23-NCS conjugates (TES-23, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg)(●), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg)(○), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg) plus TES-23 (1070 μg/kg)(◎), MOPC-NCS conjugates (MOPC-31C, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg)(▲), MOPC-NCS conjugates (MOPC-31C, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg)(△), NCS (500 μg/kg)(▼), NCS (50 μg/kg)(▽), TES-23 (320 μg/kg)(◆), TES-23 (320 μg/kg) plus NCS (50 μg/kg)(◇), or control (phosphate buffer pH7.2)(□) was given intravenously on days 9, 11, and 13 after tumor inoculation. Treatments are indicated by the arrows. Intact mice (■) were bearing no tumors. Each data point represents the mean relative body weight of 4 animals by using the equation; (relative body weight) = (mean body weight at a given time) / (mean body weight on day 9) ; *bars*, SE.

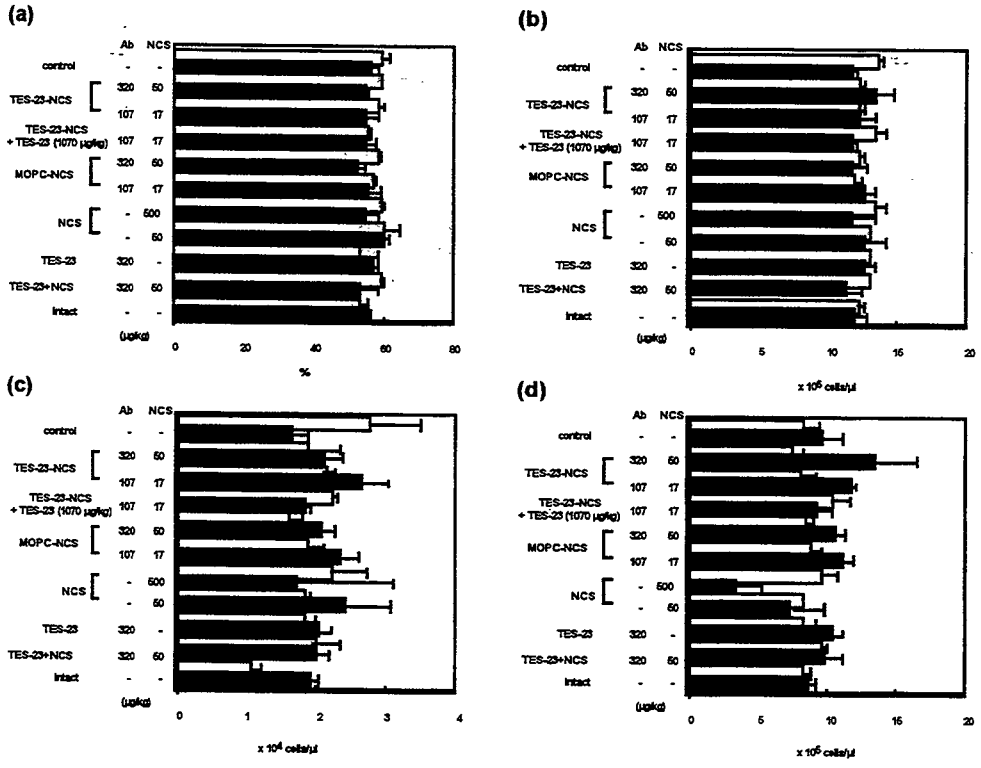

Fig. 18. Peripheral Hematocyte Level on Day 9 and 18 after Intravenous Injection of TES-23-NCS
Meth-A cells were implanted intradermally in the abdomen of BALB/c mice. TES-23-NCS conjugates (TES-23, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg), TES-23-NCS conjugates (TES-23, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg) plus TES-23 (1070 μg/kg), MOPC-NCS conjugates (MOPC-31C, 320 μg/kg; NCS, 50 μg/kg), MOPC-NCS conjugates (MOPC-31C, 107 μg/kg; NCS, 17 μg/kg), NCS (500 μg/kg), NCS (50 μg/kg), TES-23 (320 μg/kg), TES-23 (320 μg/kg) plus NCS (50 μg/kg), or control (phosphate buffer pH7.2) was given intravenously on days 9, 11, and 13 after tumor inoculation. Intact mice were bearing no tumors. Blood samples of mice were collected from the tail vein on day 9 (□) and 18 (■) and hematocrits (a), erythrocytes (b), leukocytes (c), and platelets (d) were measured by auto blood cell counter. Each data point represents the mean cells of 4 animals; *bars*, SD.

第四節　小括

Immunoconjugate TES-23-NCS の Meth-A 線維芽肉腫担癌マウスに対する抗腫瘍効果を検討したところ、TES-23-NCS conjugate は顕著な抗腫瘍効果を示し副作用の発現しない投与量において、4 例中 3 例が完全治癒した。その治療効果は、NCS に TES-23 を結合させたことで、NCS が特異的に癌組織血管に集積し、これを障害することによって生じたものであると考えられる。Immunoconjugate による抗腫瘍効果について検討を行っている多くの研究者達は、その薬物として抗癌剤 [60)-61)]をはじめ、トキシン、放射性同位元素など様々なものを用いており、中でも Burrows と Thorpe らの植物毒であるリシンのA鎖を用いた Immunoconjugate による癌治療研究 [62)]には、

目を見張るものがある。しかし、トキシンは現在のところ抗原性や毒性のため臨床上用いられておらず、近い将来の臨床応用を想定して臨床の場において広く利用されている抗癌剤の方が将来性が高いと思われる。NCS の基本骨格は、活性中心である非タンパク性のクロモフォアと非活性部位である apoprotein からなっている。著者らの作製した Immunoconjugate は、この apoprotein にのみ存在する Lys 残基と、抗体の Fc 部位にのみ存在する糖鎖を介して結合しているため、抗体活性の低下を回避でき、さらに、NCS の活性もそのまま保持している。また、TES-23 は TEC に結合後、細胞内に取りこまれることから、癌組織血管内皮細胞に結合した TES-23-NCS conjugate は、細胞内に取り込まれて細胞を障害したこと、また、取り込まれなくても、膜障害を引き起こし得ることから、取り込まれない分子も有効に作用したことが示唆される。さて、NCS を用いた Immunoconjugate としては、ヒト結腸癌細胞膜上に発現している glycoprotein を認識するモノクローナル抗体 A7 との Immunoconjugate A7-NCS を用いた臨床データが、これまでに数多く報告されており詳細な検討がなされている [63)-68)]。A7-NCS が有効性を示す投与ルートは癌組織への局所投与であり、局所投与の場合、全身に転移してしまった癌や切除困難な癌、初期段階の小さな癌に対しては投与が困難であり、応用の幅が限局されてしまう。しかし、癌組織血管内皮細胞を標的とした場合、血中に投与された Immunoconjugate は血流に乗って全身に拡がり、そのような癌に対しても確実に薬物を送達できるものと考えられる。従って、NCS に TES-23 を結合させることにより癌組織血管へのターゲティング能が付与され、癌組織血管を障害することで腫瘍の退縮を招いたものと考えられることより、癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体 TES-23 をミサイルキャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の有用性が示された。

第二部

細胞を用いた癌組織血管を標的とした
新規癌ミサイル療法の開発に向けた基礎的検討

緒論

第一部では、分子レベルでの癌組織血管ミサイル療法に関する研究について述べた。癌組織血管内皮細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体、TES-23 は有用な癌組織血管を標的とできる薬物キャリアーとなることが明らかとなり、この TES-23 を薬物キャリアーとして用いた癌組織血管ミサイル療法の有用性を示すことができた。

第二部においては、抗体分子ではなく、特定組織を標的として認識する細胞自身を Targeting 素子として利用した、粒子レベルでの癌組織血管ミサイル療法に関する研究を行った。この細胞に対して、予め遺伝子導入などを行い新たな機能を付与しておけば、疾病治療を目的とした粒子（細胞）レベルの薬物キャリアーとなり得ると考えられる。現在、著者の研究室では、腫瘍、脳などの標的組織特異的に Homing する様々な細胞の検索・同定および、作製を行うことで、特定組織選択的移行能を有する細胞自身を薬物キャリアーとして適用した（我々は、これを Cytocarrier と呼んでいる。）Drug Delivery System の開発を進めている(Fig.19)。

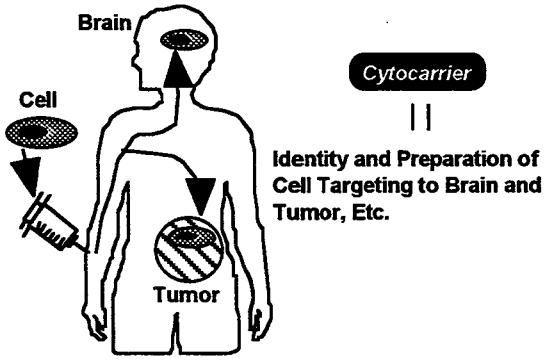

Fig. 19. Schematic Strategy of *Cytocarrier*

Cytocarrier の標的組織の一つであると著者が考えている腫瘍は、各腫瘍が様々な性質を有する一方で、共通の性質としては急激な血管新生を伴うことで成長するという病態であることが挙げられる [69)-72)]。この急激な癌組織血管新生は、新生部位周辺の既存血管の血管内皮細胞が癌組織から分泌される VEGF[73)-75)]などの血管内皮細胞特異的

増殖因子の影響で活性化されることで、血管基底膜と細胞外マトリックスを消化して血管外に遊走し、分裂・増殖を行うことで構築されることが、Folkman らによって報告されている(Fig.20)[76)-77)]。

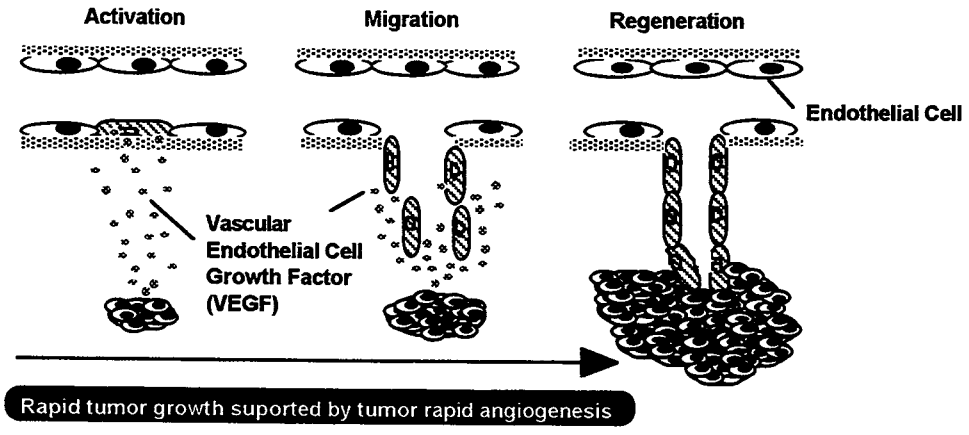

Fig. 20. Schematic Mechanism of Tumor Growth and Tumor Angiogenesis

この事実は、癌組織では癌細胞が分泌する VEGF などの血管内皮細胞特異的増殖因子の影響で、血管内皮細胞の生存・増殖が可能な環境であることを示唆するものであると考えられる。従って、第一部で明らかとしてきた癌治療法の開発おける癌組織血管を標的することの重要性と Folkman らの知見をもとに、著者は以下に示す 2 つの仮説を骨格として、薬物キャリアーとして適用した血管内皮細胞自身を癌組織血管に選択的に送りこむ、言い換えるならば、血管内皮細胞を薬物キャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法とでも呼ぶべき、全く新たなストラテジーに立脚した癌治療法を考案した(Fig.21)。

（1） 血管内皮細胞を投与することで癌組織血管新生部位に遊走させ、接着・生着させることが可能となれば、VEGF などの影響により、投与された血管内皮細胞は癌組織内で生存する可能性が考えられる。

（2） 癌組織内で生存が可能となった血管内皮細胞は、既存血管から癌組織血管新生部位に遊走を行ってきた血管内皮細胞と誤って認識されることで、癌組織の新生血管に組み込まれ、生存・増殖する可能性が考えられる。

この２つの仮説のもと、血管内皮細胞を薬物キャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法を確立するためには、まず第 1 段階として、投与する血管内皮細胞に標的組織である癌組織血管に遊走し、癌組織血管内皮細胞に接着する能力、つまり、癌組織血管指向性を付与する必要があると考えられる。従って、第一章では、癌組織血管指向性を有する血管内皮細胞を開発するための基礎的検討を行った。第二章では、投与された血管内皮細胞が癌組織内で生存することが可能なのか、また、癌組織血管に組み込まれるのかを明らかとするために、マウス腫瘍を移植した SCID mouse の癌組織内にヒト血管内皮細胞を局所投与した。その際に、投与されたヒト血管内皮細胞が癌組織の新生血管に組み込まれたために、マウス癌組織内で投与されたヒト血管内皮細胞とマウスの既存血管由来のマウス血管内皮細胞が混在して形成されている、キメラ型とでも呼ぶべき癌組織血管が構築されているという驚くべき事実を発見することができた。

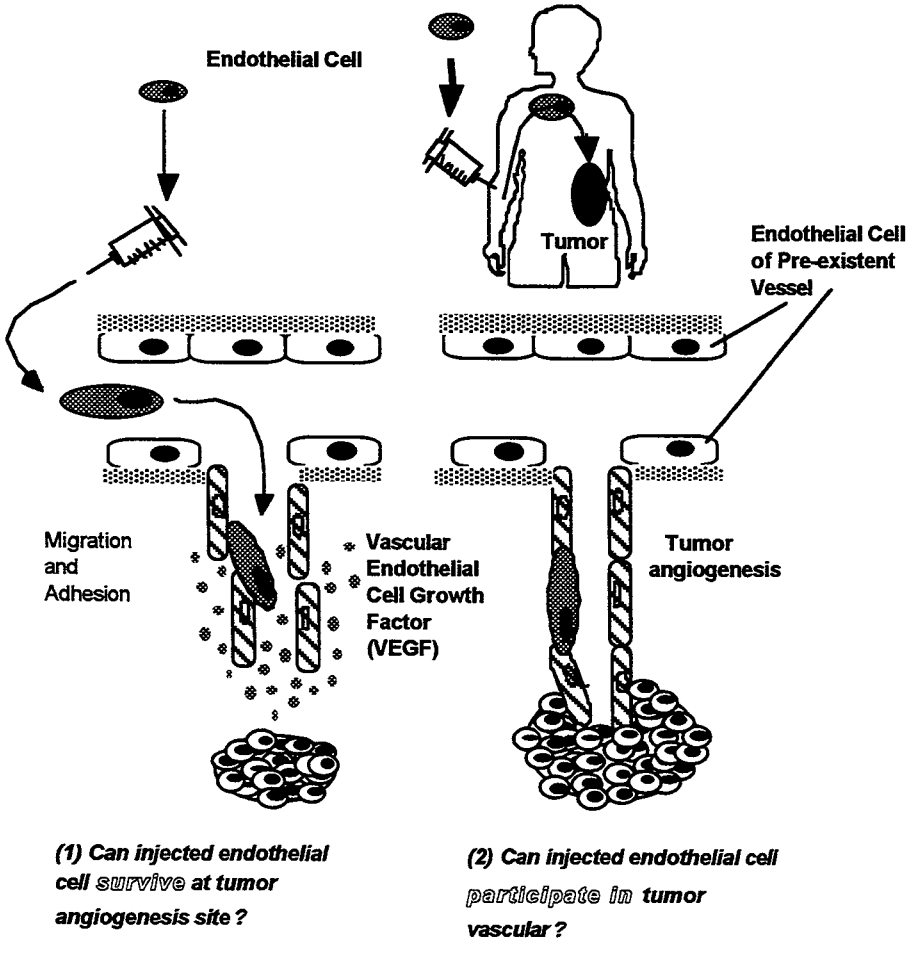

Fig. 21. Schematic Strategy of Tumor Vascular Targeting Using Endothelial Cell

本論

第一章　Fractalkine レセプター(CX3CR1)を利用した癌組織血管に対する指向性を有する血管内皮細胞作製のための基礎的検討

癌組織血管の活性化血管内皮細胞に対する白血球の接着や遊走、つまり、白血球の癌組織血管に対する指向性は、セレクチンを介する rolling、ケモカインによる遊走、インテグリンを介した接着からなる、連続的に進行する３つのステップ(Multi Step Model)により成立していることが明らかとなっている [78)-80)]。最近、炎症性サイトカインの刺激により活性化された血管内皮細胞上に発現しており、細胞遊走作用と細胞接着分子の両方の性質を有する新規膜結合型ケモカイン分子、Fractalkine とそのレセプター、CX3CR1 が相次いで同定・報告された [81)-85)]。この Fractalkine は上記の３つのステップを借りることなく単独で、CX3CR1 発現細胞を活性化血管内皮細胞上に捕獲後、他の接着分子であるインテグリンなどと比べて、非常に強固な細胞接着を誘導することが報告されている(Fig.22)。

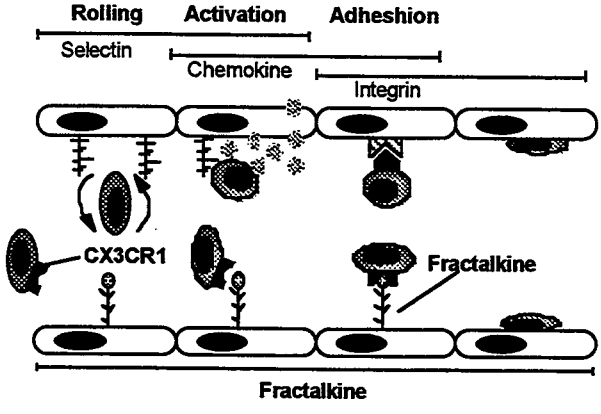

Fig. 22. Schematic Model of Leukocyte Migration
(MultiStep Model and Fractalkine Model)

従って、本章では、癌組織血管に対する指向性を有する血管内皮細胞を作製するための基礎検討として、CX3CR1 発現細胞が癌組織血管内皮細胞に接着し、結果的に癌組織血管に対する指向性を有しているか否かを検討した。

第一節　CX3CR1 発現細胞の活性化血管内皮細胞に対する接着性亢進の確認

癌細胞は宿主の単核球より TNF-αなどの炎症性サイトカインを放出させ、癌組織血管新生部位の血管内皮細胞を活性化することが知られている[86)-87)]。従って、CX3CR1 発現細胞は、実際に、炎症性サイトカインで活性化された血管内皮細胞に対する接着性が亢進しているか検討した。

実験材料と方法

ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)の培養

ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)、および細胞培養液はクラボウ社(Osaka、Japan)より提供して頂いたものを使用した。HAEC は３継代のものを使用した。サブコンフルエントの HAEC を 0.025% trypsin- 0.01% EDTA で処理し、96 well 培養プレートに 5×10^3 cells で播種し、コンフルエントに達した際に実験に用いた。

CX3CR1 発現細胞の蛍光ラベル化

CX3CR1 発現細胞である K562/ CX3CR1 および control に用いた K562 は、カン研究所(京都)・今井俊夫先生、近畿大学医学部・義江修先生、中山隆志先生より御供与頂いた。K562/ CX3CR1 は、10%FCS/ kanamycin（60 μg/ ml）/ gentamycin（800 μg/ ml）/ RPMI1640 を用いて、K562 は、10%FCS/ kanamycin（60 μg/ ml）/ RPMI1640 を用いて培養を行った。K562/ CX3CR1 および K562 は、蛍光色素 BCECF- AM により蛍光ラベルした。すなわち、培養中の K562/ CX3CR1 および K562 に BCECF- AM(50 μg/ 25 ml 培養液)となる様に、BCECF- AM (50μg/ 50 μl DMSO)を添加し 1 時間培養した。その後、HBSS で 2 回洗浄したもの実験に用いた。

細胞接着測定

96 well のプレートでコンフルエントに達した HAEC に、TNF-αを 0～50 ng/ ml の濃度で 10 時間作用させ、その後、蛍光ラベル化した K562/ CX3CR1 および K562 を 2×10^4 cells/ well で播種し、常温で 20 分間、120 rpm の遠心条件下で HAEC に細胞を接着させた。次に、プレートに蓋を施し、プレートを反転させ、常温で 5 分間、520 rpm の遠心を行い、HBSS で 2 回洗浄を行うことで、非特異的に吸着している細胞を除去した。その後、Triton X- 100 で細胞を溶解させたのち、蛍光光度計により蛍

光強度(励起波長　508 nm、蛍光波長　531 nm)を測定することで細胞数を算出した。

結果および考察

今回検討した TNF-αの濃度において、CX3CR1 発現細胞は、control の細胞に比べて、活性化 HAEC に対する接着性が 3 倍以上も亢進していることが明らかとなった(Fig.23)。先に述べた様に、癌細胞は宿主の単核球より TNF-αなどの炎症性サイトカインを放出させ、癌組織血管新生部位の血管内皮細胞を活性化することが *in vitro*、*in vivo* 両方の検討から既に明らかとなっている。従って、CX3CR1 発現細胞は、癌組織血管新生部位の血管内皮細胞に発現されていると考えられる、Fractalkine を介することで、癌組織血管新生部位の血管内皮細胞に接着する可能性が示唆された。

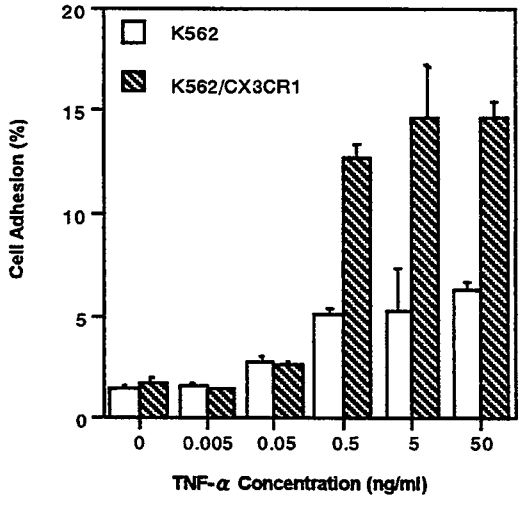

Fig. 23. K562/CX3CR1 Cell Adhesin to Human Aorta Endothelial Cell (HAEC) in Various TNF-α Concentration

HAEC were plated at 2×10^4 cells / well on uncoated 96-well plates and cultured. DiI labeled K562/Cx3CR1 and K562 were plated 1×10^5 on confluent HAEC. Number of cells were calculated from fluorescent intensity.

第二節　*in vivo* における CX3CR1 発現細胞の癌組織に対する指向性の評価

第一節で CX3CR1 発現細胞は、癌組織血管新生部位の血管内皮細胞に接着する可能性が示唆された。従って、投与された CX3CR1 発現細胞は癌組織血管新生部位の血管

内皮細胞に接着し、その結果、癌組織指向性を有するか否かを検討した。

実験材料と方法

担癌 SCID mouse の作製

マウス由来卵巣癌 OV- HM は大阪大学医学部·藤原大美先生より御供与頂いた。SCID mouse(メス、4 週齢)の腹部皮内に、OV- HM を 1×10^6 cells/ head で移植した。

CX3CR1 発現細胞の蛍光ラベル化

K562/ CX3CR1 および K562 を、蛍光色素 DiI により蛍光ラベルした。すなわち、培養中の K562/ CX3CR1 および K562 に DiI(500μg/ 25 ml 培養液)で、1 時間培養した。その後、HBSS で 2 回洗浄したものを実験に用いた。

CX3CR1 発現細胞の癌組織集積性の確認

OV- HM 移植後、7 日目(腫瘍の長径：8 mm)になったマウスに、蛍光染色を行った K562/ CX3CR1 および K562、それぞれ 1×10^7 cells を尾静脈から投与後、経日的に癌組織を摘出して、第一部第一章第一節に準じて凍結切片を作製し、癌組織中の CX3CR1 発現細胞を蛍光顕微鏡で確認した。

結果および考察

CX3CR1 発現細胞は投与後 1 日目で癌組織中に観察され、投与後 7 日目でも確認できたのに対して、control 細胞は癌組織中に観察されなかった(Fig.24)。静脈内に投与された CX3CR1 発現細胞が癌組織血管内皮細胞に接着するためには、激しい血流の shear stress に抵抗できるほどの接着力が必要である。先にも、述べたが Fractalkine は単独で CX3CR1 発現細胞を活性化血管内皮細胞上に捕獲するだけでなく、非常に強固な細胞接着を誘導することが報告されている。通常、生体内での血流の shear stress は約 1～3 dynes/ cm^2 であるが、実際に Imai らは、*in vitro* の血流 shear stress モデルにおいて 20 dynes/ cm^2 もの shear stress 下においても、K562/ CX3CR1 は活性化血管内皮細胞上に接着することを明らかにしている [88]。従って、本検討で CX3CR1 発現細胞のみが癌組織中に分散して観察されたのは、静脈内に投与された CX3CR1 発現細胞が血流の shear stress に抵抗しながら、癌組織血管内皮細胞に Fractalkine を

介することで接着し血管外に遊走した結果であると考えられる。

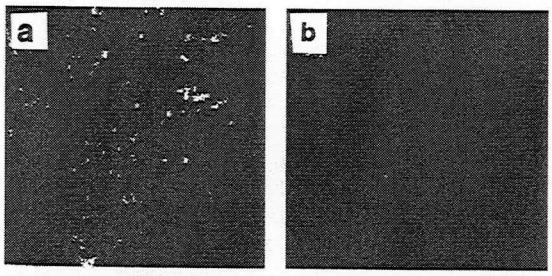

Fig. 24. Fluoromicroscopic Examination of OV-HM Tumor Mass Receiving DiI Labeled K562/CX3CR1 Cells
OV-HM cells were implanted subcutaneously in abdomen of SCID mouse. DiI labeled K562/CX3CR1 cells was given intravenously on days 7 after tumor inoculation. Frozen section of OV-HM tumors removed from mice 14 days after tumor inoculation. a, K562/CX3CR1.; b, K562

第三節　小括

本章において、血管内皮細胞を薬物キャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法を確立するために、投与する血管内皮細胞に癌組織血管指向性を付与するための基礎的検討を行った。その結果、新規膜結合型ケモカイン分子である Fractalkine のレセプター、CX3CR1 を発現させた細胞が癌組織血管指向性を有し、癌組織内に浸潤していくことが確認できた。従って、CX3CR1 を発現させた血管内皮細胞は、癌組織血管に対する指向性を有しているものと期待される。また、現在までに、癌組織血管内皮細胞に Fractalkine が発現している事実は全く報告されていない。しかしながら、本研究において、CX3CR1 発現細胞のみが癌組織内に確認できた結果は、間接的に癌組織血管内皮細胞に Fractalkine が発現していることを示唆しているものであり、今後、免疫組織化学染色を用いて、癌組織血管内皮細胞での Fractalkine の発現を確認することで新たな知見が得られるものと考えられる。実際に、Fujiwara らは、IL-12 刺激により、CD8+ T cell が OV-HM 癌組織局所へ浸潤する潜在能力が亢進するメカニズム [89)-90)] として、IL-12 刺激によりケモカインの受容体である CCR5 や CXCR3 の機能が増強された結果であること示唆している。本研究の結果と生体で

はCD8+ T cellにCX3CR1が発現している事実を考え併せると、IL-12によるCD8+ T cellが癌組織局所へ浸潤する潜在能力が亢進するメカニズムとして、CCR5やCXCR3以外にも、CX3CR1の機能が増強され癌組織血管内皮細胞に接着し、血管外に浸潤した結果である可能性が示唆される。従って、今後は、本章の結果をもとに、FractalkineとCX3CR1を介したT cellの癌組織血管内皮細胞への接着、癌組織内への浸潤のメカニズムを詳細に解明していくことで、免疫学的な癌治療において新たな突破口が開けるものと思われる。

第二章　ヒト大動脈血管内皮細胞がマウス癌組織血管に組み込まれる証拠

第一節　ヒト大動脈血管内皮細胞がマウス癌組織血管に組み込まれる証拠

前章において、新規膜結合型ケモカイン分子であるFractalkineのレセプター、CX3CR1を発現させた血管内皮細胞が、癌組織血管に対する指向性を有しているものと考えられた。しかしながら、投与した血管内皮細胞を癌組織血管内皮細胞上に接着させることで、仮に、薬物キャリアー(Cytocarrier)として用いる血管内皮細胞を癌組織に送達したとしても、投与された血管内皮細胞が癌組織内で生存しなくては、著者が考案した血管内皮細胞を薬物キャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法は全く成立しない。従って、本章では、投与された血管内皮細胞が癌組織内で生存することが可能なのか、また、投与された血管内皮細胞が癌組織血管に組み込まれるか否かを検討した。

実験材料と方法

担癌SCID mouseの作製

予め腹水中で維持継代したMeth-A線維芽肉腫を回収し、SCID mouse(メス、4週齢)の腹部皮内に1 × 10^6 cells/ headで移植した.

ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)のマウス癌組織内への局所投与

HAECは3継代のものを使用した。0.025% trypsin-0.01% EDTAで処理したサブコンフルエントのHAECを、Meth-A線維芽肉腫移植後、1、3、5、7、9日後に、上記

の担癌マウスの癌組織内へ 1 × 10^6 cells/200 μl PBS(Phosphate Buffered Saline)/head で合計5回の局所投与を行った。

組織標本の作製

HAEC の最終投与日から 6 日後に、Meth-A 線維芽肉腫の固形癌組織を摘出した。摘出した癌組織を、中性緩衝ホルマリン溶液中に(常温、6時間)浸透させ、固定をした。その後、直ちに常法に従い、パラフィン包埋を行い、癌組織パラフィンブロックを5 μm に薄切することで組織標本を作製した。

免疫組織化学染色[91)]

(1) マウス癌組織内のヒト CD34 陽性血管の検出(Immunocomplex method)

抗ヒト CD34 ・マウスモノクローナル抗体(QBEnd 10、 DAKO JAPAN)とパーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体(ENVISION+、DAKO JAPAN)を等量ずつ混合し、撹拌(常温、1時間)した。撹拌終了後、上記抗体の1/10 量の正常マウス血清(DAKO JAPAN)を混合液中に添加し、再び、撹拌(常温、30分)することで、Immunocomplex を作製した。次に、脱パラフィンを行った後、マイクロウェーブ法で抗原賦活化処理を行った組織標本を、3 %過酸化水素水(常温、5 分間)で内因性パーオキシダーゼのブロッキングを行い、上記で作製した Immunocomplex を(常温、30 分)反応させ、その後、発色基質溶液(DAB、DAKO JAPAN)を用いて、発色させ(至適時間)た。続いて、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行うことで、マウス癌組織内のヒト CD34 陽性血管の検出を行った。

(2) マウス癌組織内のヒト DNA 陽性細胞の検出(*In situ* hybridization)

脱パラフィンを行った上記の組織標本をオートクレーブ水に浸し(1分間、3回)、0.8 % Pepsin (SigmaP-7000)で室温、20分間処理を行った後、オートクレーブ水で洗浄(1分間、5回)した。次に、95%エタノール、その後、100%エタノールによって組織標本を乾燥させ、ヒトgenome DNAとのみ特異的に反応するビオチン標識の2本鎖DNAプローブ(DAKO JAPAN)を滴下し、カバーグラスをかけ90 ℃ で5分間、ヒーティングブロック上で変性させた。その後、50 ℃ で2時間、*In situ* hybridizationを行った。*In situ* hybridization 終了後、カバーグラスを外し、50 ℃ に温めたStringent Wash Solution(DAKO JAPAN)で20分間洗浄し、TBS(Tween buffer solution)に浸した(3分間、3回)。浸透後、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン溶液(DAKO JAPAN)

を滴下し、室温で30分間反応させ、再び、TBSで洗浄(3分間、3回)、発色基質反応溶液(BCIP/ NBT、 DAKO JAPAN)を滴下し、室温、暗所で30分間反応させた。

結果および考察

マウス癌組織中でヒト血管内皮細胞由来の癌組織血管が構築されているならば、マウス癌組織中のヒト血管内皮細胞由来の癌組織血管にはマウスの血流が循環していることが予想されるため、癌組織血管内皮細胞上にはマウス血清由来のマウスイムノグロブリンが吸着しているものと考えられる。従って、1 次抗体にマウスイムノグロブリンであるヒト CD34 マウスモノクローナル抗体、2 次抗体にマウスイムノグロブリンに対する抗体を用いる、常法の免疫組織化学染色を行うと、2 次抗体が、癌組織血管内皮細胞上に吸着しているマウスイムノグロブリンと反応するために、マウス癌組織内のヒト CD34 陽性血管のみの検出が不可能であると考えられる。従って、著者は、予め 1 次抗体と 2 次抗体を結合させ、その免疫複合体を免疫組織化学染色に用いる、Immunocomplex method を開発することでこれらの問題点の解決を試みた(Fig.25)。また、その際に、染色像を明らかにするために 2 次抗体としてパーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体を使用し、また、抗原の賦活化処理をマイクロウェーブ法にて行った。

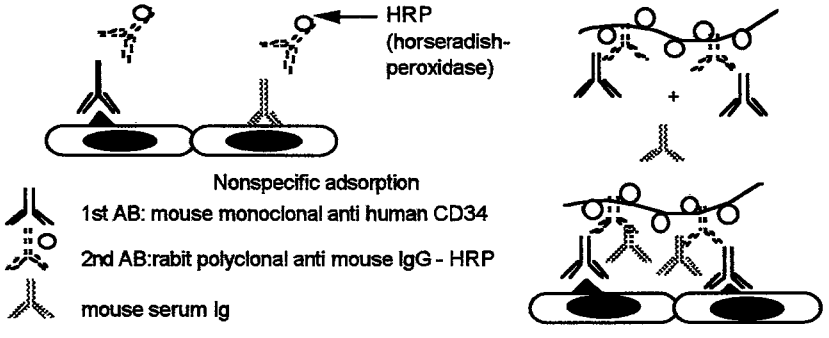

Fig. 25. Immunohistochemistry (Polymer-Immuno Complex Methods)

これらの、免疫組織化学的手法を組み合わせた結果、HAEC を投与していない control の癌組織の癌組織血管は、実際に anti Human CD34 抗体で染色されないことが確認できた。これに対して、HAEC を投与した癌組織を同様に anti Human CD34 抗体で染色したところ、上記のマウス血管内皮細胞から形成される癌組織血管の他に、Human

CD34 陽性を示す血管、すなわち、投与されたヒト血管内皮細胞によって形成された癌組織血管が確認できた(Fig.26)。

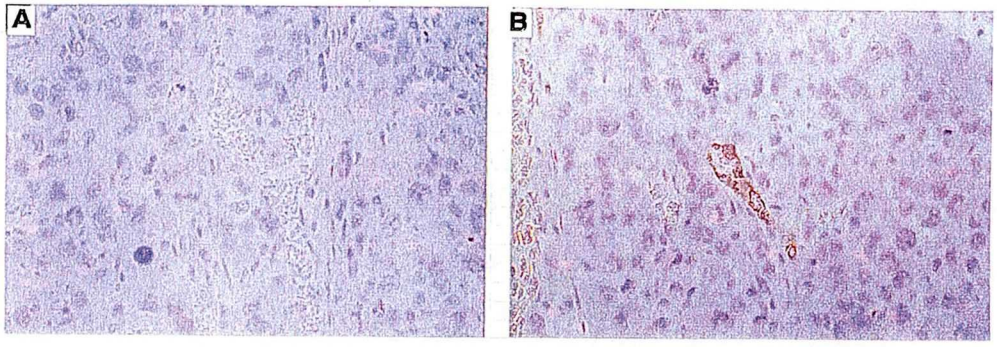

Fig. 26. Immunohistochemical Reactions of Human CD34 to Meth-A Tumor Mass Injecting Human Aorta Endothelial Cells (HAEC)
Excised mouse solid Meth-A fibrosarcoma were fixed with 10 % Folmalin Neutral Buffer Solution for 6 hr at room temperature. Fixed solid tumor mass was embedded Paraffin and Paraffin block sample cuts serial 5 um-thick section. This section was counterstained with Human CD34 and HE using polymer immunocomplex method. A,control; B,HAEC Injection. A and B, ×200.

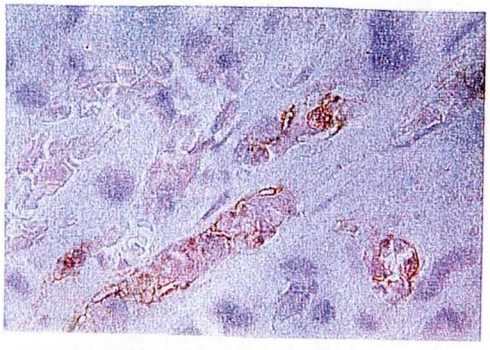

Fig. 27. Immunohistochemical Reactions of Human CD34 to Meth-A Tumor Mass Injecting Human Aorta Endothelial Cells (HAEC)
Excised mouse solid Meth-A fibrosarcoma were fixed with 10 % Folmalin Neutral Buffer Solution for 6 hr at room temperature. Fixed solid tumor mass was embedded Paraffin and Paraffin block sample cuts serial 5 um-thick section. This section was counterstained with Human CD34 and HE using polymer immunocomplex method. ×400.

また、この癌組織血管の近傍には、血管を形成せずに単独で生存しているヒト血管内皮細胞も確認することができた。次に、このヒト血管内皮細胞によって形成された血管像を強拡大して観察したところ、血管内部にマウス赤血球が確認できた。従って、このヒト血管内皮細胞によって形成されたは血管は、マウス癌組織中で癌組織血管としての機能的な役割を果たしていることが明らかとなった。血管内にマウス赤血球が確認できた事実から、マウス癌組織内で投与されたヒト血管内皮細胞とマウス血管内皮細胞が混在して形成されている癌組織血管が形成されていることが予想される。

実際に著者は、投与されたヒト血管内皮細胞が形成した血管とマウス血管が接続し、

相互にマウス赤血球が循環を行っている、キメラ型とでも呼ぶべき癌組織血管が構築されている事実を確認することができた(Fig.27)。

また、これとは別に、ヒト血管内皮細胞が形成した血管とマウス血管が隣接している癌組織血管も確認できた(Fig.28)。

さらに、Human CD34 陽性を示す血管内腔に存在する血管内皮細胞の核だけに、*in situ* hybridization により Human DNA の反応が確認できたことから、間違いなく、投与された血管内皮細胞は癌組織内で生存し、かつ、癌組織の血管新生部位に組み込まれることが明らかとなった(Fig.29)。

従って、投与された血管内皮細胞は癌組織内で生存し、かつ、癌組織の新生血管に組み込まれるという事実をもとに、これまでの検討から、癌組織血管新生部位に遊走し、接着・生着することが期待される CX3CR1 発現血管内皮細胞を静脈内投与することで、投与した血管内皮細胞が癌組織血管に組み込まれるか否かを検討することが急務であると考えられる。

第二節　小括

本章において、著者が示すことができた事実は、新たな疾病治療方法の開発や、血管新生のメカニズムなどの生物学的な興味の解明に多くのヒントを与えてくれる知見であると思われる(Fig.30)。実際にこの知見から、遺伝子導入血管内皮細胞自身を癌組織血管への遺伝子導入 Vector として利用するという、全く新しい癌遺伝子治療法の概念を提示できるものと考えられる。既に、著者の研究室では、TNF-α発現プラスミドを封入した膜融合リポソームを S-180 担癌マウスの癌組織支配動脈から投与すると、直接遺伝子が導入された癌組織血管内皮細胞から TNF-αが持続的に産生され、癌組織血管を介することで効率的に癌組織への集積性が高まり、顕著な腫瘍抑制が認められ、11 匹中 4 匹は完全治癒が確認できるなど著しい抗腫瘍効果を報告している[92]。従って、TNF-α発現血管内皮細胞を癌組織内に投与することで癌組織血管に組み込ませ、そこから TNF-αを持続的に産生させることで上記のような効果的な抗腫瘍効果が得られると考えられる。

また、この知見は種の異なる血管内皮細胞同士がどの様な接着分子を介して結合することで、マウス癌組織中でヒト血管内皮細胞由来の血管とマウスの血管が接合できたのかという、生物学的に非常に興味深い知見である[93)-95)]。さらに、病理・生理学的

にも、近傍に位置しながら血管を形成することが可能となった血管内皮細胞と単独で生存している血管内皮細胞が存在していた結果から、これらの血管内皮細胞の性質を調べることで血管内皮細胞自身の血管形成能力の差異[96]が、どのような原因に起因するものなのかが明らかになるものと考えられる。

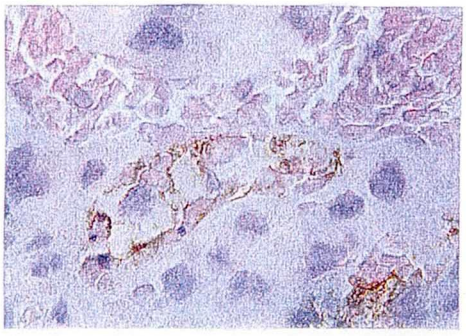

Fig. 28. Immunohistochemical Reactions of Human CD34 to Meth-A Tumor Mass Injecting Human Aorta Endothelial Cells (HAEC)
Excised mouse solid Meth-A fibrosarcoma were fixed with 10 % Folmalin Neutral Buffer Solution for 6 hr at room temperature. Fixed solid tumor mass was embedded Paraffin and Paraffin block sample cuts serial 5 um-thick section. This section was counterstained with Human CD34 and HE using polymer immunocomplex method. × 400.

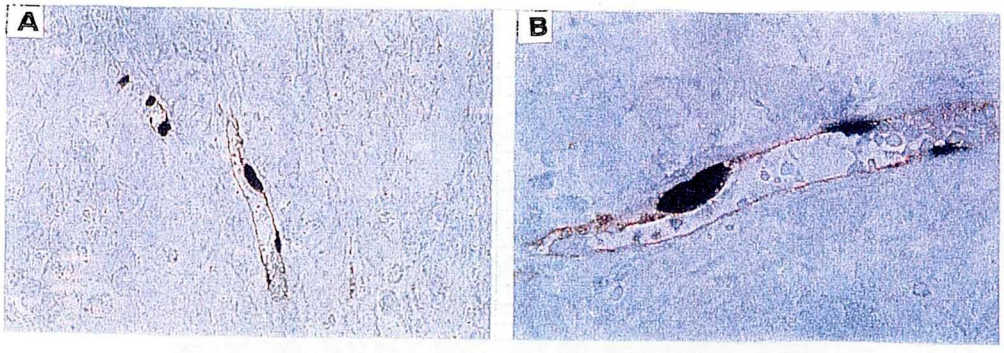

Fig. 29. *In Situ* hybridization Reactions of Human DNA to Meth-A Tumor Mass Injecting Human Aorta Endothelial Cells. (HAEC).
Excised mouse solid Meth-A fibrosarcoma were fixed with 10 % Folmalin Neutral Buffer Solution for 6 hr at room temperature. Fixed solid tumor mass was embedded Paraffin and Paraffin block sample cut serial 5 um-thick section. This section was counterstained with Human CD34 and Human DNA followed by standard *in situ* hybridization A;×200,B;×400.

また、組織学的な興味としても、一般に、各組織の血管内皮細胞は固有の性質を帯びており、血管内皮細胞の heterogeneity が数多く報告[97)-100)]されているが、本研究において、ヒト大動脈血管内皮細胞が毛細血管に再分化した事実は、血管内皮細胞の heterogeneity に一石を投じる知見であると思われる。従って、本章で著者が示すこ

とができた知見は、生物学、病理学、生理学、組織学などの多くの分野にまたがった、癌組織血管新生のメカニズムや癌組織血管内皮細胞の特性解明に様々なヒントを与えてくれるものであると考えられる。

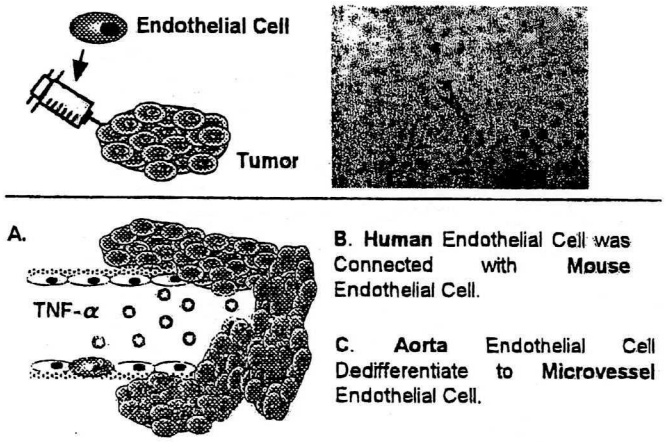

Fig. 30. Schematic of Conclusion

総括

これまで、癌撲滅を目標に、学際的に多大な研究がなされてきたにもかかわらず、未だに癌は根絶が困難な疾患である。従って、現在までに多方面からのアプローチによる癌治療が試みられているが、どのアプローチにおいても癌治療方法は確立されたとは言い難く、さらに多くの改善、改良が行われているのが現状である。癌細胞はその種類、病巣部位の違いなどで実に様々な形質を獲得することが知られている。癌治療方法の確立を困難にしている最大の原因としては、このように癌細胞自身の共通性が見出せないこと、言い換えるならば癌細胞が実に多くの姿に変化できるために、我々が癌細胞の本当の姿を明らかにすることができず、従って、そこから突破口を開けないことにある。しかしながら、個々の癌細胞ではなく、癌という病態そのものを考えたとき、そこに初めて共通性を見出すことが可能となる。いくら癌遺伝子と癌抑制遺伝子の多段階変異によって細胞が悪性転換し、癌が形成されたとしても、最終的には急激な癌組織血管新生を伴わなければ、癌組織は直径１～２ mm 以上には決して大きくなることはないのである[1)]。

従って、本研究において著者は、この癌という病態そのものの共通点である癌組織血管を標的とすることを主眼において、癌治療の新たな突破口を開くために全く新しい二つのアプローチに関する検討を行った。

一つ目のアプローチとして、著者は、分子レベルのストラテジーに基づいた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的検討を行った。

これまでに、著者らが単離を行ってきたラット KMT-17 線維芽肉腫由来の癌組織血管内皮細胞（Tumor-derived endothelial cells ; TEC）を免疫原として用いることで、癌組織血管内皮細胞特異モノクローナル抗体、TES-23 の作製を行った。ラット KMT-17 線維芽肉腫ばかりでなく、冒頭で示した著者のストラテジー通り、各種マウス癌組織に対しても、この TES-23 は短時間で圧倒的な癌組織集積性を示すことが担癌ラット、担癌マウスにおける生体内動態の詳細な検討から明らかとなった。さらに、様々なヒト癌組織切片の免疫組織化学染色を行った結果、ヒト癌組織血管内皮細胞にも TES-23 の認識する抗原の発現が確認できたことから、ヒトへの臨床応用に対する可能性が示唆される結果を得ることができた。次に、TES-23 を用いた癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法のヒトへの臨床応用を視野に入れて、タンパク性抗癌剤であるネオカルチノスタチン（NCS）との Immunoconjugate TES-23-NCS を作製し、TES-23 が適応可能なミサイルキャリアーとなりうる可能性を検討した。Meth-A 線

維芽肉腫担癌マウスに対して TES-23-NCS による抗腫瘍効果を検討したところ、TES-23-NCS conjugate は顕著な抗腫瘍効果を示し、4 例中 3 例が完全治癒するという良好な結果を得ることができた。従って、本稿第一部においては、癌組織血管内皮細胞特異抗体をミサイルキャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の有用性を提示することができた。

さらに、二つ目のアプローチとして、著者は細胞レベルのストラテジーに基づいた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的検討を行った。

現在、著者の研究室では、前述した様に Cytocarrier の概念の基に新たな Drug Delivery System の開発を進めている。そのプロジェクトの中で、著者は Cytocarrier として、血管内皮細胞を用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法とでも言うべき、癌治療ストラテジーを考案した。このストラテジーの骨格は、癌組織血管新生部位に血管内皮細胞を送達させることで、送達された血管内皮細胞は急激に新生する癌組織血管に組み込まれ、生存・増殖する可能性があるのではないのか、という著者の仮説に基づくものである。この細胞に対して、予め遺伝子導入などを行い新たな機能を付与しておけば、疾病治療を目的とした粒子（細胞）レベルの薬物キャリアーとなり得ると考えられる。

初めに、著者は癌組織血管新生部位に血管内皮細胞を送達させる基礎的検討を行った。その際に、細胞接着作用と細胞遊走作用の両方の性質を有する新規膜結合型ケモカイン、Fractalkine のレセプターである CX3CR1 を発現した細胞は、癌組織血管に対する指向性を有していることが明らかとなった。従って、今後は、CX3CR1 発現血管内皮細胞を作製し、その細胞が癌組織血管に対する指向性を有しているのかを検討することが急務である。しかしながら、Cytocarrier として用いる血管内皮細胞を癌組織血管に送達できたとしても、投与された血管内皮細胞が癌組織血管に組み込まれて、癌組織内で生存しなくては、血管内皮細胞を薬物キャリアーとして用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法は全く成立しない。従って、実際に、投与された血管内皮細胞が癌組織血管に組み込まれ、生存することを証明するために、マウス Meth-A 線維芽肉腫担癌 SCID mouse の癌組織内に Human CD34 陽性細胞であるヒト大動脈血管内皮細胞を局所投与し、その癌組織切片を Human CD34 抗体により免疫組織化学染色を行った。その結果、マウス癌組織内で投与されたヒト血管内皮細胞由来の血管とマウス血管が接続し、その血管内をマウスの赤血球が循環していることから示唆されるように機能的に働いている癌組織血管が構築されている事実を発見した。従って、本稿第二部においては、血管内皮細胞をミサイルキャリアーとして用い

た癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に向けた第一歩を踏み出すことができたものと考えられる。

本研究で著者が考案した血管内皮細胞を薬物キャリアー、Cytocarrier として用いる癌治療の試みは、今後の Drug Delivery System の開発における、全く新たな Targeting 戦略が切り開ける可能性を示唆しているものと著者は考えている。

今日まで、Drug Delivery System の開発の歴史は、いかに標的部位にのみ、いかに多くの薬物を送達させることができるのか、つまり、Active Targeting[101]の開発に費やされてきた歴史であると言っても過言ではない。つまり、投与された 100 個ある薬物を標的組織に 99 個送達させることで、標的組織以外での副作用を回避しようとする発想法であった。本稿では示さなかったが、著者らが現在得つつある知見から、静脈内に投与された血管内皮細胞は血流を介して肝臓や脾臓などの正常組織に分布してしまうが、正常組織では生存できないことが明らかになりつつある。従って、単純な計算に基づくものだが、薬物キャリアーとして投与された 100 個の血管内皮細胞のうちで、1 個でも癌組織血管に送達できれば、本研究で明らかとなった様に、投与された血管内皮細胞は癌組織血管に組み込まれ、生存、増殖し、残りの 99 個は、他の組織で死滅していくものと考えられる。従って、標的組織以外には薬物キャリアーが存在しないことになり、結果的に、副作用が回避できるものと思われる。この様に、初めは Passive Targeting[102]の様相を示すが、最終的には Active Targeting として完結する、あえて述べるならば、Active Followed Passive Targeting とも呼ぶべき Drug Delivery System の概念が、本研究から提示できると考えられる。この様な新たな Drug Delivery System の概念が提示できる可能性があるのは、本研究において薬物キャリアーとして細胞を用いる試みを行った結果である。著者の研究室では、地球上に存在している最もインテリジェントな粒子（細胞）である Cytocarrier を用いた Drug Delivery System が、まもなく来たる 21 世紀において、間違いなく、様々な疾病に対する Drug Delivery System のアプローチの一翼を担うと考えている。今後、この Cytocarrier の概念の基での Drug Delivery System の開発が発展することを切に期待する次第である。

結論

分子レベルおよび細胞レベルのストラテジーに基づいた、癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的検討を行い、以下に示す結論を得た。

癌組織血管内皮細胞特異抗体を用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的検討

1. ラット培養癌組織血管内皮細胞を免疫原として用いて作製した、癌組織血管内皮細胞特異抗体（TES-23）は、担癌ラットにおける生体内動態の検討から、著しい癌組織特異的な集積性を示した。
2. TES-23 は生体内動態の検討から、ラットと同様に、様々なマウスの癌組織に著しい集積性を示すばかりだけでなく、様々なヒト癌組織切片の免疫組織化学染色を行った結果、ヒト癌組織血管内皮細胞にも特異的に交差性を示すことが明らかとなった。
3. TES-23 を用いた癌組織血管を標的とした癌ミサイル療法のヒトへの臨床応用を視野に入れて、タンパク性抗癌剤であるネオカルチノスタチン（NCS）との Immunoconjugate TES-23-NCS を作製し、Meth-A 線維芽肉腫担癌マウスに対して TES-23-NCS による抗腫瘍効果を検討したところ、腫瘍の完全退縮を含む、著しい抗腫瘍効果が確認できた。

血管内皮細胞を用いた癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発に関する基礎的検討

1. 癌組織血管指向性を有する血管内皮細胞を開発するための基礎的検討を行った結果、新規ケモカインレセプター（CX3CR1）を発現させた細胞は癌組織血管指向性を有することが明らかとなった。
2. マウス癌組織内に投与されたヒト血管内皮細胞は、癌組織の新生血管に組み込まれ、マウス癌組織内で、投与されたヒト血管内皮細胞とマウスの既存血管由来のマウス血管内皮細胞が混在して形成されている、キメラ型とでも呼ぶべき癌組織血管が構築されているという事実を発見することができた。

以上、全く新たな二つのストラテジーに基づいた、癌組織血管を標的とした新規癌ミサイル療法の開発の有用性と方向性を提示した。

謝辞

本研究は、多くの方々の支えがなくしては遂行し得なかったものであります。

初めに、終始、私を研究者への道へと厳しく、粘り強く導いて下さいました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授・真弓忠範先生に衷心より謝意を表します。

また、本研究にあたり、種々の温かい御指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助教授・中川晋作先生に深謝致します。様々な御指導、御鞭撻を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助教授・久保一義先生に深謝致します。本研究を遂行するにあたり、終始、本当に温かく、かつ、厳しい、御指導、御鞭撻ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助手・堤康央先生に心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、種々の御指導を頂きました昭和薬科大学講師・宇都口直樹先生に深謝致します。

多大なる御指導、御鞭撻を頂きました、通商産業省工業技術院生命工業技術研究所・角田慎一先生に深謝致します。

また、本研究に関し、モノクローナル抗体の作製および TES-23 の特性に関する検討に際し、共同研究として多大な御尽力を賜りました中外製薬株式会社に深く感謝致します。

KMT-17 を御供与頂きました、北海道大学教授・武市紀年先生、ヒト癌組織を御供与頂き、種々の御助言、御助力を頂きました、大阪大学医学部助教授・塩崎均先生、大手前病院・中原数也先生に深謝致します。OV-HM 細胞を御供与頂ました、大阪大学医学部助教授・藤原大美先生に深謝致します。

また、癌組織内に投与された血管内皮細胞が癌組織血管に組み込まれる事実を見出す際に、共同研究として多大な御尽力、御指導を頂きました DAKO JAPAN ・谷洋一先生に深く感謝致します。

K562/ CX3CR1 および K562 細胞を御供与頂き、種々の御助言、御助力を頂きました、カン研究所・今井俊夫先生、近畿大学医学部教授・義江修先生、助手・中山隆志先生に深く感謝致します。

そして、研究を共に楽しみ、研究を共に苦しんできた仲間であります、槙本博雄修士、鎌田春彦博士、若井由紀子修士、山本陽子修士、松井順二修士、石川智世至修士、渡邉将規学士、佐藤恵子学士、西端俊秀学士、松田貴久学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野の皆様に心より深く感謝致します。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、日本育英会に感謝致します。

引用文献

1. Folkman J., *N Engl J Med.*, **285** : 1182, 1971
2. Folkman J., *N Engl J Med.*, **333** : 1757, 1995
3. Folkman J., *Nature Med.*, **1** : 27, 1995
4. Denekamp J., *Cancer Topics.*, **4** : 28, 1984
5. Burrows F. J. and Thorpe P. E., *Pharmac Ther.*, **64** : 155, 1994
6. Byers V. S. and Baldwin R. W., *Immunology.*, **65** : 329, 1988
7. Vaickus L. and Foon K. A., *Cancer Invest.*, **9** : 195, 1991
8. Dvorak H. F., Nagy J. A. and Dvorak A. M., *Cancer Cells.*, **3** : 77, 1991
9. Baxter L.T. and Jain R. K., *Micro. Res.*, **41** : 5, 1991
10. Burrows F. J., Watanabe Y. and Thorpe P. E., *Cancer Res.*, **52** : 5954, 1992
11. Thorpe P. E., Wallace P. M., Knowles P. P., Relf M. G., Brown A. N. F., Watson G. J., Blakey D. C. and Newell D. R., *Cancer Res.*, **46** : 3183, 1986
12. Engert A., Martin G., Pfreundschuh M., Amlot P., Hsu S. M., Diehl V. and Thorpe P. E., *Cancer Res.*, **50** : 2929, 1990
13. Shockley T. R., Lin K., Nagy J. A., Tompkins R. G., Dvorak H. F. and Yarmush M. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **617** : 367, 1991
14. Denekamp J., Hill S. A. and Hobson B., *Eur. J. Cancer. Clini. Oncol.*, **19** : 271, 1983
15. Denekamp J., *Prog. appl. Microcirc.*, **4** : 28, 1984
16. Denekamp J., *Cancer Metast. Rev.*, **9** : 267, 1990
17. Song C. W. and Levitt S. H., *Cancer Res.*, **31** : 587, 1971
18. Underwood J. C. E. and Carr I., *J. Pathol.*, **107** : 157, 1972
19. O'Connor S.W. and Bale W.F., *Cancer Res.*, **44** : 3719, 1984
20. Heuser L.S. and Miller F.N., *Cancer.*, **57** : 461, 1986
21. Gerlowski L.E. and Jain R.K., *Microvasc. Res.*, **31** : 288, 1986
22. Jain, R. K., *Cancer Metast. Rev.*, **6** : 559, 1987
23. Blasberg R. G., Nakagawa H., Bourden M. A., Groothuis D. R., Patlak C. S. and Bigher D. D., *Cancer Res.*, **47** : 4432, 1987
24. Dvorak H. F., nagy J. A., Dvorak J. T. and Dvorak A. M., *Am. J. Pathol.*, **133** : 95, 1988

25. Yuan F., Leunig M., Berk D.A. and Jain R.K., *Microvasc. Res.,* **45** : 269, 1993

26. Wu N. Z., Kiltzman B., Dodge R. and Dewhirst M. W., *Cancer Res.,* **52** : 4265, 1992

27. Nawroth P. P., Bank I., Handley D., Cassimeris J., Chess L. and Stern D., *J. Exp. Med.,* **163** : 1363, 1986

28. Utoguchi N., Dantakean A., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y, Nakagawa S. and Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.,* **86** : 193, 1995

29. Utoguchi N., Mizuguchi A., Dantakean A., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S. and Mayumi T., *Br. J. Cancer.,* **73** : 24, 1996

30. Ramakrishnan S., Olson T. A., Bautch V. L. and Mohanraj D., *Cancer Res.,* **56** : 1324, 1996

31. Terano H., Shibata T. and Otsuka T., *Drugs Fut.,* **18** : 239, 1993

32. Yanase T., Tamura M., Fujita K., Kodama S. and Tanaka K., *Cancer Res.,* **53** : 2566, 1993

33. Fotsis T., Zhang Y., Pepper M. S., Adlercreutz H., Montesano R., Nawroth P. P. and Schweigerer L., *Nature.,* **368** : 237, 1994

34. Denekamp J., *Br. J. Cancer.,* **45** : 136, 1982

35. Clarke M. S. F., Kiff R. S., Kumar S., Kumar P. and West D. C., *Int. J. Radiat. Biol.,* **60** : 17, 1991

36. Brem H. and Folkman J., *J. Pediatr. Surg.,* **28** : 445, 1993

37. Kim K. J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H. S. and Ferrara N., *Nature.,* 362 : 841, 1993

38. Asano M., Tukita A., Matsumoto T., Kondo S. and Suzuki H., *Cancer Res.,* **55** : 5296, 1995

39. Epenetos A. A., Snook D., Durbin H., Johnson P. M. and Taylor P., *J. Cancer Res.,* **46** : 3183, 1986

40. Hagemeier H. H., Vollmer E., Goerdt S., Schulze O.K. and Sorg C., *Int. J.Cancer.,* **38** : 481,1986

41. Rettig W. J., Garin C. P., Healey J. H., Su S. L., Jaffe E. A. and Old L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **89** : 10832, 1992

42. Wang J. M., Kumar S., Pye D., Agthoven, A. J., Krupinski J. and Hunter R. D., *Int. J. Cancer.,* **54** : 363, 1993

43. Gougos A. and Letarte M., *J. Immunol.,* **141** : 1925, 1988

44. Westphal J. R., Willems H. W., Schalwijk C. J., Ruiter D. J. and Waal R. M., *J. Invest. Derm.,* **100** : 27, 1993

45. Mizuguchi H., Hashioka Y., Fujii A., Utoguchi N., Kubo K., Nakagawa S., Baba A., Mayumi T., *Brain Res.,* **651** : 155, 1994

46. Herlyn D., Sears H. F., Ernst C. S., Iliopoulos D., Steplewski Z., Koprowski H., *Am. J. Clin. Oncol.,* **14** : 371, 1991

47. Reilly R. M., Sandhu J., Alvarez- Diez T. M., Gallinger S., Kirsh J. and Stern H., *Clin. Pharmacokinet.,* **28** : 126, 1995

48. Green L. L., Hardy M. C., Maynard- Currie C. E., Tsuda H., Louie D. M., Mendez M. J., Abderrahim H., Noguchi M., Smith D. H., Zeng Y., David N. E., Sasaki H., Gazra D., Brenner D. G., Hales J. F., McGuiness R. P., Capon D. J., Klapholz S. and Jakobovits A., *Nature Genetics.,* **7** : 13, 1994

49. Ohizumi I., Tsunoda S., Taniguchi K., Saito H., Esaki K., Koizumi K., Makimoto H., Wakai Y., Matsui J., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Utoguchi N., Ohsugi Y. and Mayumi T., *Int. J. Cancer.,* **77** : 561, 1998

50. Lesley J., Hyman R. and Kincade P., W. *Adv. Immunol.,* **54** : 271,1993

51. Salter D. M., Godolphin J. L. Gourlay M. S., Lawson M. F., Hughes D. E. and Dunne E., *J. Pathol.,* **179** : 396, 1996

52. Givehchian M., Woerner S. M., Lacroix J., Zoller M., Drings P., Becker H., Kayser K., Ridder R. and Doeberitz V. K., *Oncogen.,* **12** : 1137- 1144, 1996

53. Salmi M., Virta K. G., Sointu P., Grenman R., Kalimo H. and Jalkanen S., *J. Cell Biol.,* 122 : 431, 1993

54. Lokeshwar V. B., Iida N. and Bourguignon Y. W., *J. Biol. Chem.,* **271** : 23853, 1996

55. Zara J. J., Wood R. D., Boon P., Kim C. H., Pomato N., Bredehorst R. and Vogel C. W., *Anal. Biochem.,* **194** : 156, 1991

56. Maeda H., *Anticancer Res.,* **1** : 175, 1981

57. Batra J. K., Kaspryzyk P. G., Bird R. E., Pastan I. and King C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **89** : 5867, 1992

58. Carlsson J., Drevin H., *Biochem. J.,* **173** : 723, 1978

59. 大槻健蔵, 石田名香雄., *蛋白質 核酸 酵素,* **26** : 937, 1981

60. Noguchi A., Takahashi T., Yamaguchi T., Kitamura K., Takakura Y., Hashida M. and Sezaki, H., *Jpn. J. Cancer Res.,* **82** : 219, 1991

61. Suzuki T., Sato E. and Goto K., *Chem. Pharm. Bull.,* **29** : 844, 1981

62. Burrows F. J. and Thorpe P. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **90** : 8996, 1993

63. Takahashi T., Yamaguchi T., Kitamura K., Suzuyama H., Honda M., Yokota T., Kotanagi H., Takahashi M. and Hashimoto H., *Cancer.,* **61** : 881, 1988

64. 高橋俊雄, 山口俊春, 北村和也, 野口明則, 本田光世, 大辻英吾., *癌と化学療法.,* **17** : 1111, 1990

65. Kitamura K., Takahashi T., Miyagaki T., Yamaoka N., Tsurumi H., Ohtsuji E., Kamiguchi M., Noguchi A. and Yamaguchi T., *Jpn. J. Cancer Res.,* **83** : 769, 1992

66. Kitamura K., Takahashi T., Kotani T., Miyagaki T., Yamaoka N., Tsurumi H., Noguchi A. and Yamaguchi T., *Cancer Res.,* **52** : 6323, 1992

67. Kitamura K., Miyagaki T., Yamaoka N., Tsurumi H., Noguchi A., Yamaguchi T. and Takahashi T., *Cancer Immunol. Immunother.,* **36** : 177, 1993

68. Ohtsuji E., Yamaguchi T., Tsurumi H., Yata Y., Nishi H., Okamoto K., Taniguchi K., Kato M., Kotani T., Kitamura K. and Takahashi T., *Eur. J. Surg. Oncol.,* **21** : 61, 1996

69. 武市記年 *臨床免疫.,* **23** : 39, 1991

70. Rice G.E., Gimbrone M.A.Jr., Bevilacqua M.P., *Am. J. Pathol.* **133** : 204, 1988

71. 斉木育夫, 米田純也. *実験医学.,* **10** : 278, 1992

72. Folkman J. and Shing Y., *J. Biol Chem.,* **267** : 10931,1992

73. Ferrara N., *Endocr. Rev.,* **13** : 18, 1992

74. Shibuya M., *Adv. Cancer. Res.,* **67** : 281, 1995

75. Mustonen T. and Alitalo K., *J. Cell. Biol.,* **129** : 895, 1995

76. Folkman J. and D'Amore P.A., *Cell.,* **87** : 1153, 1996

77. Hanahan D. and Folkman J., *Cell.,* **86** : 353, 1996

78. Butcher E.C., *Cell.,* **67** : 1033, 1991

79. Springer T.A., *Cell.,* **76** : 301,1994

80. Butcher E.C. and Picker L.J., *Science.,* **272** : 60, 1996

81. Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A., Schall T.J., *Nature.,* **385** : 640, 1997

82. Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo JA., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez Ramos J.C., Gearing D., *Nature.,* **387** : 611, 1997

83. Imai T., Hieshima K., Haskell C., Baba M., Nagira M., Nishimura M., Kakizaki M., Takagi S., Nomiyama H., Schall TJ., Yoshie O., *Cell.,* 91 : 521,

84. Maciejewski Lenoir D., Chen S., Feng L., Maki R., Bacon K.B. *J. Immunol.,* **163** : 1628, 1999

85. Combadiere C., Gao J., Tiffany H.L., Murphy P.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **253** : 728, 1998

86. Narita T., Kawakami Kimura K., Kasai Y., Hosono J., Nakashio T., Matsuura N., Sato M., Kannagi R., *J. Gastroenterol.,* **31** : 299, 1996

87. Narita T., Kawakami Kimura N., Matsuura N., Hosono J., Kannagi R., *Anticancer. Res.,* 15 : 2523, 1995

88. Fong A.M., Robinson L.A., Steeber D.A., Tedder T.F., Yoshie O., Imai T., Patel D.D., *J. Exp. Med.,* **188** : 1413

89. Fujiwara H., Clark S.C., Hamaoka T., *Ann. N. Y.Acad. Sci.,* **795** : 294,

90. Ogawa M., Tsutsui T., Zou J.P., Mu J., Wijesuriya R., Yu W.G., Herrmann S., Kubo T., Fujiwara H., Hamaoka T., *Cancer. Res.,* **57** : 2216, 1997

91. Tani Y., *Acta Histochem. Cytochem.,* **32** : 261, 1999

92. Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T, Ijuhin N. and Mayumi T., *Cancer Res.,* **58**: 5725- 5730, 1998

93. Lampugnani M.G., Resnati M., Raiteri M., Pigott R., Pisacane A., Houen G., Ruco L.P. and Dejana E., *J. Cell. Biol.,* **118** : 1511, 1992

94. Muller W.A., Ratti C.M., McDonnell S.L. and Cohn Z.A., *J. Exp. Med.,* **170** : 399, 1989

95. Heimark R.L., Degner M. and Schwartz S.M., *J. Cell. Biol.,* **110** : 1745, 1990

96. Nguyen M., Strubel N.A. and Bischoff J., *Nature.,* **365** : 267, 1993

97. Nagura H., Koshikawa T., Fukuda Y. and Asai J., *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.,* **409** : 407,

98. Komatsu T., Yamamoto M., Shimokata K. and Nagura H., *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.,* **415** : 79, 1989

99. Kinjo T., Takashi M., Miyake K. and Nagura H., *Cell. Tissue. Res.,* **256** : 27, 1989

100. 名倉宏, 越川卓, 浅井淳平. *現代医療,* 26 : 1819, 1994

101. Weckenmann H.P., Matzku S. and Stricker H., *Arzneimittelforschung.,* 38 : 1556, 1988

102. Love W.G., Amos N., Kellaway I.W. and Williams B.D. *Ann. Rheum. Dis.,* **49** : 611, 1990