

B16BL6メラノーマモデルにおける 腫瘍血管新生抑制機構の解析

北原 秀治、江崎 太一

東京女子医科大学 医学部 解剖学・発生生物学講座

1. はじめに

悪性腫瘍が増殖、転移するためには血管新生が必須条件である。腫瘍血管新生のメカニズムを解明し、それを制御する事ができれば、抗血管療法としての癌撲滅にも大きな貢献となる。腫瘍血管新生のメカニズムが提唱されてから約40年近く経ち、血管新生についての報告も既存血管からの内皮細胞の発芽から、発芽以外の血管新生の報告へと移りつつある。しかし、その発芽を含めた血管新生も VEGF を含む成長因子レベルでの分子経路の解明は進んでいるものの、正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞との相違については、形態的にも機能的にも未だに明確にはなっていない。さらに最近では、血管新生抑制因子として基底膜成分の分解産物などが報告され、臨床においては VEGF 自体を抑えて血管新生を抑制する抗血管療法の臨床試験が盛んに行われている。しかし、実際の臨床現場では、複雑な因子が絡み合って成長する悪性腫瘍の血管新生は、簡単には抑制できないのが現実である。

われわれは、*in vivo* において腫瘍新生血管をまず形態学的に解析するために、血管内皮細胞培養に使われる基底膜抽出物の Matrigel (BD Biosciences) に、B16メラノーマ腫瘍細胞を混合し、皮下移植した B16/Matrigel 血管新生モデルを作成した。ところが、われわれはこのモデルにおいて、腫瘍の増殖能は Matrigel との同時移植によって大きく高まるものの、ある時期まで、血管の腫瘍内への進入が強く抑制されていることを発見した。そこで、この現象を解明するために、三次元的に形態解析することを目的とした。

2. 方法

C57BL/6マウス（雄、8週齢）に、高肺転移株である B16メラノーマを Matrigel と等倍で混合したもの

を背部皮下に移植した。その後経時的に全身麻酔下にて、FITC をラベルしたトマトレクチン (*Lycopersicon esculentum* lectin; Vector Laboratories Inc) を静脈注射することにより、全身の血管系を標識後、血圧を 120mmHg に保ちながら左心室より 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で灌流固定する。さらに背部の皮膚ごと腫瘍を摘出し、直ちに PBS で洗浄、30%シヨ糖液に一晩浸漬し、O.C.T. コンパウンドに包埋後、液体窒素にて凍結。厚さ 10-50 μm の凍結切片を作成し、蛍光多重免疫染色を行った。観察は主に共焦点レーザー顕微鏡にて三次元レベルの構造解析を行う。また、電子顕微鏡用には、直ちに 2%グルタルアルデヒドに浸漬固定をし、その後定法通りエポン樹脂包埋を行ない、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡にて観察する。分子生物学的検索として電気泳動、ウェスタンブロットを用いた。

3. 結果および考察

1) 腫瘍血管の形態的、機能的特徴の解析

B16メラノーマのみを同系マウスの背部皮下に移植した B16モデルと、B16/Matrigel モデルとの腫瘍の成長速度を比較してみると、明らかに B16/Matrigel モデルのほうが増殖が著しかった。組織像を比較した場合、B16モデルでは、新生腫瘍血管は網をかけるように腫瘍内へ早期に侵入（発芽）する。ところが、B16/Matrigel モデルでは、Matrigel を含んだ腫瘍塊と新生された血管が分離して現れた。新生腫瘍血管は皮筋直下に沿って、ある一定の幅の帯状に編み目を作り、さらに腫瘍とその血管網の間には一定の距離（無血管野）が認められた。トマトレクチンを使用し、経時的に観察してみると、10日前後までは腫瘍内に新生血管は侵入してないことが確認できた。この血管形態

像をトマトレクチン、CD31、CD105などの染色や、準超薄切片などでB16モデルの腫瘍血管または正常皮下組織の血管と比較すると、B16/Matrigelモデルの新生腫瘍血管は、かなり密で多分岐になった蜂巢状の血管網であった。また、1視野あたりの新生血管の断面積の合計を比較してみると、有意にB16/Matrigelのほうが増殖していた。そのなかには、CD31のみに染色され、レクチンでは染色されない径の細い血管が多数確認できた。これらは血流の開通していない未熟な新生血管と考えられ、腫瘍とは逆方向に向かって伸長していた。さらに、同一マウス個体内でB16のみとB16/Matrigelを同時に移植して比較したところ、Matrigel存在下では、やはり腫瘍側への血管の進入が抑制されており、腫瘍とは逆向きに血管が新生しているのに対し、Matrigel非存在下では、新生血管を取り込んで腫瘍が成長しているのが確認された。電子顕微鏡を用いて観察してみると、腫瘍血管新生で通常観察される発芽様式ではなく、血管の外側から間質系細胞が圧搾し、内腔を分断している像や、血管内腔に内皮細胞が突出しながら中隔を作って血管を分枝する像が多数観察された。

2) 血管新生抑制に関わる細胞の同定

血管新生抑制に関わる可能性のある細胞を同定するために、腫瘍部と血管新生部位との間に出現する無血管野に存在する細胞を種々の細胞マーカーで免疫染色を行った。その結果、マクロファージ (F4/80) や、線維芽細胞 (S100A4) などの細胞が同定された。驚いた事に F4/80陽性のマクロファージ様の細胞はリンパ管マーカーである LYVE-1にも陽性であった。この細胞は基底膜成分をさかんに分解処理する活性化したマクロファージと考えられた。電子顕微鏡による超微形態観察でも、やはり、無血管野には多数の非常に活性化した、線維芽細胞やマクロファージ様細胞が確認できた。

3) 血管新生抑制機構の解析

Matrigel 内には多数の成長因子が含まれていることから、成長因子低含有の Matrigel を使用してみたところ、その影響は全くなかった。ところが、凍結融解で変性させた Matrigel を使用した場合、Matrigel を含まない B16単独移植モデルと同じように、早期に腫

瘍内に血管が進入している像が確認できた。そこで、この変性 Matrigel を電気泳動で調べてみると、40kDa 付近の分子に欠落があることが解った。この付近にある既存の血管抑制因子としてはアンジオスタチンが考えられる。実際にアンジオスタチンがこのような特殊な血管新生に関与しているかは今後の研究の課題である。

4. まとめ

以上より B16/Matrigel モデルにおける一連の現象では、以下の仮説が立てられる。すなわち、Matrigel は培地として、細胞にとっては非常に高栄養環境である。B16メラノーマがそのような高栄養下で、著しく成長を早めた場合、腫瘍血管新生が通常のパターン (発芽) では追いつかず、血管新生自身も著しく成長を早めなければならない。そのため、新生パターンを変化させ、最も経済的な分岐様式と思われる隔壁形成などで素早く血管を新生させている。また、B16メラノーマが成長する際に Matrigel が周囲の細胞との相互作用によって、分解を受け、その中に含まれる微量な血管新生抑制因子 (アンジオスタチンなどを含む) が放出され、腫瘍周囲の血管新生のみが抑制される。しかし、腫瘍から少し離れた場所 (正常組織側) では抑制は行われず、結果的に腫瘍とは逆向きに血管が新生、腫瘍がある程度成長するまでの間、腫瘍周囲には無血管野が存在する。さらに腫瘍増殖が進むにつれて、最終的には新生血管と腫瘍包含されて、ともに増殖していく。

以上のように腫瘍は非常に複雑な因子の絡み合いにより血管を新生させてくる。つまり、わずかな微小環境の変化においても、腫瘍はその血管新生パターンを変化させる事ができる。その複雑な因子の絡み合いのため、一つの分子経路で血管新生を抑制しても、新たな分子経路で血管が新生してくる。これは臨床応用でも置き換える事が出来る。抗癌剤、放射線、手術などで環境が変わった腫瘍は、その環境に応じて血管新生パターンを変化させ、再び増殖を継続する。本研究のように、腫瘍血管の伸展パターンを3次元的に、周囲の環境も含めた全体のネットワークとして捉え、正確に解析していく事が将来の抗血管薬の開発などにつながるのではないだろうか。