

リゾホスファチジン酸による腎腫瘍血管網正常化に関する研究

近畿大学医学部 泌尿器科学教室

坂野 恵里

1. 諸言

血管新生は腫瘍の増殖に不可欠な要素であり、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor : VEGF）をターゲットにした分子標的治療薬や抗 VEGF 抗体は癌治療で広く用いられてきた¹⁾。一方、腫瘍血管は正常血管に比べて血管透過性が亢進しており、血管内皮細胞間の接着や血管周皮細胞の被覆が緩いため、腫瘍内の間質圧が上昇し、低酸素状態、アシドーシスになりやすい²⁾。腫瘍が低酸素に陥ると、腫瘍細胞が悪性化し転移が促進されることも示されている²⁾。このような場合、抗 VEGF 療法により、腫瘍血管消退のために腫瘍内部への薬物送達が悪化するだけでなく、腫瘍がさらに低酸素に陥り、遠隔転移を来すことが報告されている³⁾⁴⁾。そこで、腫瘍血管新生を阻害するのではなく、腫瘍血管を正常化することで、腫瘍内部低酸素状態を改善し、薬剤送達も改善する概念が提唱され²⁾、研究が進んでいる。リゾホスファチジン酸（lysophosphatidic acid : LPA）は、血管形成に関わる脂質因子である。高倉らは、マウス肺癌、大腸癌、メラノーマモデルにおいてこの LPA を使用したところ、血管内皮細胞間の結合が強固となり、より正常血管に近い緻密な腫瘍血管網を形成させることに成功した。結果として、低酸素領域を減少させ、抗腫瘍薬を腫瘍内部まで行き渡らせられることを示した⁵⁾。

また、腫瘍が低酸素状態になると、腫瘍浸潤 T 細胞の減少、骨髄抑制細胞および制御性 T 細胞の増加、腫瘍関連マクロファージの分極変化（M2 マクロファージ優位）をもたらす、腫瘍微小環境（tumor microenvironment : TME）は immunosuppressive になる⁶⁾。一方、転移性腎癌および切除不能腎癌に対して、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1/PD-L1 抗体が近年適応になっている。そこで、腫瘍血管を正常化すれば、薬剤送達の改善だけではなく、免疫チェックポイント阻害剤がより奏功しやすい TME に変化することが期待されるが、これまで腎癌に対する腫瘍血管正常化に関する報告はない。

以上の背景に基づき、本研究では、特に血管新生が豊富な腫瘍である腎細胞癌に着目し、マウス腎癌細胞株の皮下同種移植モデルを用いて、腎癌に対して LPA の腫瘍血管に与える影響を評価することとした。

2.方法

2.1 マウス腎癌細胞株 (RenCa) における LPA の抗腫瘍効果および LPA アイソタイプ遺伝子発現の検討

RenCa 細胞に LPA を添加、72 時間培養し、細胞増殖抑制効果をクリスタル・バイオレットアッセイにて評価した。次に、RenCa 細胞株および Balb/c マウスの RenCa 皮下腫瘍における LPA1-6 の発現をリアルタイム PCR にて検討した。

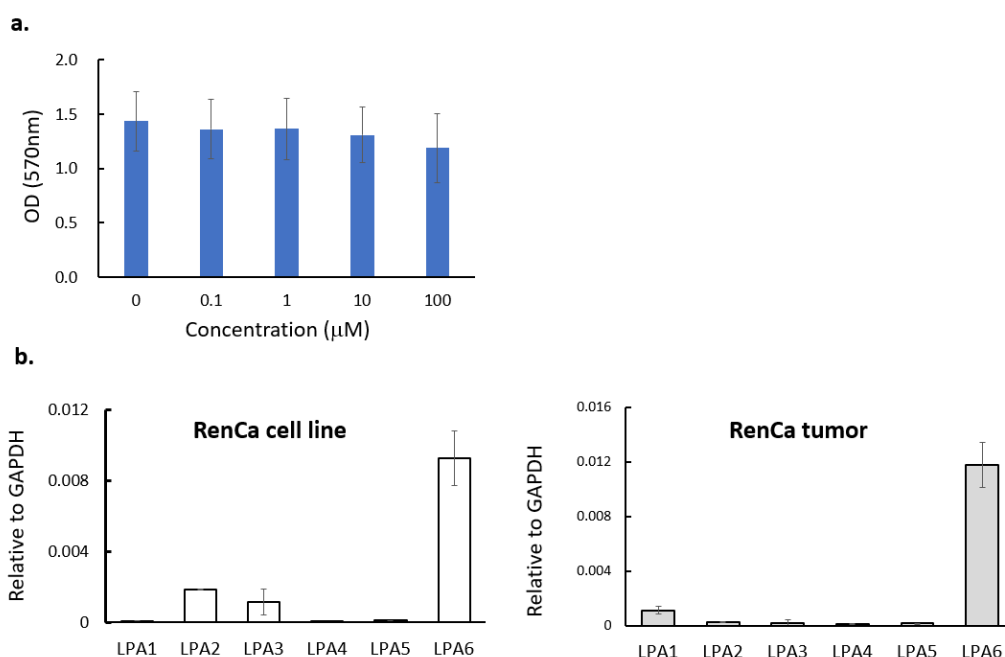
2.2 RenCa 皮下移植モデルにおける LPA の抗腫瘍効果および腫瘍血管に与える効果の検討
Balb/c マウスに RenCa 1.0×10^6 cells を皮下注入し、同種皮下移植マウスモデルを作成し、LPA を 3 mg/kg で 14 日間腹腔内投与した。Vehicle 群および LPA 投与群における腫瘍組織および血管内皮細胞における LPA1-6 の発現をリアルタイム PCR で、腫瘍血管の評価を蛍光免疫染色にて評価した。

なお、本研究は近畿大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

3.結果

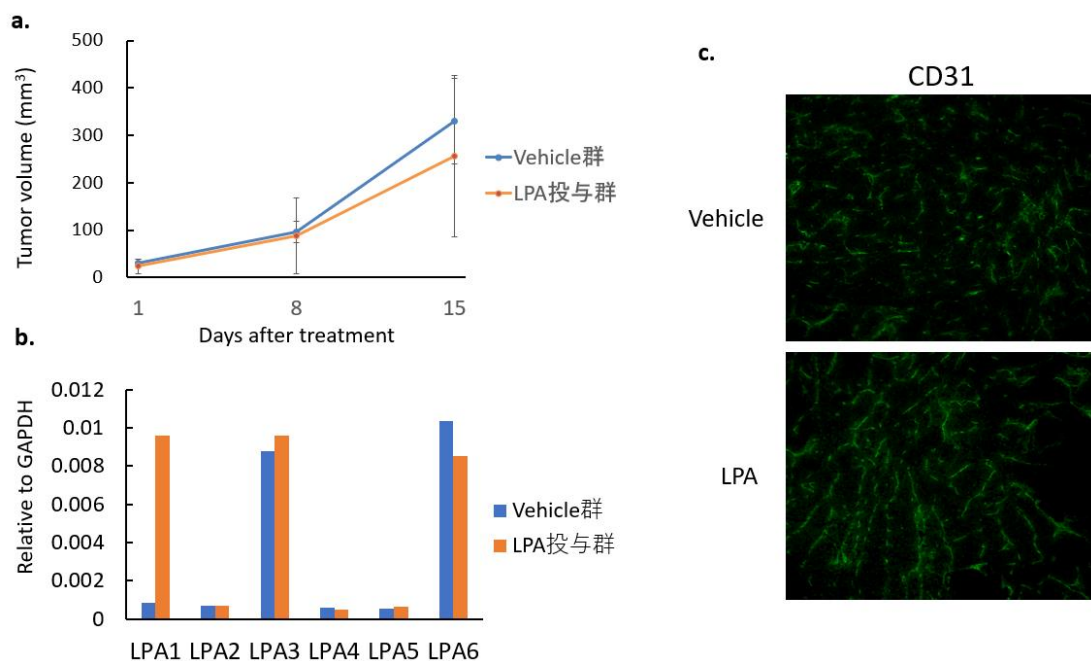
3.1 RenCa 細胞株自体 (つまり、血管を伴わない腫瘍細胞のみの状態) に対する LPA の細胞増殖抑制効果は $100 \mu\text{M}$ の高濃度でもほとんど認められなかった (図 1a)。次に、RenCa 細胞株と RenCa 皮下腫瘍 (腫瘍は未投薬の状態で採取) における内在性 LPA の mRNA 発現を比較したところ、LPA6 は細胞株および腫瘍組織両方で発現が認められ、LPA2, 3 は細胞株で、LPA1 は腫瘍組織でより特異的に発現している傾向にあった (図 1b)。

図 1 LPA の細胞増殖抑制効果と細胞株および腫瘍組織における LPA 受容体の発現



3.2 腫瘍増殖については投薬開始後 8 日までは Vehicle 群と LPA 群 (n=8 tumors) でほとんど差は認めなかったが、Day15 では LPA 群の方で腫瘍増殖が抑制されている傾向にあった (図 2a Vehicle ; n=3 tumors、LPA; n=8 tumors)。LPA3、LPA6 の mRNA は Vehicle 群でも LPA 群でも比較的高発現であったが、LPA1 の発現は、Vehicle 群に比べ LPA 投与群で著明に上昇していた (図 2b)。LPA 投与にて腫瘍サイズに変化はなかったが、腫瘍血管の長径は伸長していた (図 2c 写真はともに倍率は 100 倍)。

図 2 マウス腎癌皮下移植マウスにおける抗腫瘍効果、LPA 受容体の発現、腫瘍組織の血管内皮細胞の分布



4.考察

In vitro における LPA の抗腫瘍効果はほとんどないことから LPA は腎癌細胞以外の細胞に作用することが考えられた。LPA1 は細胞株ではなく、腫瘍組織で発現しており、血管内皮細胞や間質細胞由来と示唆された。Vehicle 群の腫瘍は LPA 群と比べると腫瘍壊死の部分が大きかったが、LPA 群でも腫瘍サイズに比例して壊死部分は認めており、腫瘍がより小さい段階での LPA 投与による検討が必要である。フローサイトメトリーにて Vehicle 群の腫瘍における CD31⁺CD45⁻の血管内皮細胞は 2.7%含まれていることは確認し (データ未記載)、Vehicle 群および LPA 投与群の血管内皮細胞における LPA1-6 の mRNA 発現を評価する予定であったが、RNA 抽出、リアルタイム PCR に必要な細胞数を得られなかった。腫瘍全体において LPA 投与群の LPA1 の発現が著明に上昇しており、腫瘍血管伸長に与える影響は LPA1 を介している可能性が考えられる。本研究での結果を踏まえ、今後マウスの

数を増やして、**drug delivery** や低酸素領域の評価を行い、さらに腎癌の標準治療である分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤の作用を増強するか検討していきたい。LPAの腎細胞癌の腫瘍血管に対する効果を検証し、このLPAを用いた治療は、従来の血管新生を阻害する治療とは真逆のコンセプトであり、分子標的治療薬で原発巣が縮小しても転移が出現する、免疫チェックポイント阻害剤の効果の個体差が多いという腎癌領域において、新たな治療選択肢になる可能性が期待できる。

5.結語

マウス腎癌モデルにおいて、LPAが腫瘍血管を正常化する可能性が示唆された。分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤の薬剤送達を上昇できるかを検討していく。

6.文献

- 1) Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(10): 795-803.
- 2) Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*. 2005; 307(5706): 58-62.
- 3) Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009;15(3): 220-31.
- 4) Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2009; 15(3): 232-9.
- 5) Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y et al. Lysophosphatidic Acid Receptor 4 Activation Augments Drug Delivery in Tumors by Tightening Endothelial Cell-Cell Contact. *Cell Rep*. 2017; 20(9): 2072-2086.
- 6) Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*. 2014; 26(5): 605-22.