

学位論文

「Inhibition of Placental Growth Factor in Renal Cell  
Carcinoma ( 淡明腎細胞癌に対する抗胎盤成長因子モノクロー  
ナル抗体の異種移植による検討 )」

指導教授名 岩村 正嗣

申請者氏名 別所 英治

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【背景】胎盤成長因子（PIGF）は VEGF family に帰属し、主要な悪性腫瘍においてその発現が上昇するため、**potential target** として注目されている。現在では、進行性淡明腎細胞癌に対しては分子標的薬が中心的な役割を果たしている。特にチロシンキナーゼ阻害薬、mTOR 阻害薬が治療アルゴリズムの中心を担っている。その使用法は大規模臨床試験により確率され治療効果も改善傾向にあるが、依然として治療抵抗性腎癌を克服できていない現状がある。今回、我々は淡明腎細胞癌に対する抗胎盤成長因子モノクローナル抗体の抗腫瘍効果とその役割をヌードマウスにヒト腎細胞癌を異種移植し検討を行った。

【方法】淡明腎細胞癌の細胞株（A498、786O、Caki1、SN12C）を生後 6～8 週のヌードマウスにそれぞれ異種移植し、平均腫瘍径が 200～300mm<sup>3</sup> まで腫瘍が成長するのを確認後、3 種類の用量で抗胎盤成長因子モノクローナル抗体（TB403）または抗ヒト IgE モノクローナル抗体（コントロール群）を週 1 回、4 週間の腹腔内投与を行った。週に 2 回腫瘍径を、週に 1 回体重測定を行った。5 週後、異種移植片は切除し免疫組織染色による新生血管を評価した。凍結切片から RNA を抽出しマイクロアレイと Angiogenesis PCR array による Gene expression profiling にて遺伝子発現の変化を評価した。マウス血清を用いて血管新生に関与するヒト、マウス VEGF やヒト、マウス PIGF なども ELISA 法を用い測定した。スニチニブ抵抗性淡明腎細胞癌に対して TB403 の抗腫瘍、抗血管新生効果についても同様に検討を行った。

【結果】TB403 の投与による腫瘍縮小率はコントロール群と比較し全ての細胞株において統計学的有意差は認められなかった。スニチニブ抵抗性腫瘍に対しても抗腫瘍効果は認められなかった。血清マウス PIGF に関しては有意差を持って TB403 の投与量と相関し増加傾向を示した。体重減少などの有害事象は認められなかった。CD31 免疫組織染色を行ったが有意な vessel density の減少はなかった。マイクロアレイにおいてはマクロファージなどの免疫応答を誘導する因子の変化が確認された。異種移植をしていないマウスに TB403 を投与すると有意差を持って血清マウス PIGF が濃度依存性に増加を示した。

【総括】今回の実験モデルでは抗 PIGF 抗体は淡明腎細胞癌に対して抗腫瘍効果または抗血管新生効果は認められなかった。包括的な腫瘍効果は示さないと推察されるが、特定の腫瘍、特に治療抵抗性腫瘍は血漿中 PIGF とその受容体の発現が上昇している報告が散見されているのでスニチニブ抵抗性腎細胞癌などに対する検討も必要である。本研究でもマクロファージなどを賦活化させる免疫応答に関与する遺伝子の過剰発現が確認されており腫瘍周囲の間質細胞が PIGF の過剰発現を促すことにより血管新生、腫瘍新生に寄与していることが推察される。

## 目次

	頁
1. 背景・目的 -----	1
2. 方法論	
2-1. Reagents, Cells and cell culture -----	1
2-2. 異種移植 -----	1
2-3. 免疫染色 -----	1
2-4. マイクロアレイ解析 -----	2
2-5. Angiogenesis PCR array -----	2
2-6. 統計学的評価 -----	2
3. 結果およびそれを基にした考察	
3-1. PIGF 阻害薬による ccRCC 腫瘍の腫瘍縮小効果	2
3-2. TB403 投与による腫瘍内の血管新生に関連する遺伝子発現	2
4. 将来展望	3
5. 引用文献 -----	4
(6. 図表 -----	7)

## 1. 背景・目的

2013年に米国において腎がんと診断される数は65,150人、腎癌で死亡する数は13,680人と推定されている。腎細胞癌(RCC)は全悪性腫瘍の約3.9%を占めており、診断時年齢の中央値は64歳である。最近になるまで、転移性RCCに対する全身治療の選択肢はサイトカイン療法か新規薬剤の臨床試験だけに限られていたが、淡明細胞型RCC(ccRCC)に対してはチロシンキナーゼ阻害薬、特にスニチニブによる分子標的療法が1次及び2次治療に広く用いられるようになった。現在までFDAに承認されている分子標的薬は、VEGFを標的としたチロシンキナーゼ阻害薬やmTOR阻害薬などである。しかしスニチニブ耐性ccRCCの治療戦略は未だ議論されている。これらを克服するための新たな新薬の研究が必要である。

胎盤成長因子(PIGF)はVEGFファミリーの一員でありVEGFR1(Flt1)に特異的に結合し血管新生を促す。疾患特異的サイトカインと考えられており特に悪性腫瘍で高発現し血管内皮細胞などから分泌される。治療抵抗性悪性腫瘍で発現するとの報告があり例えばベバシツマブ抵抗性大腸癌、肺癌などでPIGFが高値を示す報告も散見されるためPIGFは抗血管新生療法の抵抗性に何らかの役割を持つと考えられるためその阻害薬が治療抵抗性を克服する可能性がある。

TB403(RO5323441)はヒトリコンビナント免疫グロブリン抗体でありヒト、マウスPIGFを中和しVEGFとは交差反応を示さない。幾つかの臨床試験が進行中であり例えば治療抵抗性転移性大腸直腸癌、卵巣癌に対する治療効果の判定(NCT01148758)などがある。

本研究はTB403の腎癌の異種移植を用いた治療効果の検討であり、さらにスニチニブ抵抗性腎癌モデルを用い治療抵抗性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法論

Reagents, Cells and cell culture. TB403(Roche diagnostics, Penzberg, Germany)はhistidine buffer(20 mmol/l, 140 mmol/l sodium, Ph6.0)にて25mg/mlとした。786-O, A498, Caki1 cell linesはATTCよりSN12CはNCIより購入した。RPMI1640に10%FBSを溶解させ5%CO<sub>2</sub>で37度にて細胞培養を行った。継代は10回以内とした。

異種移植. すべてIACUCのプロトコールに基づきマウスモデルの実験を行った。生後6週から8週の間メスAthymic nude mouseにRCC細胞株(3~5 x10<sup>6</sup> cell)を移植し腫瘍量が200~300 mm<sup>3</sup>の大きさとなった時に各抗体は経腹膜的投与を週に1度、投与期間は4週間とした。4週間後に血清と腫瘍を採取し免疫染色、マイクロアレイなどに用いた。スニチニブの投与は経口で40mg/kg(786-O)もしくは80mg/kg(SN12C)の容量を連日投与とし25%以上の腫瘍量の増加を認めた場合にスニチニブ治療抵抗性腫瘍と定義した。

免疫染色. 摘出した腫瘍は10%ホルマリン溶液内に一晩おき順次パラフィン固定とした。HE染色で壊死組織、腫瘍細胞を確認し免疫染色のサンプルを選定した。免疫染色はLeica Bond III automated systemに従い、脱パラフィン化しCD31(SC-1506;Santa Cruz Biotech)を1:00

希釈で 15 分間、3%過酸化水素を 5 分間、3,3-diaminobenzine (DAB, brown chromogen)、10 分間、続いて secondary antibody (ab97049; ABCAM)を 1:500 希釈で 15 分、最後にヘマキシリンを 5 分間行った。洗浄は Tris-buffered saline で行いスコアリングは病理医に依頼した。

マイクロアレイ解析. RNA 抽出は凍結切片より TriPure Isolation Reagent を用いて行った。まずは DNA 除去のため DNase (Promega) で処理しさらに Qiagen RNeasy Mini kit にて精製した。RNA 量は 260 nm absorbance で Nanodrop を用いて測定した。cDNA は RT2 First Strand kit で行い Gene expression profiling は Human Affymetrix U133 plus 2.0 chips で解析した。

Angiogenesis PCR array. The Human Angiogenesis RT2 Profiler PCR Array、RT2 SyBR Green/ROX PCR Mastermix を用いることにより血管新生関連遺伝子のうち主要な 84 種類の遺伝子を同時に解析できるようにデザインされている。 $\Delta \Delta Ct$  値を用いることにより過剰発現を測定した。

統計学的評価. GraphPad Prism, version 5.0 を用いて、The ANOVA test、Nonparametric test に関しては Kruskal-Wallis test で評価した。P-Values は 0.05 以下を有意差とした。

### 3. 結果およびそれを基にした考察

TB403 の効果判定、さらには腫瘍と間質細胞との Cross-talk を調べるため異種移植は有効な実験である。血管内皮細胞、fibroblast、マクロファージと PIGF 産生の関連があり ELISA 法にて human PIGF (hPIGF) は腫瘍から、murine PIGF (mPIGF) は間質細胞から産生されることから腫瘍-間質の関連を確認した。腫瘍縮小率は明らかな有意差を認めることはなかった (Figure 1A-1C)。hPIGF はコントロール群、治療群共に低値で有意差を認めなかったが mPIGF は TB403 の濃度依存性に有意差を持って正の相関を示した。VEGF 値は TB403 にて影響を示すことは無かった (Figure 1D-1F)。さらに評価するため mPIGF に特異的に結合する 5D11D4 を同様に投与してみたが TB403 と同様に明らかな腫瘍縮小効果は認めなかった (Figure 1G)。興味深かったのは TB403 で確認された mPIGF の上昇は 5D11D4 では認められなかった (Figure 1H)。スニチニブ耐性腎癌にも同様に TB403 を投与した。スニチニブ耐性腎癌では PIGF の過剰発現があるとの報告もあるため 2 次治療として TB403 は効果が期待出来ると考えた。786-O と SN12C の 2 種類の細胞株で検討し、スニチニブ耐性により PIGF の増加は確認できたが 1 次治療と同様に明らかな TB403 によるスニチニブ耐性腎癌の腫瘍縮小効果は認められなかった (Figure 2A-2E)。さらに mPIGF 値はスニチニブ単剤による治療と比較し TB403 治療群で有意差を持って高値を示した。これらの結果より TB403 の 1 次治療、2 次治療共に明らかな腫瘍縮小効果は認めることはなく TB403 により過剰な mPIGF の増加を示した。Microvessel density (MVD)も評価したが TB403 投与によって MVD に影響を示さなかった (Figure 3A-3C)。

TB403 投与による腫瘍内の血管新生に関連する遺伝子発現の変化について Affymetrix U133 plus 2.0 chip を用いて評価した。63 の遺伝子が統計学的有意差をもち、1.3 倍の変化を認めたが VEGF に関連する遺伝子に関しては明らかな変化を認めることは無かった (Figure 4)。

具体的には **C1orf38** はマクロファージによる炎症反応、**GLIPR1** の down-regulation は癌の活動性に関連するものである。これらより腫瘍関連マクロファージの up-regulation により **PIGF** の過剰発現が示唆された。これらの結果のさらなる確認のため **RT2 Profiler PCR array** によって **84** の異なる血管新生に関するサイトカインを評価したが前述の結果と同様に **VEGF** 関連サイトカインでは明らかな変化を認めなかった。ただ **Ct value** から **PIGF** の受容体である **Flt1** は **ccRCC** 腫瘍には発現がないことが示唆された。報告文献によると **Flt1** が過剰発現している悪性腫瘍に抗 **PIGF** 抗体を投与により有意な腫瘍縮小効果を認めることが報告されているため抗 **PIGF** 抗体の腫瘍への直接効果があることが推察されている。**MVD** への影響は本検討と同様に無いことも報告されている。

要約すると本研究により得られた結果は以下である。1. **PIGF** 阻害薬による **ccRCC** 腫瘍の腫瘍縮小効果は異種移植の検討では認めなかった。2. **PIGF** の過剰発現は抗血管新生薬により惹起されることが推察された。3. 腫瘍関連マクロファージが **angiogenesis, tumourigenesis escape** のため **PIGF** 高発現に貢献している可能性がある。4. **Flt1** は **ccRCC** 腫瘍に発現されていなかった。

**ccRCC** からの **PIGF** 産生量はごく僅かであったが間質細胞からの産生量は特に抗血管新生薬投与後に上昇傾向を示していることから **PIGF** は **angiogenesis escape** の **key regulator** の可能性がある。報告によるとマクロファージ、**fibroblast** などから産生され、それらの自己活性化を促しさらに **Flt1** を発現している腫瘍細胞の増殖や迷入に起因するとされている。さらに、**PIGF** を阻害することは抗血管新生よりも **Flt1** を過剰発現している腫瘍に対して直接的な抗腫瘍効果を示すとされている。別の報告では大腸直腸癌や **glioblastoma** に対して **VEGF** 阻害薬を投与した場合、血清 **PIGF** の上昇を示すため **VEGF pathway** に代わり **PIGF** が **angiogenic escape** に関与することが推察されている。

#### 4. 将来展望

**PIGF** 阻害薬はブロードな抗血管新生、抗腫瘍効果を示すことはないと思察されるが **VEGF** 受容体である **Flt1** が発現している腫瘍に特異的に効果を示す可能性が示唆される。抗血管新生薬の投与により血中 **PIGF** 濃度が上昇を示すことから潜在的なバイオマーカーと考えられる。今後は幾つかの悪性腫瘍においてさらなる臨床試験が必要であり特に腎癌においてもさらなる検討が必要であると考えている。

## 5. 引用文献

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 865–875.

Rini BI, Atkins MB: Resistance to targeted therapy in renal cell carcinoma. *Lancet* 2009; *Oncol* 10: 992-1000.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al.: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 115–124.

Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P: FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 942–956.

Escudero-Esparza A, Martin TA, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG: PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2 and the PGF receptor, neuropilin, in human breast cancer: prognostic Significance: *Oncol Rep* 2010; 23: 537–44.

Zhang L, Chen J, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG: Expression of placental growth factor (PlGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 68.

Wei SC, Liang JT, Tsao PN, Hsieh FJ, Yu SC and Wong JM: Preoperative serum placenta growth factor level is a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1630–36.

Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al.: Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 2010; 28: 453–59.

Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, et al.: Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 16–24.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al.: Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007; 131: 463–475.

Bais C, Wu X, Yao J, Yang S, Crawford Y, McCutcheon K, et al.: PlGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth. *Cell* 2010; 141: 166-77.



Yao J, Wu X, Zhuang G, Kasman IM, Vogt T, Phan V, et al.: Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PlGF antibodies efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 11590-95.

Nielsen DL, Sengeløv L: Inhibition of placenta growth factor with TB-403: a novel antiangiogenic cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 795-804.

Huang D, Ding Y, Li Y, Luo WM, Zhang ZF, Snider J, et al: Sunitinib Acts Primarily on Tumor Endothelium rather than Tumor Cells to Inhibit the Growth of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 1053-62.

Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, et al.: Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 1063-71.

Fatima N, Cohen C, Lawson D, Siddiqui MT: TTF-1 and Napsin A double stain: a useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine-needle aspiration cell blocks. *Cancer Cytopathol* 2011; 119: 127-33.

Schomber T, Kopfstein L, Djonov V, Albrecht I, Baeriswyl V, Strittmatter K et al.: and Christofori G: Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 10840-8.

Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, et al.: Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 2002; 1: 99–108.

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al.: Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; 8: 841–849.

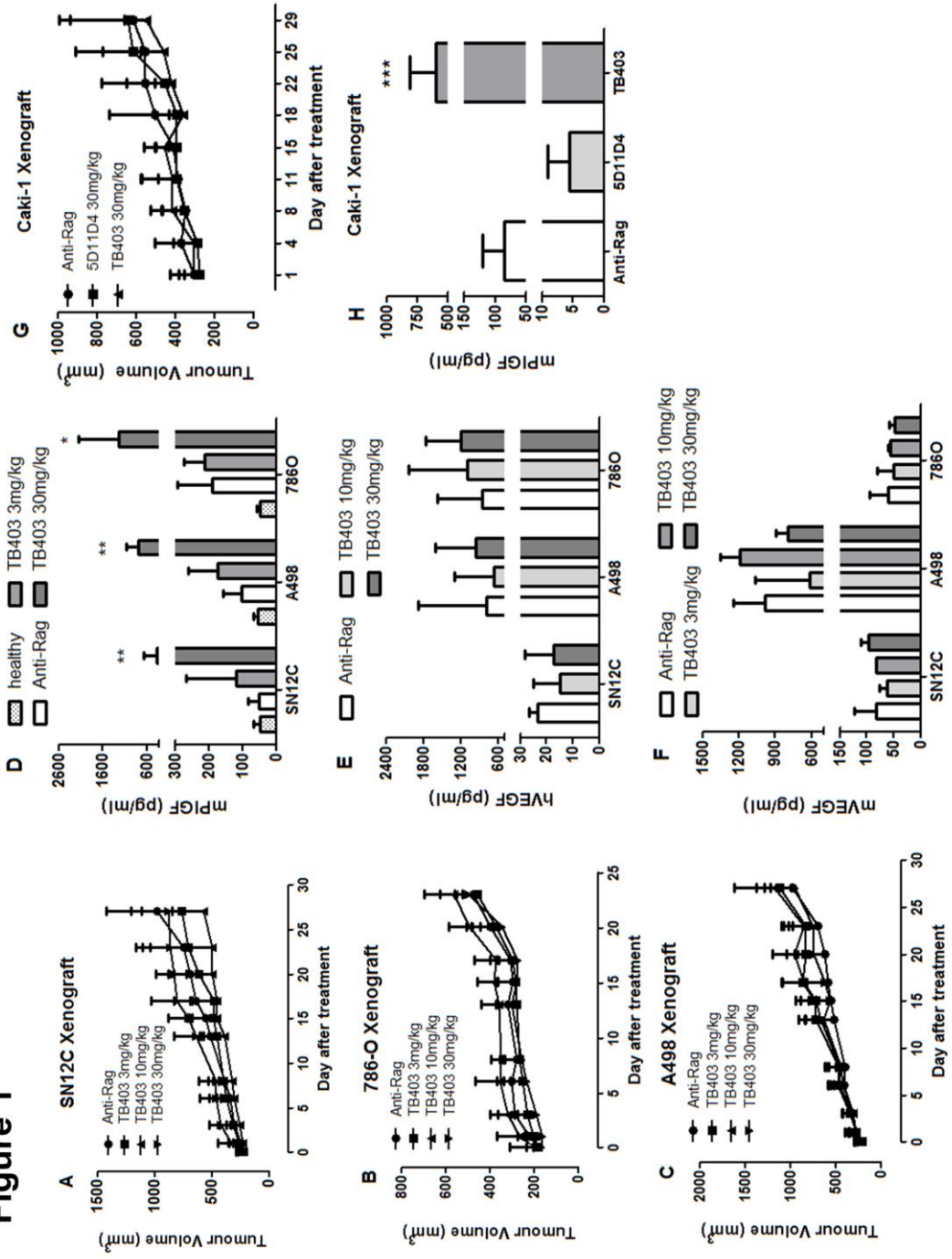
Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y et al.: Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 2006; 108: 1849–1856.

Bagley RG, Ren Y, Weber W, Yao M, Kurtzberg L, Pinckney J, et al.: Placental Growth Factor Upregulation Is a Host Response to Antiangiogenic Therapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 976-988.

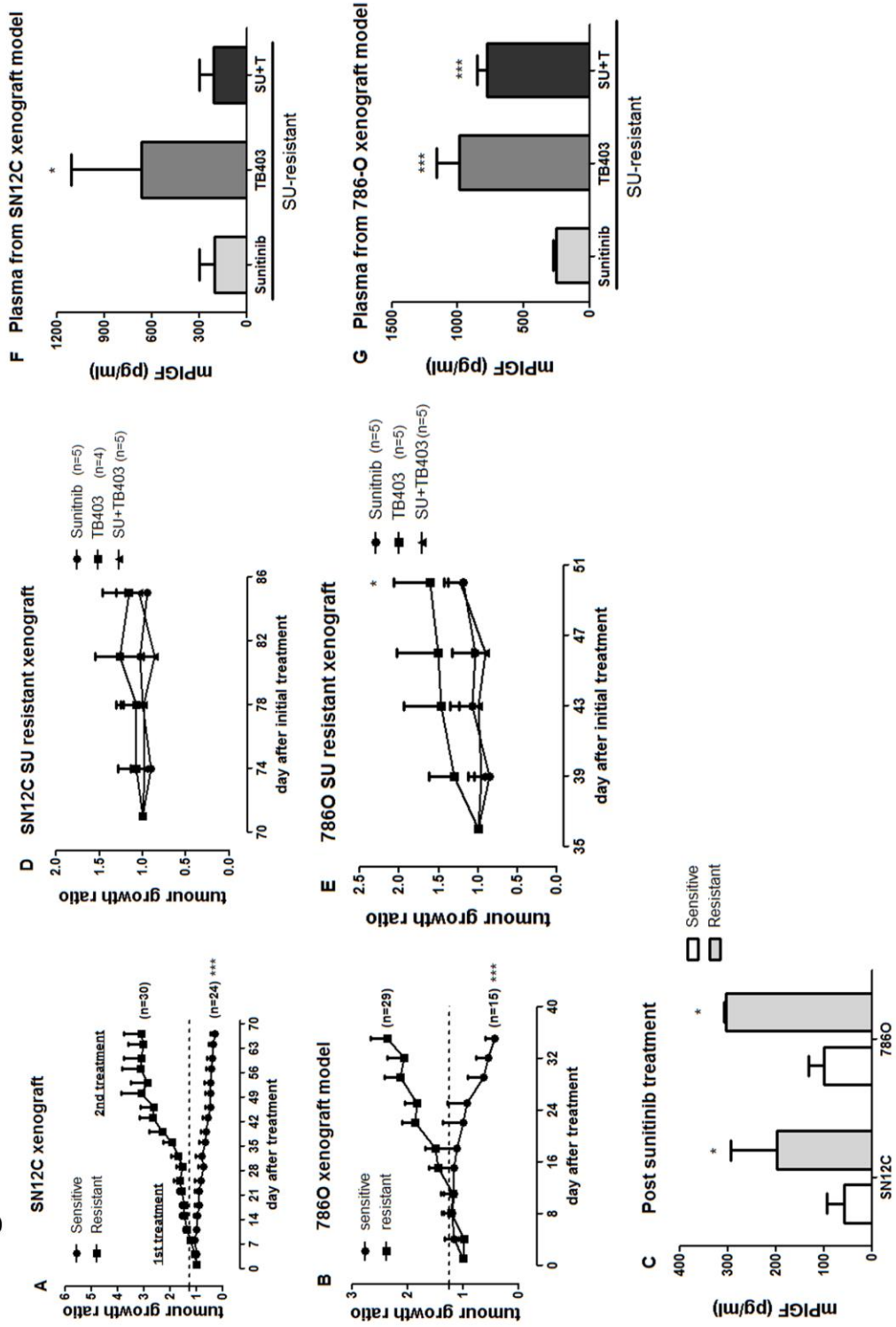
Taylor AP, Rodriguez M, Adams K, Goldenberg DM, Blumenthal RD: Altered tumor vessel maturation and proliferation in placenta growth factor-producing

tumors: potential relationship to post-therapy tumor angiogenesis and recurrence.  
Int J Cancer 2003; 105: 158-64.

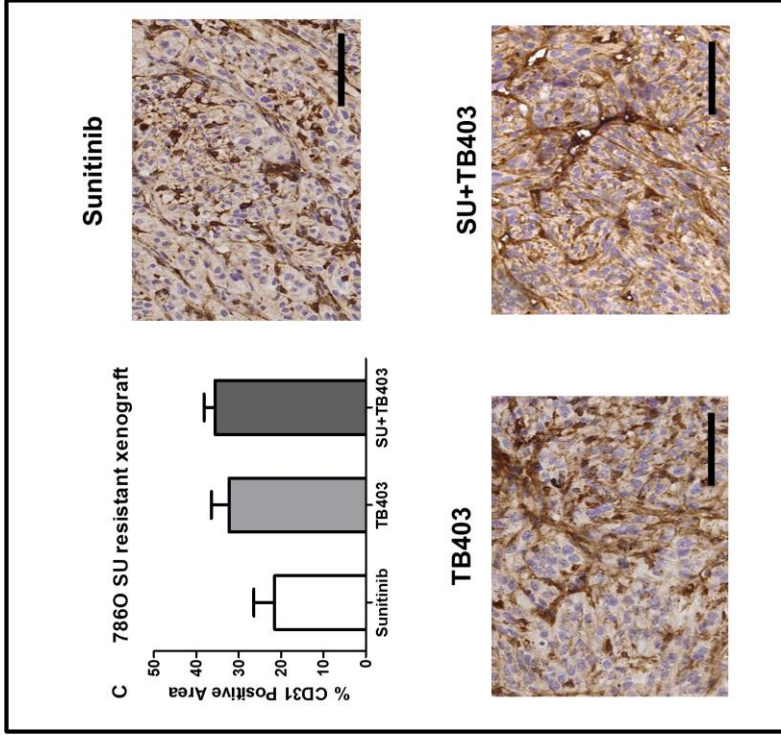
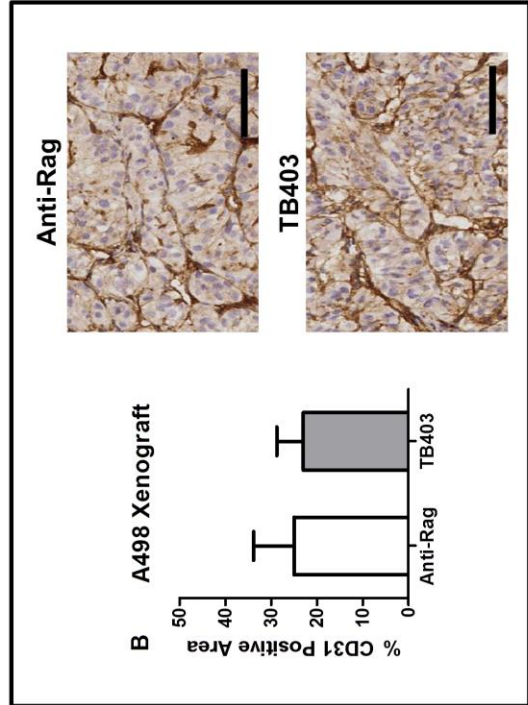
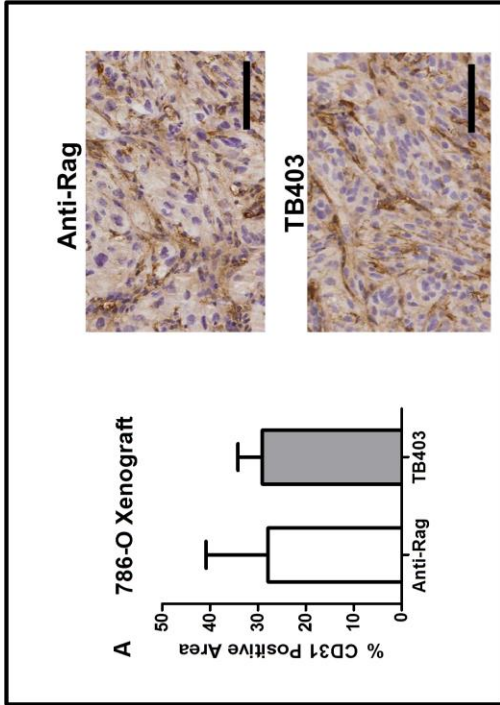
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

