

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文名：

多発性骨髄腫モデルマウスに対する一酸化窒素合成酵素阻害剤

N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester による血管新生抑制療法の試み

(Anti-angiogenic effects of a nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester in a newly established multiple myeloma SCID mouse model)

著者名： 采田 志麻

Shima Uneda

指導教官名： 熊本大学大学院医学研究科

免疫病態学教授

満屋 裕明

審査委員名： 病理学第二講座担当教授

竹屋 元裕

腫瘍医学講座担当教授

佐谷 秀行

発生医学研究センター造血発生分野担当教授

小川 峰太郎

2003年3月

## Table of Contents / 目次

	page
1) 要旨	6
2) 発表論文リスト	10
3) 謝辞	11
4) 略語一覧	12
5) 研究の背景と目的	16
5)-1 はじめに	16
5)-2 多発性骨髄腫の概念	17
5)-3 多発性骨髄腫の病態	17
5)-4 多発性骨髄腫の臨床像	19
5)-5 現在の多発性骨髄腫の治療について	20
5)-6 悪性腫瘍と血管新生	21
5)-7 血管新生因子	22
5)-8 多発性骨髄腫における血管新生と病態の関与	24
5)-9 一酸化窒素と血管新生	25
5)-10 N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)について	26
5)-11 本研究の目的	26
6) 実験方法	28
6)-1 実験に使用した細胞	28
6)-2 対象症例	29

6)-3	試薬, マウス	29
6)-4	患者骨髄腫細胞, MGUS, 反応性形質細胞増多症形質細胞の純化	30
6)-5	逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	31
6)-6	細胞株及び患者由来純化骨髄腫細胞の免疫染色	32
6)-7	ELISA法によるVEGFの測定	33
6)-8	マウスにおけるヒト骨髄腫細胞株KHM-4の継代	33
6)-9	マウスに対する試薬投与方法	34
6)-10	マウス腫瘍組織の免疫染色	35
6)-11	血管新生の解析	35
6)-12	腫瘍組織のヘモグロビン吸光度の測定	36
6)-13	マウス末梢血ヘモグロビン濃度の測定	36
6)-14	統計処理	36
7)	実験結果	38
7)-1	症例の内訳	38
7)-2	骨髄腫細胞の純度	38
7)-3	骨髄腫細胞に於けるVEGFの発現	39
7)-4	骨髄腫細胞に於けるangiopoietin-2の発現	39
7)-5	血管新生因子と骨髄腫の予後	40
7)-6	骨髄腫細胞株KHM-4及びKHM-4マウスの特徴	41
7)-7	L-NAMEによる腫瘍増殖の抑制	41
7)-8	L-NAMEによるマウス血管新生の抑制	42
7)-9	L-NAMEによるVEGF産生の抑制	44

8)	考察	45
8)-1	多発性骨髄腫におけるVEGFおよびangiopoietin-2の発現	45
8)-2	多発性骨髄腫におけるVEGF, angiopoietin-2発現の意義	47
8)-3	VEGF, angiopoietin-2発現と予後	47
8)-4	VEGF, angiopoietin-2をターゲットとした治療について	49
8)-5	多発性骨髄腫に対するNOS阻害剤, L-NAMEの効果	50
8)-6	L-NAMEの効果とVEGF抑制について	51
8)-7	今後	54
9)	結語	55
10)	図表とその説明	56
11)	参考文献	73

## 1) 要旨

### 要旨

血管新生は固形腫瘍では腫瘍の増殖、浸潤、転移に重要な因子であり、最近では多発性骨髄腫をはじめとする造血器腫瘍にも病態との関与が報告されている。我々は多発性骨髄腫に於ける血管新生の病態に及ぼす影響を明らかにし、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤による血管新生抑制療法で骨髄腫の治療を試みた。

まず、多発性骨髄腫患者、反応性形質細胞増多症、monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)の患者から抗体ビーズを用いて骨髄腫細胞を純化し、主要な血管新生因子であるVEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>、angiopoietinの発現をRT-PCRと免疫染色を施行したところ、VEGFとangiopoietin-2の発現が確認された。RT-PCRの検討ではVEGF<sub>121</sub>とVEGF<sub>165</sub>は骨髄腫35サンプルのうち各々30及び22例に発現し、VEGF<sub>165</sub>を発現する症例はいずれもVEGF<sub>121</sub>を共発現していた。Angiopoietin-2は26サンプルの骨髄腫細胞に発現していたがangiopoietin-1を発現している症例は認められなかった。VEGFのいずれのアイソフォームもMGUSや反応性形質細胞増多症では発現していなかったが、angiopoietin-2はMGUSで低レベルの発現を認めた。Kaplan-Myer analysisでは骨髄腫細胞からのVEGF<sub>121</sub>の発現は有意な予後因子ではなかった( $p=0.913$ )が、VEGF<sub>121</sub>を発現する症例のうちVEGF<sub>165</sub>を共発現する症例は予後不良であった( $p<0.01$ ; Cox-Mantel test)。以上より、VEGF<sub>165</sub>とangiopoietin-2が血管新生を

促進する一方で、その発現が予後不良因子であると事が判明した。このため、血管新生因子を抑制する治療が骨髄腫に対して有効であると考えた。

次に我々は、抗癌剤に耐性化した骨髄腫患者より樹立された骨髄腫細胞株 KHM-4をSCIDマウス皮下に継代し、腫瘍血管が豊富な形質細胞腫モデルマウスを作成し、NO合成酵素阻害剤N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を投与した。

L-NAMEを投与したマウスと血管新生抑制作用が報告されているpaclitaxelを投与したマウスは著明に腫瘍が退縮したが、骨髄腫に一般に用いられる抗癌剤である melphalanや doxorubicinを投与したマウスでは腫瘍の増殖は抑制できなかった。

L-NAMEとpaclitaxelを投与したマウスでは腫瘍血管密度が減少していた。L-NAMEを投与したマウス腫瘍組織ではVEGFの産生が抑制されており、L-NAMEはNOSを抑制する事でVEGFの産生を抑制し、血管の新生や腫瘍の増殖を抑制していると考えられ、NO合成酵素阻害剤が抗癌剤耐性化した骨髄腫や形質細胞腫に有効であると考えられた。

## Abstract

Angiogenesis is one of critical factors in sustaining the growth, invasion, and metastasis of certain solid tumors and hematological malignancies such as multiple myeloma (MM). In the present study, we analyzed expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins which are known to be major angiogenic factors. Myeloma cells were purified by immuno-magnetic beads from bone marrow samples. Expressions of VEGF and angiopoietins were determined by RT-PCR and immunohistochemistry. VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> were expressed in 30 and 22 samples out of 35 MM samples, respectively. Expression of VEGF<sub>165</sub> was always accompanied with VEGF<sub>121</sub>. Angiopoietin-2 was detected in 26 MM samples while none of the samples expressed angiopoietin-1. VEGFs were not found in plasma cells from MGUS or reactive plasmacytosis. Kaplan-Myer analysis revealed that VEGF<sub>121</sub> was not a significant prognostic factor ( $p=0.913$ ). However, those with co-expressing VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> had a significantly poor prognosis ( $p<0.01$ ). Expression of angiopoietin-2 was also a poor prognostic factor ( $p<0.05$ ). Expressions of VEGFs and angiopoietin -2 in myeloma cells were frequently observed while not found in non-neoplastic plasma cells. Expressions of VEGF<sub>165</sub> and angiopoietin-2 were poor prognostic factors possibly due to enhancement of angiogenesis. Inhibition of these molecules could be a potentially useful therapeutic approach for MM.

In order to develop a new therapeutic approach for anti-angiogenic therapy, we examined anti-cancer potential of an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS),

$N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), in a novel SCID mouse model (KHM-mouse) harboring highly sanguineous plasmacytoma cell line KHM-4, derived from a patient with highly chemo-resistant MM. KHM-mice were intraperitoneally administered with either L-NAME, doxorubicin, melphalan, or paclitaxel. A significant reduction in tumor sizes was noted in L-NAME-administered KHM-mice while no significant reduction was observed in melphalan- or doxorubicin-administered mice. A profound decrease in angiogenesis was observed in tumor tissues from L-NAME- and paclitaxel-administered KHM-mice as blood vessel amounts were quantified. A marked decrease in levels of human vascular endothelial cell growth factor (VEGF) was identified in tumor tissues from L-NAME-administered KHM-mice, strongly suggesting that L-NAME suppressed VEGF production by tumor cells through its inhibition of NOS of tumor cells, resulting in reduced neovascularization in mice leading to the regression of tumor sizes. The present data represent the first observations that certain NOS inhibitors potentially serve as experimental agents for treatment of chemo-resistant MM and plasmacytoma.

## 2) 発表論文リスト

### 2)-1 学位論文の参考となる発表論文

1. Shima Uneda, Hiroyuki Hata, Fumihiko Matsuno, Akitoshi Nagasaki, Naoko Harada, Yumi Mitsuya, Hiromitsu Matsuzaki and Hiroaki Mitsuya,

A nitric oxide synthase inhibitor, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methyl-ester, exerts potent anti-angiogenic effects on plasmacytoma in a newly established multiple myeloma SCID mouse model. *British Journal of Haematology*. 120: 396-404., 2003.

### 2)-2 過去の論文リスト

1. Shima Uneda, Fumihiko Matsuno, Takashi Sonoki, Izumi Tniguchi, Fumio Kawano and Hiroyuki Hata. Expressions of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in myeloma cells. *Haematologica*. 88: 113-115., 2003.

2. Shima Uneda, Hiroyuki Hata, Fumihiko Matsuno, Naoko Harada, Yumi Mitsuya, Fumio Kawano and Hiroaki Mitsuya. Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM. *British Journal of Haematology*. 120: 53-55., 2003.

3. 采田志麻, 畑裕之. 骨髄微小環境から見た骨髄腫細胞の増殖動態-特にVEGFについて. *血液フロンティア Hematology Frontier* 12; 615-621, 2002. 医薬ジャーナル社

### 3) 謝辞

本研究の機会を賜り御指導頂きました，熊本大学医学部第二内科教授，満屋裕明先生に深く感謝いたします。

直接御指導頂きました熊本大学医学部第二内科講師，畑裕之先生，同助教授（現牛深市民病院副院長），松崎博充先生，同助手，松野文彦先生に深謝いたします。

更に共同研究者の熊本大学医学部第二内科，長崎明利先生（現琉球大学第二内科），原田奈穂子先生（現米国RosewellPark Cancer Institute, Department of Immunology, Buffalo, 研究員），園木孝志先生，谷口泉先生，また研究にご助力頂いた満屋裕美さん（現米国University of California, Berkeley, 在学中）および熊本大学動物資源開発研究センターに深謝いたします。

貴重な臨床検体を供与して頂いた国立熊本病院臨床研究部の河野文夫先生，熊本赤十字病院内科，吉田稔先生，及び細胞株KMS-12-BM, KMS-12-PEを供与して頂いた川崎医科大学衛生学，大槻剛巳助教授，抗体KM202を供与して頂いた熊本大学医学部脳神経外科，森岡基浩先生に深く感謝いたします。

#### 4) 略語一覧

Ang1 : angiopoietin-1	
Ang2 : angiopoietin-2	
AITL : angioimmunoblastic T cell lymphoma	血管芽球性T細胞リンパ腫
ATL : adult T-cell leukaemia	成人T細胞性白血病
ATRA: all-trans retinoic acid	全トランスレチノイン酸
bFGF : basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
BJP : Bence Jones protein	ベンスジョーンズ蛋白
BM : bone marrow	骨髄
CD : cluster of differentiation	
cNOS: constitutive NOS	
CTL : cytotoxic T cell	細胞障害性T細胞
CR : complete remission	完全寛解
DLI : donor leukocyte infusion	ドナーリンパ球輸注
EFS : event free survival	無事故生存期間
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay	
eNOS : endothelial NOS	血管内皮型NO合成酵素
FBS : fetal bovine serum	ウシ胎児血清
FGFR : fibroblast growth factor receptor	線維芽細胞増殖因子受容体
FITC : fluorescein isothiocyanate	
Flk-1 : fetal liver kinase-1	

Flt-1 : <i>fms</i> -like tyrosine kinase-1	
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
GVL : graft-versus-leukemia	
EGF : epidermal growth factor	上皮増殖因子
HIF-1 : hypoxia-inducible factor	
HGF : hepatocyte growth factor	肝細胞増殖因子
HTLV-1 : human T lymphotropic virus type 1	ヒトTリンパ球向性ウイルス1型
HUVEC : human umbilical vein endothelial cell	ヒト臍静脈内皮細胞
Ig : immunoglobulin	免疫グロブリン
IGF-1 : insulin-like growth factor	インスリン様増殖因子
IgH : Ig heavy chain	免疫グロブリン重鎖
KDR : kinase insert domain protein receptor	
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1	
IFN- $\alpha$ : interferon alpha	インターフェロン- $\alpha$
IL-1, 6, 8, 10 : interleukin-1, 6, 8, 10	インターロイキン-1,6, 8, 10
iNOS : inducible NOS	誘導型NO合成酵素
LFA-1 : lymphocyte function associated antigen-1	
L-NAME : N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester	
L-NMMA : N <sup>G</sup> -monomethyl-L-arginine	
MIP-1 $\alpha$ : Macrophage inflammatory protein- 1 alpha	
mRNA : messenger RNA	
MM : multiple myeloma	多発性骨髄腫

MP : melphalan-pledonisolon 療法	
MGUS : monoclonal gammopathy of undetermined significance	
MVD : microvessel density	微小血管密度
NCAM : neural cell adhesion molecule	
nNOS : neuronal NOS	神経型NO合成酵素
NO : nitric oxide	一酸化窒素
NOS : nitric oxide synthase	一酸化窒素合成酵素
NS : non-secretory	非分泌型(骨髓腫)
NST : non-myeloablative stem cell transplantation	骨髓非破壊の造血幹細胞移植
OAFs : osteoclast-activating factors	破骨細胞活性因子
OS : overall survival	全生存期間
PBSCT : peripheral blood stem cell transplantation	末梢血幹細胞移植
PCL : plasma cell leukemia	形質細胞性白血病
PCR : polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PE : pleural effusion	胸水
PIGF : placenta growth factor	
PSA : prostate-specific antigen	前立腺特異抗原
PTHrP : parathyroid hormone-related protein	副甲状腺ホルモン関連蛋白
RANK : Receptor activator of nuclear factor-kappa B	
RANKL : RANK ligand,	
RT-PCR : reverse transcription coupled with polymerase chain reaction	逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応

RVI : relative vessels indices	相对血管密度
RP : reactive plasmacytosis	反应性形質細胞增多症
TGF- $\beta$ : transforming growth factor-beta	形質轉換增殖因子- $\beta$
TSP-1, 2 : thrombospondin-1, 2	
VAD : VCR (vincristine) + ADR (adriamycin, doxorubicin) + Dexa (dexamethasone) 療法	
VCAM-1 : vasucular cell adhesion molecule-1	
VE-cadherin : vascular endothelial cadherin	
VEGF : vascular endothelial growth factor	血管内皮增殖因子
VLA-2, 4, 6 : very late antigen-2, 4, 6	

## 5) 研究の背景と目的

### 5)-1 はじめに

造血器腫瘍の治療は、従来抗癌剤による化学療法と合併症に対する感染症や貧血のコントロールなどといった支持療法を中心とされてきた。近年ではめざましい治療の進歩が認められ、幹細胞移植を併用した超大量化学療法は既に一般化している。ここ数年では、合併症を抑えてGVL効果を高める一般にmini transplant と呼ばれる骨髄非破壊的造血幹細胞移植(NST)の開発や、ドナーからのリンパ球輸注(DLI)特にドナーT細胞から細胞障害性T細胞(CTL)を誘導して再発時に患者に戻すCTL療法、樹状細胞を利用した治療等免疫療法を併用したより有効な治療が確立されつつある。

白血病の領域では急性前骨髄性白血病に対するATRAの様な分化誘導療法その他、慢性骨髄性白血病の画期的治療となったチロシンキナーゼの選択的阻害剤STI571 (イマチニブ)、悪性リンパ腫に対しては抗CD20抗体(リツキシマブ)といった様に、抗体療法やチロシンキナーゼ阻害剤など従来とまったく新しい治療方法も臨床化され、更なる開発が進んでいる。

このようにめざましい進歩を遂げる造血器領域の腫瘍に於いて、多発性骨髄腫は現在もなお古典的化学療法が治療の中心であり、幹細胞移植を併用した大量化学療法により生存期間の延長は期待できるものの治癒に至る例は殆ど認められない難治性疾患である。その病態については未だ不明の点も多く、我々はその病態解析と治療開発をめざして研究を行っている。

## 5)-2 多発性骨髄腫の概念

病原体をはじめとする異物から生体を防御する免疫機構には多くの細胞が関わっているが、その中でも特にBリンパ球とTリンパ球は協力しあって抗原特異的な免疫反応に寄与している。細胞性免疫にはTリンパ球が、液性免疫にはBリンパ球が主要な役割を果たしている。Bリンパ球は細胞表面免疫グロブリン(immunoglobulin: Ig)を介して抗原を認識し、最終的には形質細胞と呼ばれる抗体産生細胞に分化する。骨髄で初期分化を遂げたB細胞はリンパ節などの末梢リンパ組織に出て、対応する抗原に遭遇すると活性化され、胚中心B細胞となる。免疫グロブリン遺伝子可変領域の変異により抗原親和性の高い免疫グロブリン分子を持つ胚中心B細胞が選択され、免疫グロブリン重鎖遺伝子定常部のクラススイッチをおこした後、メモリーB細胞或いは形質細胞へと分化する。更に、一部の形質細胞は骨髄に戻り主にIgGなどの抗体を産生し続ける。

多発性骨髄腫(MM)はB細胞分化の最終段階である形質細胞が、骨髄内で腫瘍性に増殖する造血器悪性腫瘍であり、腫瘍細胞から分泌される異常免疫グロブリンが蓄積して、単クローン性免疫グロブリン(M蛋白)となる。

## 5)-3 多発性骨髄腫の病態

骨髄腫発症の分子機構としては、ヒト14染色体長腕末端(14q 32.3)に局在するIgH遺伝子の染色体転座による癌遺伝子の活性化であると考えられている。転座相手としては癌遺伝子として知られるc-MYC (8q 24.1), 細胞周期に関わるcyclin D1 (11q

13.3)やcyclin D3 (6p 21.1), c-MAF (16q 23), MUM1 (6p 25. 3), MAFB (20q 11)であり多発性骨髄腫患者の70%, 細胞株の90%にこれらの遺伝子とIgHの転座が認められる。

その増殖や病態には骨髄ストローマ細胞や骨髄腫細胞から産生されるサイトカインが関与する一方で, 骨髄腫や間質に発現する接着分子や細胞外基質も制御している。特にInterleukin-6 (IL-6)は骨髄腫細胞の主要な増殖因子の一つであり, 骨髄腫細胞との接着によってストローマ細胞から産生されるとともに, 骨髄腫細胞自身からも産生されており, 骨髄腫細胞の増殖・生存を制御する重要な因子である。IL-6や腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )等のサイトカインが骨髄腫細胞の増殖・接着・浸潤を促進するとともに, 抗癌剤によるアポトーシスを抑制すると言われている。

また, 骨髄腫に於ける骨融解病変は破骨細胞表面にある Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) と骨芽細胞にあるRANK ligand (RANKL)で調節されていると報告されている。(1)他にも骨髄腫細胞や微小環境中の細胞から産生される破骨細胞活性因子(OAFs)は局所での破骨細胞の分化・活性化に働き骨融解に影響している。OAFsとしてはIL-6, TNF- $\alpha$ , - $\beta$ , RANKL, IL-1, PTHrP, HGF が知られており, 最近の新しい見解ではMIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ )等も知られている。(2, 3, 4)さらに, 骨髄腫細胞は細胞外マトリックスや骨髄ストローマ細胞に接着するためにLFA-1, VLA-4, ICAM-1, VCAM-1, CD56 (NCAM), CD40等の様々な接着分子を発現している。これらの接着分子の発現は, 骨髄腫細胞の骨髄内外分布にも関わっている(5)。さらにストローマ細胞と骨髄腫細胞の接着はストローマ細胞に於けるIL-6の転写促進のシグナルとなり, 局所での骨髄腫細胞の増殖に関与していると考えられている。このように骨髄腫は周囲のストローマ細胞・血管・破骨細胞・細胞

外マトリックスといった微小環境と相互に作用しながら増殖・進展する。

#### 5)-4 骨髄腫の臨床像

骨髄内で形質細胞が限局して骨融解を生じながら過大に増殖する。それに伴って貧血、易感染性、病的骨折など様々な臨床症状を呈する。腫瘍細胞からは単クローン性免疫グロブリン(M蛋白)が産生され、血中や尿中に検出されるようになる。また、正常免疫グロブリンの産生が抑制されるため液性免疫能が低下し、しばしば重篤な感染症を合併するとともに病期の進行に伴い貧血、腎障害等を生じる。更に骨溶解、病的骨折および高カルシウム血症を生じ、骨溶解に伴って頭痛、病的骨折が出現する。特殊な型として、骨髄腫細胞からアンモニアを産生し高アンモニア血症と高拍出性心不全を来したり、アミラーゼを産生して高アミラーゼ血症を生じる型もある。

これらの症状は数年にわたり緩徐に進行することが多いため病初期は無症状で経過観察や外来化学療法により管理することが可能である。しかし長期の経過の後に胸腹水・胸壁や骨からの形質細胞腫とよばれる腫瘤を形成したり、白血化して形質細胞白血病となり抗癌剤の全身投与を要する症例が多い。病初期より癌性腹水または胸水の貯留や髄外腫瘤の形成などを来し進行が急速な症例も多く、このような症例では診断時より強力な化学療法が必要となる。このように、個々の症例により病像はさまざまであるのみならず、同一症例でも時間の経過とともに病像が変化し、当初化学療法に反応しても次第に治療に耐性化、急激な増悪を来して死に至る。

## 5)-5 現在の多発性骨髄腫の治療について

多くの造血器悪性腫瘍が治療法の進歩により生存率、治癒率の向上を認める中、多発性骨髄腫は1960年代に確立されたMelphalan, prednisolon (MP) 療法(6)が現在もなお標準的治療である。MP療法の奏成功率は40~60%、2年生存率50~60%、平均生存期間は約3年である。MP療法にcyclophosphamideやdoxorubicinなどを併用する試みもなされてきたが、その効果については一定した見解を認めていない。その後1980年代にBarlogieらによりアルキル化剤耐性となった骨髄腫に対するサルベージ療法としてvincristine, doxorubicin, dexamethasoneを含むVAD療法が開発され、進行例・耐性例に対して奏成功率59%と優れた効果を示した(7)。しかし、効果持続期間が短く骨髄抑制も強いため生存率はMP療法と差がないと言われている。更にアルキル化剤の長期投与による2次性発癌の懸念から、維持療法としインターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )療法の試みがされており、生存期間に7ヶ月の延長を認めたという報告もあるが(8)否定的な報告も多く、その評価は定まっていない。以上のような、従来の治療法は抗癌剤耐性を生じ30年近く生存率の改善を認めていない。

1990年代になり近年自家または G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)と、自家或いは同種造血幹細胞移植を併用した大量化学療法 の導入により、ようやく長期生存が期待できるようになってきた。欧米では自家末梢血幹細胞移植(auto-PBSCT)を併用した大量化学療法は進行期骨髄腫の標準的治療であり、本治療により従来の化学療法では10%以下の症例でしか認められていなかった完全寛解(CR)が30~40%の症例で見られ、平均無事故生存期間(EFS)が3.5年、平均全生存期間(OS)が5.5年と改善している。更に移植を2度繰り返すtandem autologous transplant が生存期間

を延長しているという報告がなされている(9)、しかしCRを得られない例や再発は未だに多く、治癒を得る事は殆ど無い。また、若年者には同種幹細胞移植も考慮されるが、移植関連死の報告も多く最終生存期間はauto-PBSCTの方が優れているという報告もある(10)。それに対し近年開発されている、移植前治療を軽減してDLIによるドナーリンパ球による抗腫瘍効果に期待する骨髄非破壊移植(NST)は、治療関連毒性が少なく高齢者にも比較的安全に治療できる有効な治療として期待されている(11)。

いずれにしても、殆どの症例は抗癌剤耐性を生じて治療抵抗性となるため、未だにこの疾患の治癒は困難であり新しい化学療法やそれに変わる治療法の開発が急務である。

#### 5)-6 悪性腫瘍と血管新生

最近腫瘍血管新生に対する関心が高まっており、血管新生は固形腫瘍では腫瘍の増殖、浸潤、転移に重要な因子であることが報告されている(12, 13)。細胞が遺伝変異により悪性転換して腫瘍が形成されたとしても、腫瘍細胞の増殖と同程度にapoptosisが生じることから全体として腫瘍は一定以上には増大できず、腫瘍細胞が新生血管誘導能を獲得して腫瘍血管が新生されると、腫瘍細胞はapoptosisを回避し結果として加速度的に腫瘍が増殖すると説明されている(14)。実際に様々なヒト悪性腫瘍の組織学的解析から腫瘍内の微小血管密度(MVD)による指標が、リンパ節転移(15-18)、遠隔転移、予後と相関することが明らかとなっている。

血管新生は既存の血管から新しい血管ネットワークが形成される現象であり、主に内皮細胞とその周囲を取り囲むペリサイトの2種類の細胞で構築されている細小血管で認められる。血管新生が開始するためには、まずペリサイトが血管内皮

細胞から解離することが必要であり、それにより内皮細胞は血管新生因子に反応しやすくなると考えられている。次に内皮細胞は、種々のプロテアーゼを産生し血管基底膜やその周囲の細胞外マトリックスを消化し、刺激の方向へと遊走を開始する。その際血管内皮の一部が発芽(sprouting)を生じ基底膜を越えて間質へと浸潤を開始する。同時に内皮細胞特有のVE-cadherinによってお互いに連結し、管腔構造物を形成する。最後に形成された管腔構造物の周囲をペリサイトが取り囲み新しい血管基底膜が形成されて成熟した血管が構築される(図1)。一般に腫瘍血管にはペリサイトは認められず不安定で未熟な構築を呈する。

#### 5)-7 血管新生因子

血管新生は様々な増殖因子により制御されており、腫瘍血管新生に於いては腫瘍から血管増殖因子が産生されることが上記の血管新生のステップの各所に関わっていると言われている。血管新生を主に調節する因子として vascular endothelial growth factor (VEGF)(19, 20), hepatocyte growth factor (HGF) (21), TGF- $\beta$  (22), チミジンホスホリラーゼ (23), IL-8(24), IL-10 (25), bFGF(26)などが知られている。また、血管新生を抑制する負の調節因子としては thrombospondin-1, 2 (TSP-1, 2)(27), 前立腺特異抗原(PSA)(28), angiostatin (29), endostatin(30, 31)などが知られている。これらの促進因子と抑制因子のバランスによって調節され新しい腫瘍血管ネットワークが形成される。

血管内皮細胞に作用して血管新生を特異的に制御する最も重要な因子として知られるのが血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)である。

VEGFは血管内皮細胞に対する増殖因子、および血管透過性亢進因子の性質をもつ物

質として単離された物質で、分子量約20,000のサブユニットが2量体を形成している。VEGFは血管内皮及び血管周囲の細胞で産生され、その受容体は血管内皮及びリンパ管にありparacrine, autocrine的に作用する(20)。主な生物学的活性は内皮細胞の増殖と透過性亢進の他に内皮細胞に於けるプロテアーゼ産生・内皮細胞および末梢単核球の細胞遊走や凝固因子産生・血球細胞に於けるアポトーシス抑制・内皮細胞に於けるICAM-1, VCAM-1, e-selectin等の細胞接着因子の発現増強である(32)。過剰な血管新生や血管透過性亢進が各種固形腫瘍・糖尿病性網膜症・リウマチ様関節炎等の種々疾患で生じるとされており、その原因因子としても注目されている。VEGFは低酸素状態により誘導され、多くの悪性腫瘍でVEGFの産生と血管新生及び透過性が亢進しており、*in vivo*でも腫瘍における白血球の接着をVEGFが抑制すると報告され悪性腫瘍患者における免疫抑制にも関与している可能性がある。VEGFは血管周囲の細胞で産生されてparacrine的に内皮細胞に作用する。VEGFは単一の遺伝子から選択的スプライシングによってヒト組織では少なくとも4つ以上のアイソフォーム(VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>及びVEGF<sub>206</sub>)が知られている(33, 34)。これらのアイソフォームのうち血管新生に重要といわれているものはVEGF<sub>121</sub>とVEGF<sub>165</sub>であり、最も血管新生を刺激するものはVEGF<sub>165</sub>である(35)。また、VEGFと同一ファミリーにPIGF (placenta growth factor)(36), VEGF-B (37), VEGF-C (38), VEGF-D (39)が同定されている。

最近の研究でangiopoietinsも血管新生に重要であることが知られている。特にangiopoietin-1 (Ang1), angiopoietin-2 (Ang2)は重要な因子である。Ang1はAng1, Ang2共通の受容体であるTie-2にリン酸化を生じ血管内皮細胞とその周囲の壁細胞の接着を

生じ、その結果として血管構築が安定化する(40)。それに対してAng2はAng1に対するアンタゴニストとして働き、血管内皮細胞と支持細胞との結合を融解し、新生血管の内皮細胞の発芽に作用する(41)。Ang2とVEGFの共発現がより新しい血管の新生に強く働くと報告されている(42)(図1)。これらの報告からAng2の発現は胎生期の血管新生のみならず腫瘍血管のリモデリングにも関わっていると考えられる。実際にAng2の発現はglioblastoma(43, 44)や肝細胞癌等のある種の腫瘍で報告されている。

#### 5)-8 多発性骨髄腫における血管新生と病態の関与

固形腫瘍同様に造血器腫瘍に於いても、急性リンパ芽球性白血病(45-47)、急性骨髄性白血病、悪性リンパ腫などで血管新生が病態に影響しているとする報告が認められている。

多発性骨髄腫でも、最近骨髄内微小血管密度(BM-MVD)が多発性骨髄腫の病態の進行と相関するという報告がなされている(48, 49)。前述の様に骨髄腫は周囲の微小環境と相互に作用しながら増殖・進展する。骨髄微小環境内の血管が骨髄腫の病態に非常に影響する。Vaccaらは骨髄腫とMGUS患者の骨髄のMVDを酵素抗体法で解析し、病勢との関連を検討した。その結果、BM-MVD、骨髄腫細胞のlabelling index、病勢(active MM, inactive MM, MGUS)に有意な相関を認めており、MVDが高い症例はlabelling indexが高く予後不良であると報告した(48)。VEGF・bFGF・HGFが骨髄腫患者で高値であるという報告もあり、特にストローマ細胞や血管内皮細胞から発現されるVEGFは骨髄腫患者の骨髄における血管新生に重大であると考えられている。更に最近骨髄腫細胞株からのVEGF産生が報告され、骨髄腫の生存に重要なIL-6がVEGFの発現を促進するという報告もある(50)。しかし多発性骨髄腫における

angiopoietinの発現については報告がない。また、患者由来の骨髄腫細胞に於ける VEGFやangiopoietinの発現を検討した報告は無い。

#### 5)-9 一酸化窒素と血管新生

一酸化窒素 nitric oxide (NO)はフリーラジカルの性質を持ったガス状物質で神経伝達物質・血管拡張因子として細胞間の情報伝達に参与する。NOと酸素或いはスーパーオキシド( $O_2^-$ )との反応によって窒素酸化物( $NO_x$ )が産生されると細胞にDNA傷害が生じ発癌に関わる。血管に置いてNOは血管トーンスを調節し血流量を規定する他に、血管のリモデリング、動脈硬化の発症進展に重要な役割を果たしている(51)。

NOは一酸化窒素合成酵素(NOS)によってL-アルギニンのグアニジノ基と分子状酸素を器質として精製される。NOSは発現様式や誘導因子などで数種のアイソフォームに分けられる。細胞内にcalmodulinと  $Ca^{2+}$ 依存性に常に構成的に存在する constitutive NOS (cNOS)と誘導因子によって発現しcalmodulinと  $Ca^{2+}$ 非依存性inducible NOS (iNOS) である。また、cNOSは主に血管内皮細胞に存在する血管内皮型NOS (eNOS)と神経組織の他に骨格筋腎臓の緻密斑・肺上皮細胞・膵 $\beta$ 細胞に存在する神経型NOS (nNOS)との二つに大別される。iNOSはマクロファージや肝臓の実質細胞・血管平滑筋細胞・中枢神経系のグリア細胞・好中球・T-リンパ球等に存在することが知られている(51)。通常は酵素活性は認められないが、細胞がサイトカインや最近

のリポ蛋白などの刺激を受けると酵素やタンパク質が誘導され大量のNOが一過性に産生される。

NOは感染・炎症・免疫反応のメディエーターとして働く他にアポトーシスの制御や発癌にも関わり、神経系・循環器系の情報伝達に働く。腫瘍に於いてNOは血管内皮細胞・腫瘍に浸潤した炎症細胞・或いは腫瘍細胞自身に発現し血管拡張因子として血流の増加や血管透過性亢進に働く。また、腫瘍に於けるVEGFの発現を高める作用を有する(52)と共に、VEGFの下流のシグナルとしても働き(53)、血管内皮細胞の増殖を行う。

#### 5)-10 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (図1)

NOSの基質はL-アルギニンであるが、その誘導体がNOSの阻害活性を有することが確認されている。NOS阻害剤、N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)は、エンドトキシンショックモデルの重篤な血圧低下に対し有効性が報告されている(54)。またNOは血管内皮細胞の生存、走化性や血管新生を抑制する(55, 56)ことから、腫瘍に於ける血管新生に対しても効果がある可能性がある。

#### 5)-11 本研究の目的

血管新生因子と骨髄腫の病態への関与についての報告は認められるものの、骨髄腫細胞からのこれらの直接の産生を証明した報告はない。また、L-NAMEは血

管新生を抑制することで抗腫瘍効果も有する (57)と言われており、実際にGalloらはL-NAMEが血管新生抑制によりヒト頭頸部腫瘍細胞の *in vitro* での増殖を抑制する事を報告し (58)、乳癌モデル動物モデルで同様の報告もある (59)。しかしながら多発性骨髄腫の様な造血器腫瘍におけるL-NAMEの有効性を証明した報告は今までに認められない。

我々は、骨髄腫患者の骨髄、末梢血、胸壁腫瘤等から骨髄腫細胞を純化する方法を見だし、純化した骨髄腫細胞からRT-PCRと免疫染色によりVEGF、angiopoietinの発現を確認し、患者の臨床病態との検討を行った。更に今回我々は、化学療法耐性となった患者の胸水より樹立したヒト骨髄腫細胞株KHM-4 (60)をSCIDマウスの皮下に継代し、腫瘍血管が豊富な形質細胞腫モデルマウスを作成した。マウスモデルに対しNOS阻害剤L-NAMEを投与することで腫瘍血管の退縮に伴う腫瘍増殖の抑制が可能であるか検討した。

## 6) 実験方法

### 6)-1 実験に使用した細胞

ヒト多発性骨髄腫細胞株KHM-1B (61), KHM-4 (60)及びKHM-11 (62)は我々の研究室で樹立した。今回マウス皮下での*in vivo*継代を行ったヒト多発性骨髄腫細胞株KHM-4 は当院に於いて化学療法耐性化した骨髄腫患者胸水から樹立された。

ヒト骨髄腫細胞株, KMS-12-PEとKMS-12-BMは川崎医科大学衛生学, 大槻剛巳先生が同一患者の胸水と骨髄から樹立されたものを御供与頂いた(63)。他のヒト骨髄腫細胞株 U266, RPMI8226, ARH-77及びヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562, ヒトT細胞性リンパ腫細胞株 Jurkat, ヒト急性T細胞性リンパ芽球性白血病細胞株 CEM, ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2は Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd. (東京)から得た。以上の細胞株はRPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)(10%ウシ胎児血清 (Sigma), 0.1 mg/ml kanamycin (Meiji Co., LTD., 東京) 及び 100 U/ml penicillin G (Banyu Pharmaceutical Co., LTD., 東京)を添加したもので 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 湿度100%で維持した。

ヒト血管内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) は BioWhittaker Inc. (Walkersville, MD, USA)から得, EGM-2培地 (BioWhittaker)(hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, アスコルビン酸, ヘパリン, FBS, hEGF, Amphotericin B, gentamicin添加) を用い 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 湿度100%で培養した。

## 6)-2 対象症例

今回の研究で検討した症例は熊本大学第二内科，国立熊本病院血液内科，熊本赤十字病院内科から，臨床診断基準(今村の診断基準，表1)(64)に基づいて多発性骨髄腫もしくはmonoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS)と診断された症例である。その内訳は31症例の多発性骨髄腫患者(女性16, 男性15), MGUS2症例，肺膿瘍に伴う骨髄の反応性形質細胞増多症症例 1 例である。一部の症例では複数回サンプリングした症例があり，34患者から合計39検体を得た。

## 6)-3 試薬，マウス

Paclitaxel, melphalan, doxorubicin及びL-NAME はそれぞれ Bristol-Myers Squibb Co. (New York, NY), Glaxo Smith Kline (Uxbridge, UK), Kyowa Hakko Kogyo Co, LTD. (東京) Chemical Dojin (熊本)から得た。

6週齢メスのCB17/lcr-SCIDマウスは日本クレア(東京)より得，滅菌餌，滅菌水を用いて12時間の明/暗サイクル下で熊本大学動物資源開発研究センター (Center for Animal Resources Development (CARD) of Kumamoto University)内で飼育した。

## 6)-4 患者骨髄腫細胞，MGUS，反応性形質細胞増多症形質細胞の純化

上記患者及び健常人から，抗凝固剤としてヘパリンを使用して骨髄，末梢

血，胸水を採取，Ficoll液 (Invitrogen Life Technologies, Inc. Gland Island, NY, USA)を用いて密度勾配遠心法で末梢血単核細胞を分離した。骨髓腫細胞及び形質細胞は Stem Sep™ (Stem cell Technologies Inc., Vancouver, Canada)を用いたnegative selectionで純化した。即ち，単核細胞を抗CD3, CD4, CD14, CD19, CD66b, glycophorin A抗体を含む抗体カクテルとCD2結合磁気ビーズ(Dynabeads™ M-450 CD; Dynal, Oslo, Norway)に反応させた後，Magnetic colloidと反応させ，磁気カラムを通して磁場にトラップされなかった細胞を回収した。

骨髓腫細胞の純度は サイトスピン標本によるMay-Giemsa 染色により形態を観察観察し，抗ヒトアルカリフォスファターゼ標識ヒトkappa抗体 (Sigma, St Louis, MO, USA)またはアルカリフォスファターゼ標識ヒトlamda (Sigma) 抗体と反応させた後，アルカリフォスファターゼ基質(promega, Madison, WI, USA)を用いて検出する免疫染色で確認した。また十分細胞数のある症例では骨髓腫細胞で強発現する抗ヒトCD38抗体と抗ヒトCD138抗体(Sigma)を一次抗体，抗マウスIgG-FITC(ICN, Pharmaceuticals, Inc, OH, USA)を二次抗体とし，EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA)で検出するFlow-cytometry analysisでも確認した。細胞のviabilityはtrypan blue dye extract methodで確認した。

#### 6)-5 逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

細胞株および純化した骨髓腫細胞より，TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Gland Island, NY, USA) を用いてtotal RNAを抽出し，1.0 mgのRNAから Superscript Preamplification System (Invitrogen) と oligo dT primers (Invitrogen)を用いて逆転写反応

を行いcDNAを合成した。得られたcDNAsから Taq DNA polymerase (Invitrogen)と表2に示したプライマーを用いてPCRを行った。尚、VEGF<sub>121</sub>とVEGF<sub>165</sub>は同じ遺伝子からalternative splicingによって得られるアイソフォームであり、1セットのプライマーからVEGF<sub>121</sub>とVEGF<sub>165</sub>の両方のPCR産物を408及び504 base paireのバンドとして検出できるよう設定した。PCRはGeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Foster City, CA, USA)を用い以下の条件で行った。

#### 反応液組成

1x PCR buffer  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM each primer  
0.1 mM each dNTP  
2U Taq DNA polymerase

#### 反応条件

94° C 5 min. 1 cycle  
94° C 50 sec.  
58° C 50 sec.  
72° C 2 min. 35 cycles  
72° C 4 min. 1 cycle

## 6)-6 細胞株及び患者由来純化骨髄腫細胞の免疫染色

免疫染色は LSAB Kit (DAKO Co., Carpinteria, CA, USA) を用いAvidin-biotin法によって行った(65)。細胞株及び純化した患者由来骨髄腫細胞は3-Aminopropyltriethoxysilaneでコートしたスライドガラスに300rpm, 5分の遠心操作を行いサイトスピンを作成, 十分に乾燥した後100%アセトン(Wako pure chemical Industries, LTD., 大阪)で-20°Cで10分間固定した。3% hydrogen peroxide と bovine serum albuminに反応させた後, 一次抗体としてポリクローナル抗iNOS抗血清 (BioReagents, Inc, Golden, CO, USA) 及び抗ヒト VEGF<sub>165</sub>ポリクローナル抗体 (Neomarkers, Fremont, CA, USA) とangiopoietin-2 (KM202 (43) 熊本大学脳神経外科森岡基浩先生から供与頂いた)にそれぞれ反応させ, コントロール抗体としてウサギポリクローナルIgG (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL) を用いた。2次抗体としてビオチン化抗ウサギ-ヤギ免疫グロブリンを用いた。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼで発色後, 以上のステップのWashing Bufferとしては20mM Tris-Hcl(PH8.0)/150mM Nacl液を用いた。更にヘマトキシリン (Muto, LTD., 東京)で10分間後染色を行い, 4% ammonia water (Nakarai Tesque., 東京)で後固定を行ったのちマウントし(mounting medium, Dako), 光学顕微鏡(CX40, Olympus Optical Co, LTD., 東京)で顕鏡した。

#### 6)-7 ELISA法によるVEGFの測定

純化した患者由来骨髄腫細胞および細胞株を $1 \times 10^4$  /mlに調製し、10%ウシ胎児血清含有RPMI1640で72時間培養した。培養上清を回収し測定まで $-80^\circ\text{C}$ で保存した。また、後述のマウス腫瘍組織のlysateは $-80^\circ\text{C}$ に保存した。3.5mg/mlのlysate内マウス及びヒトVEGFレベルをマウス及びヒトsolid-phase VEGF immunoassay kits (R & D systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。マウスモノクローナルVEGF<sub>165</sub>抗体でコートしたマイクロプレートにcell lysate, 細胞培養上清等を反応させた後 horseradish peroxidase標識ポリクローナル抗VEGF抗体と反応, hydrogen peroxidaseと chromogen (tetramethylbenzidine) で発色後, マイクロプレートリーダー(V max, Molecular Device Inc,札幌)で570~400nmで測定した。

#### 6)-8 マウスにおけるヒト骨髄腫細胞株KHM-4の継代

化学療法耐性の多発性骨髄腫モデルマウスを作成するために、多剤併用療法耐性患者由来の骨髄腫細胞株KHM-4 ( $1 \times 10^7$  / 0.1 ml PBS) を5匹のCB17/lcr-SCIDマウス左背部に皮下注射したところ、3ヶ月後5匹中1匹のみ腫瘍を形成していた。このマウスをsacrificeし腫瘍を摘出、5 mm x 5 mm x 7 mmの腫瘍片として新たに10匹のCB17/lcr-SCIDマウスに移植した。3ヶ月後には10匹中3匹に腫瘍を形成し、その中で最大の腫瘍を形成したマウスをsacrificeして別の10匹のマウスに移植した。3世代目では10匹中8匹に腫瘍を形成し、以後同様に腫瘍片の継代を定期的に行った。3ヶ月後10匹すべてに腫瘍の形成を認め、最大のものを次世代への移植に用いた。4世代

目からは腫瘍の生着，腫瘍形成は100%となり，今回の実験には11世代目のマウスを用いた。

#### 6)-9 マウスに対する試薬投与方法

Paclitaxel及びdoxorubicin は生理食塩水に溶解し，melphalanは添付された溶解液に溶解したのち生理食塩水で希釈した。Paclitaxel 10 mg/kg/day，melphalan 0.6 mg/kg/day，doxorubicin 1.5 mg/kg/dayを3日間投与した。いずれの投与量も既報による50% lethal dose ( $LD_{50}$ )の1/6とした。(66-68)この投与量で各群4匹ずつのCB17/lcr-SCIDマウスに投与したが，体重減少や検出可能な行動異常は認められなかった。L-NAMEは5匹の腫瘍片を移植したKHM-miceに4.8 g/kg/day投与したところ，いずれも2～10日で死亡したがこれはおそらく毒性によるものと考えられた。従って，Jadeskyらが使用している1.2 g/kg/day(59)を採用する事とした。この投与量ではマウスは検出可能な行動異常を認めなかった。腫瘍片の皮下移植手術後14日たち，腫瘍の生着を確認した後paclitaxel, melphalan, doxorubicinを3日間，L-NAMEは14日間投与した(59)。腫瘍のサイズは一日置きに腫瘍片移植日から実験終了日まで測定した。

初回投与から7日目に各群1匹ずつのマウスをsacrificeして免疫染色に用いた。その際の各群の腫瘍サイズはほぼ同等であった。

## 6)-10 マウス腫瘍組織の免疫染色

マウスより摘出した腫瘍組織は液体窒素下で2-methylbutane (Wako pure chemical Industries. Ltd, 大阪) 内で凍結後, O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical CO, Ltd, 東京)内に液体窒素を用いて再度凍結し-80℃に保存した。凍結標本はCryostat (Microm, Walldorf, Germany)で5 mmに薄切, 100 % アセトン(Wako)で-20℃で10分間固定した。

3 % hydrogen peroxide と bovine serum albuminに反応させた後, 血管内皮細胞を検出するために第VIII因子関連抗原ウサギポリクローナル抗体 (DAKO)に反応させた。コントロール抗体としてウサギポリクローナルIgG (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL, USA) を用いた。以後6)-6と同様の方法で免疫染色を行った。

## 6)-11 血管新生の解析

マウス腫瘍組織の血管を測定するために光学顕微鏡でランダムに20視野を選びコンピュータに取り込み, 解析ソフト (Photoshop, Adobe Systems Inc. San Jose, CA, USA)を用いWeidnerらの方法を改変して(69)解析した。赤褐色に染色された血管内皮細胞の範囲と, ヘマトキシリンの青色で染色された腫瘍細胞の核の範囲をイメージアナライザーで定量化してrelative vessels indices (RVI) を次の数式で算出した。

$$\text{RVI} = \text{血管内皮細胞のシグナル (赤色)} / \text{全細胞のシグナル (青色)}$$

更に, RVI 退縮率を以下の数式で算出し比較検討を行った。

$$\% \text{ reduction in RVI} = \text{対象とするマウス視野のRVI} / \text{コントロールマウスの平均 RVI}$$

(n=20)

#### 6)-12 腫瘍組織のヘモグロビン吸光度の測定

腫瘍組織内のヘモグロビン量を測定するためにL-NAMEと生理食塩水を投与したマウスを投与開始後7日目にsacrificeした。腫瘍組織を摘出後Cell lysateを0.5% NP-40含有 PBSで溶解して採取し、蛋白濃度をBCA protein assay kit(Pierce, IL, USA)で測定し、3.5mg/mlの腫瘍lyasteに対しヘモグロビン吸高度をUV-スペクトロメーター(Shimadzu Co., 京都)を用い540 nm下で測定した。

#### 6)-13 マウス末梢血ヘモグロビン濃度の測定

マウス末梢血はL-NAMEと生理食塩水を投与開始後7日目に、眼静脈よりヘマトクリット毛細管(Drummond Scuentific Co., PA, USA)で採取し、micro cell counter (Sysmex Co., 神戸)で測定した。

#### 6)-14 統計処理

VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, Ang2と患者サンプル採取時からの骨髄腫患者の予後はKaplan Myer 解析で行った(HyperCaplan Ver 3.6, Macintosh Edition)。Cell lysates中ヘモグロビン吸光度・末梢血ヘモグロビン濃度はStudent's-*t* test, 腫瘍組織中のVEGF濃度の検討はWilcoxon's signed-ranks test を用いて行った。解析ソフトとして, StatView

Ver 4.5 (Macintosh Edition)を用いた。

## 7) 実験結果

### 7)-1 症例の内訳

31症例の多発性骨髄腫患者の骨髄・胸水・胸壁腫瘤(女性16, 男性15), MGUS2症例, 肺膿瘍に伴う骨髄の反応性形質細胞増多症症例 1 例の骨髄から形質細胞を純化した。一部の症例では複数回サンプリングした症例があり, 34患者から合計39検体を得た。うち骨髄腫患者の特徴を表3に示す。

### 7)-2 骨髄腫細胞の純度

形態上図3に示すように純化した骨髄腫細胞は, サイトスピンのMay-Giemsa円色では大小不同かつ時に多核, 核形不整, 核網が繊細で核小体を有するやや大型な細胞で, 時に細胞質に空胞を伴い核周明庭を伴う典型的な形質細胞であった。

造血器細胞はCD38を殆どが発現するが発現程度が低く, 骨髄腫細胞では強発現する。また, CD138も骨髄腫細胞で特異的に発現している。純化した代表例のフローサイトメトリーでこれらはほぼ100%陽性であった(図3)。また, 特異的なポリクローナルに $\kappa$ 及び $\lambda$ が染色された(data not shown)。

骨髄腫細胞の純度は純化後細胞のサイトスピン標本による形態観察では98%以上であった。細胞のviabilityはtrypan blue dye extract methodで調べたところ常に96%以上であった。

### 7)-3 骨髄腫細胞に於けるVEGFの発現

すべての多発性骨髄腫細胞株でRT-PCRによりVEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>の発現を認められた(図4-A)。いずれのアイソフォームも骨髄腫細胞株のみならず他の細胞株でも発現を認め、VEGFの発現は細胞株では骨髄腫に特異的な現象ではなかった。患者由来の骨髄腫細胞では、代表例を図4-Bに示すとおり、36サンプル中VEGF<sub>121</sub>は30サンプルに、VEGF<sub>165</sub>は22サンプルにRT-PCRで発現を認め(図4-B)、MGUSやreactive plasmacytosisの症例サンプルから得た形質細胞のRT-PCRではVEGFの発現を認めなかった(図4-C)。

細胞株で培養上清中のVEGF<sub>165</sub>の産生をELISA法で調べたところ、種々のレベルで産生していることが確認された(図5)。更にこれらの骨髄腫細胞株やRT-PCRでVEGF165のmRNAの発現を確認した症例では、代表例を図6に示すように、抗VEGF抗体による免疫染色で細胞質内にVEGFを発現していた(図6)。

### 7)-4 骨髄腫細胞に於けるangiopoietin-2の発現

Angiopoietin-2のmRNAの発現は8種の骨髄腫細胞株のうち7種に認められた。また、骨髄腫以外の細胞株では5種類のうち4種類に発現を認めた(図4-A)。純化した多発性骨髄腫患者由来骨髄腫細胞では36サンプル中27サンプルにAng2の発現を認めた(図4-B)。VEGF<sub>165</sub>とAng2の共発現はRT-PCRでは多発性骨髄腫症例では

18サンプルに認められた。Ang1のmRNAの発現は症例では1例も認められなかったが細胞株では1種にのみ発現を認めた(図4-A, B)。MGUS症例及びreactive plasmacytosis症例の形質細胞でもAng2のmRNAは低いレベルではあるが発現していた(図4-C)。

Ang1, Ang2共通の受容体であるTie-2は細胞株でも, 患者由来腫瘍細胞でも発現を認めなかった。細胞株および患者サンプルの抗Ang2抗体(KM202)による免疫染色では, 細胞質内にVEGFと同様にAng2が発現していた(図6)。

#### 7)-5 血管新生因子と骨髄腫の予後

VEGF<sub>165</sub>とAng-2は腫瘍血管新生を促進することから, VEGF<sub>165</sub>およびAng-2の発現は予後に影響すると考えられた。そのため, 我々はVEGFおよびAng-2の予後因子としての解析を行った。VEGF<sub>121</sub>は予後との明らかな相関関係を認めなかった( $p=0.913$ , Cox-Mantel test)。しかしながらVEGF<sub>121</sub>のmRNAを検出した症例( $n=30$ )のうち, VEGF<sub>165</sub>のmRNAを発現している症例( $n=22$ )は, VEGF<sub>121</sub>のみ発現している症例( $n=8$ )に比較して有意に予後不良であった( $p<0.01$ , Cox-Mantel test, 図7-A)。Ang2の発現している症例も同様に予後不良であった( $p<0.05$ , Cox-Mantel test, 図7-B)。以上のように血管新生因子の腫瘍細胞からのmRNAの発現, 特にVEGF<sub>165</sub>の発現は予後不良因子であった。血管新生因子の発現は予後不良であり, 血管新生抑制療法の有効性が期待された。そこで, 我々はヒト骨髄腫細胞株をSCIDマウスに継代し, 血管新生抑制作用が期待されるNOS阻害剤の投与を試みた。

#### 7)-6 骨髄腫細胞株KHM-4及びKHM-4マウスの特徴

図8-AにKHM-4マウス皮下に10世代継代した腫瘍組織を摘出し、採取した腫瘍細胞の形態を示す。マウスから採取した細胞はオリジナルの細胞株KHM-4と同様に、直径18~40 μmで球形を呈し、大型の核と核周明庭を有する典型的な骨髄腫細胞であった。この細胞は免疫染色でヒトVEGF<sub>165</sub>ポリクローナル抗体で、細胞質内にVEGF<sub>165</sub>を検出された(図8-Bおよび-C)。また、同様に細胞質内にiNOSを強く発現していた(図8-D)。マウスから摘出した腫瘍は血管新生が豊富であった(図8-E)。ヒト細胞株KHM-4はVEGF<sub>165</sub>の産生が強く、樹立されたKHM-4細胞では $1.0 \times 10^5$ の細胞を*in vitro*で72時間培養した時の培養上清中VEGF<sub>165</sub>の濃度は~400 pg/ml VEGFであったが、マウス皮下に*in vivo*継代を開始して5世代目の腫瘍細胞は同じ培養条件で~800 pg/mlのVEGFを検出した(図5)。従って我々はKHM-4細胞の腫瘍形成、血管新生誘導能の獲得はVEGF産生能が関与していると考えた。図8-Fに示すように、KHM-4マウス腫瘍は組織学的に多くの血管を含んでいる。実際に、腫瘍の血管内皮細胞を抗第VIII因子関連抗原抗体で免疫染色を行ったところ、KHM-4腫瘍は多くの血管を認めた。

#### 7)-7 L-NAMEによる腫瘍増殖の抑制

11世代目のマウスは腫瘍片の移植手術後、組織片が生着し増大しはじめる14

日目より薬剤投与を開始した。コントロール(生理食塩水投与)マウス, doxorubicin (1.5 mg/kg/day)及びmelphalan (0.6 mg/kg/day)投与マウスは腫瘍が増大し移植手術から約65日目に死亡した(図9)。腫瘍を移植されたマウスの死因は腫瘍死であった。

paclitaxel (10 mg/kg/day)を投与したマウスは約40日目までは腫瘍の増大を認めなかったが, 40日以後著明な増大を認めた。より投与量を増やした場合, doxorubicin (2.7 mg/kg/day), melphalan (2.0 mg/kg/day)ともに腫瘍サイズの縮小は認められず, 薬剤の毒性によりマウスが数日以内に死亡した。それに対して, L-NAME (1.2 g/kg/day)を投与したマウスは移植後65日目まで腫瘍の増大を殆ど認めず, 死亡したマウスも認められなかった。以上からL-NAMEは有効な抗腫瘍効果を有すと考えられた。

#### 7)-8 L-NAMEによるマウス血管新生の抑制

我々はL-NAMEのマウスの腫瘍を抑制した作用は, 血管新生抑制作用によるものではないかと考え, 血管新生について検討した。光学顕微鏡下でコントロール及びdoxorubicinを投与したマウスから摘出した腫瘍は血管新生が豊富であった(図10-AおよびC)。melphalanを投与したマウスの腫瘍は中程度の血管新生抑制を認めた(図10-D)。それに対して, L-NAME(図10-B)とpaclitaxel (図10-E)を投与したマウスから摘出した腫瘍内には新生血管を殆ど認めず, 血管新生が抑制された。抗第VIII因子関連抗原ポリクローナル抗体はマウス及びヒトにクロスリンクする抗体であったため, ヒト特異的な抗ヒトCD34モノクローナル抗体でも免疫染色を行ったが, 図11に示す様に染まらず, 継代されているKHM-4細胞によるマウス腫瘍内血管はマウス由来である事が明確であった。

次に我々は、L-NAMEによる血管新生抑制を定量するために、各群のマウスから摘出した腫瘍を抗第VIII因子関連抗原ポリクローナル抗体で免疫染色した標本を顕微鏡下でランダムに選択し、% reduction in relative vessels index (RVI; 相対血管密度百分率)を算出した。新生血管の縮小はpaclitaxel或いはL-NAMEを投与したマウスで著明であったが doxorubicin或いはmelphalanを投与したマウスは、軽度の血管新生抑制を認めるのみであった(図12-A)。以上の方法はブラインドで視野を選択するため腫瘍の壊死部分含み正確なRVIは算出できないと考えて、腫瘍内の非壊死部のみをランダムに選択し同様の解析を行った。図12-Bに示す様にL-NAMEを投与したマウスは著明に血管新生が抑制され、paclitaxelを投与したマウスもdoxorubicine, melphalan投与マウスに比べて血管新生が抑制されていた。

更に別の方法で微小血管新生の抑制を調べるために、我々はL-NAMEを投与した腫瘍組織(n=12)のlysatesのヘモグロビン濃度を測定した。L-NAMEを投与したマウスから得られた腫瘍組織片のlysateでは生理食塩水を投与したマウスに比較して有意にヘモグロビン量は低かった(図13)。薬剤投与により貧血が生じ腫瘍組織内のヘモグロビン量に影響した可能性を考慮し、マウス血中ヘモグロビン濃度を測定したが、L-NAME投与マウス群(n = 7; mean = 15.2 ± 1.0 g/dl)と生理食塩水投与マウス群(n = 7, mean = 15.2 ± 1.1 g/dl)で、末梢血液中ヘモグロビン量には差を認めなかった。(p = 0.981; Student's-t test)以上より腫瘍組織のlysate中のヘモグロビンレベルは腫瘍組織内の血液含有量を反映していると考えられた。

## 7)-9 L-NAMEによるVEGF産生の抑制

L-NAMEによるKHM-4腫瘍の減少はL-NAMEがKHM-4からのVEGF産生を阻害するためによる可能性を考え、L-NAMEが *in vitro* で KHM-4 由来のヒトVEGFを抑制するかを検討した。最高 5 mMのL-NAMEでもKHM-4細胞の増殖や培養上清中のVEGF産生には影響しなかった。一方 *in vivo* の検討ではL-NAMEを投与したマウスの腫瘍組織片(n=12)のlysates中のヒトVEGF量は $81.6 \pm 24.2$  pg/mlであるのに対し、生理食塩水を投与したマウスの腫瘍組織片(n=12)のlysates中のヒトVEGF量は $179.3 \pm 51.6$  pg/mlであり、有意に低かった( $p = 0.002$ ; Wilcoxon's signed-ranks test, 図14-A)。これは、KHM-4の縮小により、腫瘍から産生されるVEGFが減少したためと考えられたが、一方L-NAMEが *in vivo* で何らかの機序でヒトVEGFのKHM-4からの産生を抑制した可能性は否定できない。

更に我々はマウスのVEGF濃度についても検討した。図14-Bに示す様に、L-NAMEを投与したマウスの腫瘍組織片内(n=12)のマウスVEGFは $(20.0 \pm 9.0$  pg/ml)であるのに対し、生理食塩水を投与したマウスから得られた腫瘍組織片内(n=12)のマウスVEGFは $(38.9 \pm 7.11$  pg/ml)と、これも有意にL-NAMEを投与したマウスで低かった。 $(p = 0.003$ ; Wilcoxon's signed-ranks test)以上のことからL-NAMEはマウスの血管内皮細胞由来のVEGFの産生を抑制していた。

## 8) 考察

### 8)-1 多発性骨髄腫におけるVEGFおよびangiopoirtin-2の発現

多発性骨髄腫の生存期間がauto-PBSCT導入後、数ヶ月～数年延長されるようになったとはいえ、治癒する症例は殆どなく移植後も早晩悪化をみる。移植後の再発、再増悪例に対しての治療は困難を極める。1950年代に鎮静薬として開発されたthalidomideは、1990年代になり抗炎症作用、免疫調節作用を有しており自己免疫疾患に有効であるという報告が相次いだ。Folkmanらはウサギに対しthalidomideを用い、強い血管新生抑制作用を有すと報告し血管に依存する疾患、特に腫瘍性疾患の治療薬としてのthalidomideの有用性を示唆し(14)、Bauerらはthalidomideの血管新生抑制効果はヒト組織にも認められると報告した(70)。一方多発性骨髄腫の分野では、患者に対しthalidomideが有効であることは偶然内服していた患者への効果から知られていた(71)。現在では日本では未認可であるが、国外では骨髄腫に対する一般的な治療として臨床的に用いられ、有効性が報告され(72)るとともに、投与量や投与方法等に多施設で様々な検討がなされている。更に、Tosiら(73)やBarlogieら(74)は、進行し多剤耐性化した骨髄腫患者例や大量化学療法後の再発症例に対しでthalidomideが著効したという報告をしている。

最近になり骨髄内の血管新生が骨髄腫の病態に関与しており、(48) Plasma cell labeling index (LI)は骨髄腫とMGUSやくすぶり型骨髄腫との鑑別に有効と考えられ(75)、LIが高い事と骨髄内のMVDが高い事が骨髄腫の予後不良因子であることが報告された(76)。以上の様な事からthalidomideの効果は血管新生抑制によるものであらうと

考えられ、腫瘍に於ける血管増生を抑制することが骨髄腫の治療に有効であろうという報告が相次いでいる。(77, 78) 更に多発性骨髄腫患者の血清でVEGFレベルが高いことも報告されており(79), VEGF, bFGF及びHGFの血清での高値が骨髄腫患者に於ける予後不良因子であるという報告もある。(50, 80)しかしながら、骨髄腫に於けるVEGF産生のメカニズムについては今までに報告を認めなかった。また、angiopoietinに関しては骨髄腫では今まで検討されたことがなかった。我々はVEGF<sub>165</sub>とAng2を骨髄腫患者の腫瘍細胞直接産生していることを、純化した患者由来の骨髄腫細胞から初めて報告した。

Angiopoietin-2は血管の形成に於ける初期の調節因子であり、VEGF<sub>165</sub>が過剰な状態で血管内皮細胞の発芽を引き起こす(42)。VEGFの存在下でAng-2は毛細血管径を拡張したり血管基底膜のリモデリングや血管内皮細胞の増殖・走化性の亢進に働き新しい血管を形成するのに役立つ(81), 更にAng-2はVEGF<sub>165</sub>と相乗的な効果を有し腫瘍の低酸素状態の部分で新しい血管を育てる働きがあると報告されている(82, 83)。我々の解析ではVEGF<sub>165</sub>とAng-2は35検体中18検体(51%)に共発現していた。

このことからVEGF<sub>165</sub>とAng-2の共発現は骨髄腫にとって稀な現象ではなく、血管新生がこれらの因子によって制御されていると考えられる。しかしながら我々の施設では、骨髄生検が一般に骨髄腫診断に必須でなく、患者にとってより侵襲的であるため限られた症例にしか施行しておらず、生検組織による骨髄のMVDを個々の症例で検討していない。このため、VEGF<sub>165</sub>とAng-2の発現が*in vivo*で直接血管新生に相関しているかどうかについての解析は施行できていない。生検組織を得る機会があれば、これらの血管新生因子の腫瘍細胞からの発現と骨髄内の血管量についての検

討を行いたい。

#### 8)-2 多発性骨髄腫におけるVEGF, angiopoietin-2発現の意義

骨髄腫患者由来の骨髄腫細胞では、RT-PCRでVEGF<sub>121</sub>は36サンプル中30サンプルに、VEGF<sub>165</sub>は22サンプルに発現を認め、Ang-2は26例に発現していた。それに対し、我々の検討したMGUS2例は、VEGF<sub>121</sub>とVEGF<sub>165</sub>のいずれも発現していなかったが低レベルのAng-2のmRNAを発現していた。反応性形質細胞増多症の1例はVEGFもAng-2も発現していなかった。VEGFはMGUSの患者由来の形質細胞でも反応性形質細胞増多症の形質細胞でも発現を認めず、VEGFは悪性化した形質細胞にの増殖・浸潤により重要なサイトカインであると考えられた。このことから、MGUSや反応性形質細胞増多症の形質細胞に比べて骨髄腫細胞は細胞の増殖が早く血管新生能がより必要で、VEGFにより血管増生が生じる事が骨髄腫細胞の増殖に必要であると考えられた。より多くのケースで良性形質細胞についての解析が必要であると考えられる。

#### 8)-3 VEGF, angiopoietin-2発現と予後

前立腺癌(84-86)・大腸直腸癌・肺癌などで腫瘍のVEGFの発現が予後因子であるという報告がある。今回の我々の検討では、Kaplan-Myer analysisではVEGF<sub>165</sub>或いはAng-2を発現している症例が予後が悪い傾向があった。一般にVEGF<sub>165</sub>または

Ang-2は血管新生を促し腫瘍増殖や浸潤に作用することと、今回の結果より、骨髄腫に於いても予後不良に影響すると考えられた。VEGF<sub>165</sub>またはAng-2はautocrine的に働く増殖因子であるため、骨髄腫細胞に対してもautocrineをしていないかと考え、VEGFの主要な受容体であるFlt-1とKDR/Flk-1の発現をflow cytometryで調べた。しかし、これらの受容体は細胞株でも骨髄腫患者から得られた骨髄腫細胞からも発現を検出しなかった (data not shown)。Ang-1とAng-2共通の受容体であるTie-2もまた、mRNAレベルで発現していなかった (図4-A, B)。このことから腫瘍細胞から産生されるVEGFとAng-2は、骨髄腫細胞にとってはautocrine factorsでなく血管内皮細胞を増殖させることで微小環境をより生存に有利に変える働きを有していると考えられた。

Holashらはマウスの腫瘍モデルに対して、癌細胞を静脈内に注入して転移巣の形成過程を経時的に観察したところ、初期の微小転移層には既存の血管を使用して豊富な血流を獲得したが、転移層が増大するに従って腫瘍血管の内皮細胞にアポトーシスが生じて腫瘍内血管密度が減少し、この間血管新生の所見は認められなかった。その後、更に転移層が増大するに従って腫瘍内の血管はさらに乏しくなり、腫瘍細胞は血管周囲にのみ残存してそれ以外の部位ではアポトーシスに陥ったがその時になって転移層の周辺部に置いて血管新生が生じた。そこで、この現象を血管新生調節因子との関連性で解析したところ、初期の微小転移層に取り込まれた既存の血管の内皮細胞に置いて、VEGFの発現は認められなかったこと、腫瘍が増大すると周辺部に一致してVEGFの発現が認められるようになったことを示した(82)。

細小血管は、内皮細胞をペリサイトが取り囲むことによって成熟した安定な状態を維持する考えられている。ペリサイトが内皮細胞を取り囲むか否かはangiopoietinのバランスによって調節されており、Ang-2の産生が増強するとペリサイトは消退する。ペリサイトの消退した不安定な血管では内皮細胞の生存はVEGFの濃

度に依存すると考えられており、VEGFの発現増強がなければ内皮細胞はアポトーシスに陥るがVEGFの発現が増強すると内皮細胞は生存することができ、更に血管新生に転じると考えられている(図1)。

以上のことから、腫瘍血管の内皮細胞ではAng-2の発現がVEGFの発現する以前の極めて初期から増強する様であり、angiopoietinとVEGFの発現パターンが、腫瘍血管の退縮と新生あるいは腫瘍血管ではペリサイトが欠如するという血管の未熟さと密接に関連している事を示している。今回多発性骨髄腫に於いても初めてAng-2が発現している事を見いだした。また、MGUSの形質細胞でもAng-2が発現していることより、腫瘍性増殖を来していなくても骨髄内で形質細胞が増殖をすることにAng-2が関わっている可能性がある。更にMGUSの患者を長期観察すると17%が10年以内に骨髄腫を発症する(87)。その要因に骨髄内での血管新生能の獲得が関わっているとしたら、もともとAng-2を発現する細胞がある時期からVEGFの発現も認める様になる事も骨髄腫の発症要因となる可能性もある。これらの症例は追跡するとともにより多くの症例についても調べる必要があるであろう。腫瘍血管におけるAng-2の発現増強のメカニズムは今後の検討課題である。

#### 8)-4 VEGF, angiopoietin-2をターゲットとした治療について

上述のthalidomideによる血管新生抑制効果が報告された他にthalidomideアナログの報告(88)があり、TNP-470による抗血管新生療法で転移を抑制したという報告など(89)、血管をターゲットとした骨髄腫の治療の有効性がトピックとなっている。骨髄腫細胞に於ける、VEGFとAng-2の共発現という現象は、最近発展しているVEGFや

そのレセプターに対する中和抗体、VEGFレセプターに対するチロシンキナーゼ阻害剤等(90)やVEGFのシグナルを阻害するhistone deacetylases inhibitors(91)などがある。

また、抗-VEGF受容体療法は既に骨髄腫での有効性の可能性が*in vitro*で報告され(90)、多発性骨髄腫でも試験的に治療に用いられようとしている。更に今回の我々のデータから、Ang-2も骨髄腫の治療の重要なターゲットとなる可能性が考えられる。

#### 8)-5 多発性骨髄腫に対するNOS阻害剤、L-NAMEの効果

我々は以上の事から多発性骨髄腫に対して血管新生が重要でありそれをターゲットとした治療の開発の可能性について考えた。今回我々は、CB17/lcr-SCID マウスに対し、我々の研究室で樹立したヒト骨髄腫細胞株KHM-4 から新しくヒト骨髄腫のマウスモデルを作成し*in vivo*継代に成功した。このモデルマウスは血管に富んだ腫瘤を形成し、皮下継代が可能であるため*in vivo*での抗血管新生療法等の評価に適しており骨髄腫の治療開発に適したマウスであった。そこで我々は血管内皮細胞の生存・遊走・血管新生を抑制するNOS阻害剤、N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), (55-57)を投与した。

今回の我々の実験では、骨髄腫の標準的治療として用いられている抗癌剤、doxorubicin (1.5 mg/kg/day) と melphalan (0.6 mg/kg/day)を投与したマウスは、腫瘍の縮小はわずかであったのに対して、L-NAME (1.2 g/kg/day)を投与したマウスでは明らかに腫瘍サイズが縮小もしくは消失し、またそれにあたり検出可能な毒性は認められなかった。骨髄腫に対しては普段用いられないが、最近血管新生抑制作用が報告されているPaclitaxel (10 mg/kg/day) は、投与から40日間は腫瘍の増殖を抑えたがその後

著明に腫瘍の増殖を来した(図8)。他の薬剤の投与量は各薬剤の LD<sub>50</sub> の1/6を投与量とし、L-NAMEの投与量はJadeskiらの報告に基づいて算出した(59)。投与した各種抗癌剤の量が少なく、L-NAMEに対してのみ十分量の投与を行った可能性を検討するため、より多量の抗癌剤の投与を試み、doxorubicinは2.7 mg/kg/day, paclitaxelは100 mg/kg/dayを各4匹のマウスに投与したが、4匹とも毒性によって死亡したにも関わらず抗腫瘍作用は認められなかった。以上のことから、単に投与量の差によりL-NAMEの効果が強く現れる訳ではないと考えられる。

#### 8)-6 L-NAMEの効果とVEGF抑制について

次に我々はL-NAMEがモデルマウスに於いて腫瘍の退縮を生じた機序について検討した。L-NAMEはヒト細胞株KHM-4細胞に対して *in vitro* で5 mMの濃度で培養しても細胞の増殖抑制効果も認められず、ヒトVEGFの産生を抑制しなかったのに対して、10 mMの濃度では細胞増殖を約30%抑制した(data not shown)。しかしながら、L-NAMEはKHM-4を移植したマウスに於けるヒトVEGFの産生を図14-Aに示すように抑制した。VEGFの産生は主に(i)低酸素刺激やHIF-1によるVEGFの発現誘導(ii)NOの存在,(iii)IL-6の存在,(iv)その他の調節因子、以下の3つの構成によって促進されていると推測される。しかしながらKHM-4細胞はヒトIL-6のmRNAを発現しない細胞株である。L-NAMEはKHM-4細胞のVEGF産生と増殖を*in vitro*で抑制していないという我々のデータは、KHM-4細胞内のNOの存在がVEGF産生や増殖に明らかな作用をしいるわけでは無いという事を示唆できると考えられる。KHM-4細胞は*in vitro*では何らかの機序によりNO依存性が低下する。つまり、KHM-4細胞は*in*

*in vitro*ではVEGF産生にNOを必要としない。しかしながら、*in vivo*ではKHM-4細胞にとってはNO合成はVEGF産生および血管新生に重要であり、NO合成を抑制すると*in vivo*ではVEGF産生と腫瘍増殖を引き起こすのかもしれない。この点は、成人T細胞白血病(ATL)患者由来のHTLV-1に感染した白血病細胞はウイルス由来のメッセージの転写や蛋白の発現は*in vivo*では行わないが*in vitro*で培養すると、同じ白血病細胞がHTLV-1関連蛋白を発現する現象(92)と類似している。その他の可能性として、L-NAMEの投与が直接血管新生を抑制した結果、KHM-4腫瘍が死に至りKHM-4からのVEGFが減少したということもあり得る。

腫瘍組織中のマウスVEGFは、KHM-4を継代したマウスにL-NAMEを投与すると明らかに減少した(図13-B)。マウスVEGFはマウスの血管内皮細胞からNOを介して産生されていると考えられ(93)マウス腫瘍内の血管内皮細胞の増生と腫瘍の進展に働いていると考えられる。L-NAMEのモデルマウスに対する投与によりマウス血管内皮由来のVEGFの産生が抑制されることが、今回認められた血管新生抑制作用の主要な機序であると考えられる。Paclitaxelも血管新生抑制作用が*in vitro*で報告されており(94, 95)、臨床的にもある種の固形腫瘍で血管新生抑制を介する腫瘍への有効性が報告されている。我々は臨床的に、血管新生の強い悪性リンパ腫である免疫芽球形Tリンパ腫AITLの治療抵抗性となった症例に対して、試験的にpacritaxelを併用した化学療法を行っている。数症例の経験では耐性化した症例に対しても有効で、生存期間の延長が期待できると考えられる。多発性骨髄腫に対しては我々はpacritaxelの投与は行っていないが他施設から報告では、固形腫瘍における抗腫瘍作用を元に試験的に投与されている。しかし、paclitaxelによる治療を受けた骨髄腫患者の median survivalが他の治療に比較してより有効であるとは言えない(96, 97)か、またはわずか

な骨髄腫に対する効果を有するのみである。今回の研究ではpaclitaxelを投与したマウスは明らかに腫瘍の増大が抑制され(図9), 腫瘍血管新生の抑制を来した(図10-E, 12および図13)。しかしその効果は実験開始から40日までであった。この結果が, 骨髄腫患者に対して投与した場合に一応の効果を認めるものの生存期間を延長するほどの有効性を認めないことに反影されていると考えられる。doxorubicinあるいはmelphalanを投与したマウスもまた, ごく軽度の抗腫瘍効果で血管新生抑制も軽度であった(図10, 12および図13)。これらの薬剤には血管新生抑制療法は報告されておらず, このわずかな血管新生の抑制はおそらく細胞障害による二次的なものであろうと考えられる。これらの抗癌剤と比較した場合, paclitaxelは血管の退縮が著明に認められており(図10, 図12), 多発性骨髄腫に対しても血管新生を抑制する効果を有していると考えられた。今回の我々のデータからpaclitaxelはL-NAMEやそのアナログと併用することでより強い効果を得る可能性があり, 将来的に治療抵抗性の骨髄腫の治療に応用できる可能性が示唆された。

## 8)-7 今後

骨髄腫細胞が直接血管新生促進物質を産生することが証明された。この事は血管新生が骨髄腫の進展に重要であることのみならず、血管新生を抑える事と同時に腫瘍量を減少させることが重要であることを意味する。また、NOS阻害剤、L-NAMEはヒト骨髄腫細胞株KHM-4のマウスモデルに対して、腫瘍を維持し増殖させる血管の新生を抑制し明らかな腫瘍の退縮を来した。L-NAMEは循環器系の実験も含め様々な動物実験に用いられており、重度の毒性は認められていない。更に他のNOS阻害剤である N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)は敗血症性ショックの患者に対して臨床的に投与されたデータもあり (98), NOS阻害剤の人体への投与は可能であると考えられる。実験的および臨床的NOS阻害剤の投与の確立が多発性骨髄腫の治療の進歩に貢献できると考えられる。また、従来の化学療法との併用によりより以上の効果を期待でき得る可能性があると考えられた。

## 9) 結語

血管をターゲットとする治療は血管の粗密とといった違いにより効果に差が生じる可能性はあるものの、腫瘍の種類を問わずに用いることが可能である。また、今回抗癌剤耐性化した骨髓腫細胞由来の細胞株からなる動物モデルに対して有効であったように、抗癌剤耐性を克服する治療であると考えられる。今後も腫瘍血管をターゲットとした利用の開発、臨床化が骨髓腫のみならず造血器腫瘍全般に利用され、予後の改善に貢献できることを願ってやまない。

## 10) 図表とその説明

表1. 骨髄腫の診断基準 (今村)

---

次の項目の2つ以上が認められなければならない

- (1) 血清中に大量の単クローン性免疫グロブリン(M蛋白)が認められる。

IgG型M成分	>2.0g/dl
IgA型M成分	>1.0g/dl
IgD型, IgE型M成分	>0.2g/dl
  - (2) 尿中に大量(>2.0g/dl)のBJPが認められる。
  - (3) 他に原因となる疾患がなく、血清正常免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)が全て明らかに現象している。
  - (4) 骨髄先生或いは骨髄生検で10%またはそれ以上(細胞200個を算定)の形質細胞増加があり、しかも反応性形質細胞増加症を惹起しうる疾患が存在しないこと。
  - (5) 組織生検(骨髄・髄外腫瘤)で形質細胞の腫瘍性増殖像が認められる。
  - (6) 末梢値に500/mm<sup>3</sup>以上の形質細胞が認められる。
  - (7) 原因不明で骨再生像を伴わない骨融解像、或いは病的骨折が認められる。
-

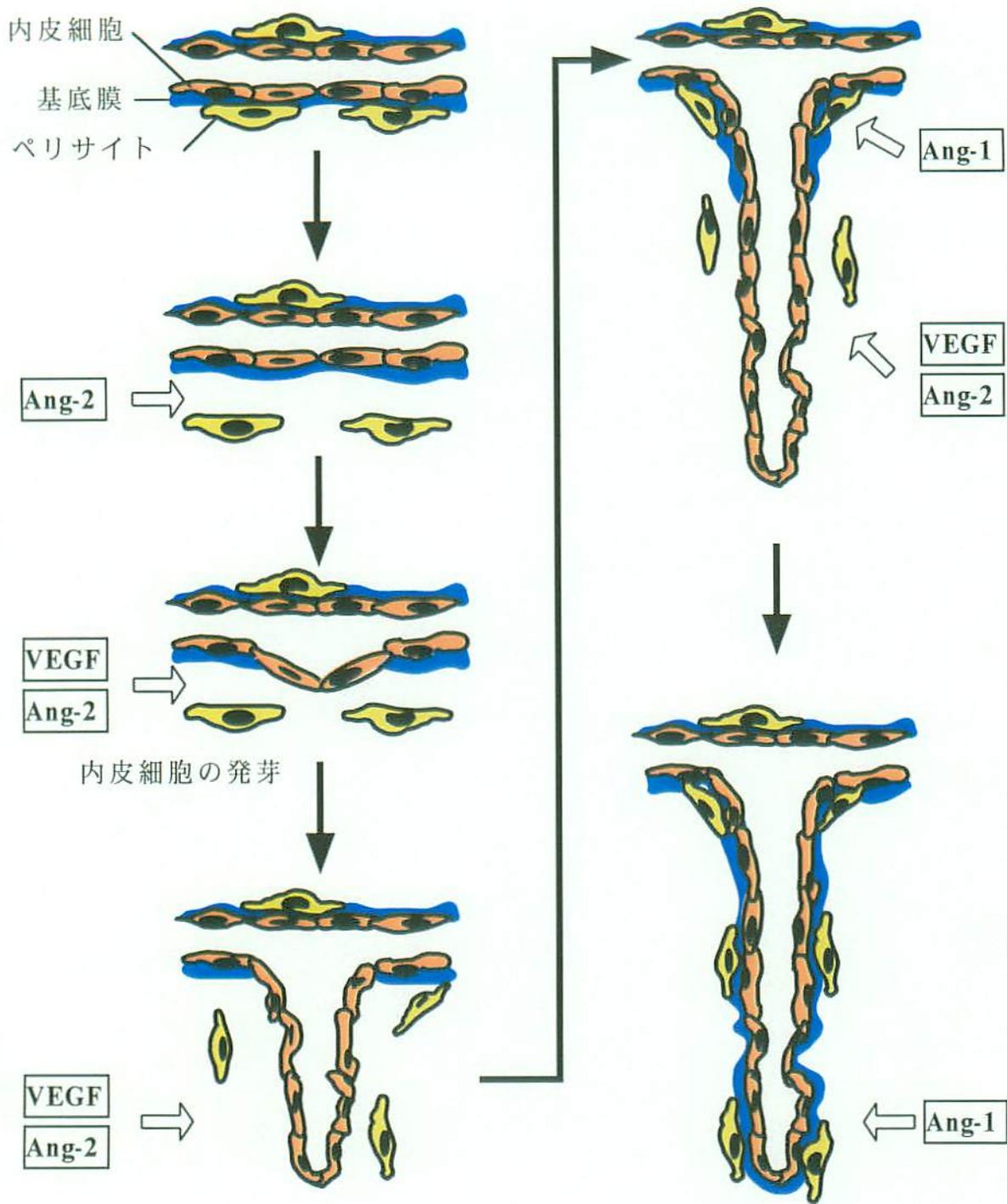


図1. 血管新生のメカニズム

Angiopoietin-2によってペリサイトが内皮細胞より離脱すると、VEGFなどの血管新生因子に反応して活性化内皮細胞由来のプロテアーゼ等が基底膜をはじめとする細胞外マトリックスを分解・消化して血管内皮細胞が発芽する。その後内皮細胞は遊走・増殖を反復し管腔構造を形成する。更に新しい基底膜の形成、angiopoietin-1の作用によるペリサイトの接着による血管の成熟化の過程を経て血管が安定化する。

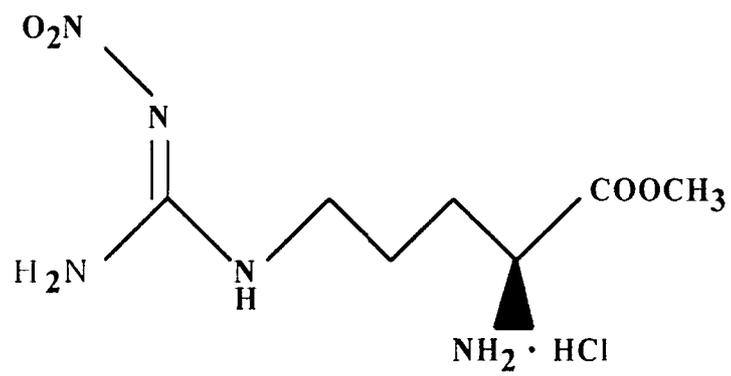


図2. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の構造

表 2. RT-PCR に用いたプライマー

Primers	Sequence (5'-3')	Product size (base pair)
human VEGF <sub>121</sub>		
sense	GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC	408 bp
anti-sense	CGATCGTTCTGTATCAGTCTTTCC	
human VEGF <sub>165</sub>		
sense	GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC	504 bp
anti-sense	CGATCGTTCTGTATCAGTCTTTCC	
human angiopoietin-1		
sense	GAAGCTGCCAGGTGAGAAAC	391 bp
anti-sense	TTCCAAAGGATTATGGCAGG	
human angiopoietin-2		
sense	GGATCTGGGGAGAGAGGAAC	469 bp
anti-sense	CATCTCTGGCAGGAGGAAAG	
human Tie-2		
sense	TACACCTGCCTCATGCTCAG	488 bp
anti-sense	GCAGAGACATCCTTGGAAAGC	
β2-microglobulin		
sense	GAATTGCTATGTGTCTGGGT	408 bp
anti-sense	CATCTTCAAACCTCCATGATG	

VEGF<sub>121</sub> と VEGF<sub>165</sub> は同じ遺伝子から alternative splicing によって得られるアイソフォームであり、1 セットのプライマーから VEGF<sub>121</sub> と VEGF<sub>165</sub> の両方の PCR 産物を 408 及び 504 base pair のバンドとして検出できるよう設定した。

表 3. 患者の臨床的特徴

特徴		患者数
性別	男/女	16/15
平均年齢	(歳)	64.4±10.5
病期		
I	A/B	5/0
II	A/B	8/1
III	A/B	10/4
PCL		3
型		
IgG	(κ/λ)	6/6
IgA	(κ/λ)	4/7
IgD	(κ/λ)	0/1
BJ	(κ/λ)	2/4
NS		1
計		31

PCL: plasma cell leukaemia (形質細胞白血病)

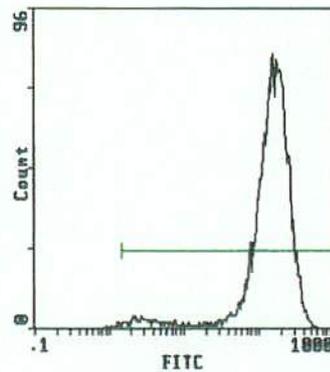
BJ: Bence Jones type(ベンスジョーンズ型骨髄腫)

NS: non-secretory (非分泌型骨髄腫)

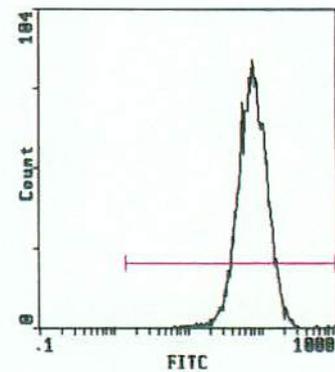
### May-Giemsa染色



### CD138



### CD38



### 図3. 多発性骨髄腫細胞の純化

形態上やや大型な細胞で、大小不同かつ時に多核、核形不整、核網が繊細で核小体を有する。時に細胞質に空胞を伴い、核周明庭を伴う典型的な形質細胞である(400倍)。また、純化した代表例のフローサイトメトリーで骨髄腫細胞で強発現するCD38とCD138が、ほぼ100%陽性であった。

全ての症例で、形態上98%以上の純度を確認した。

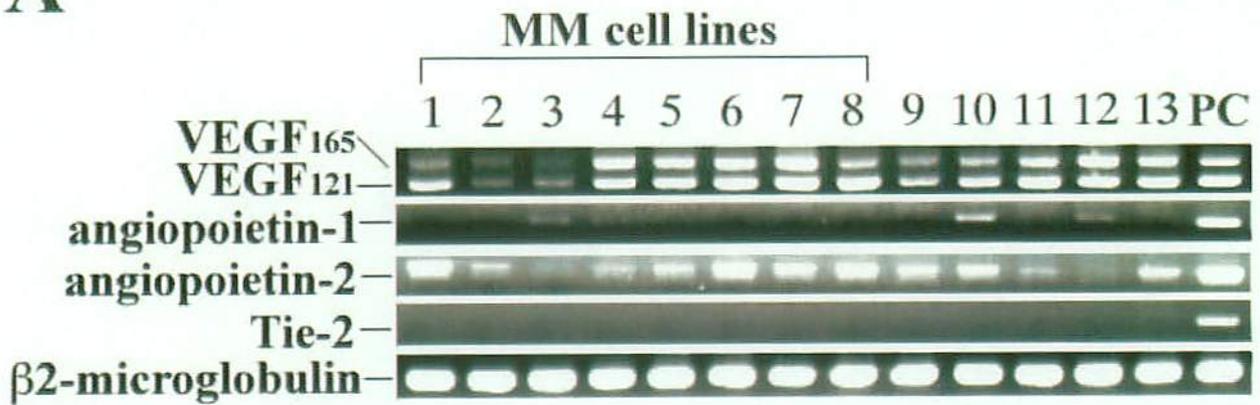
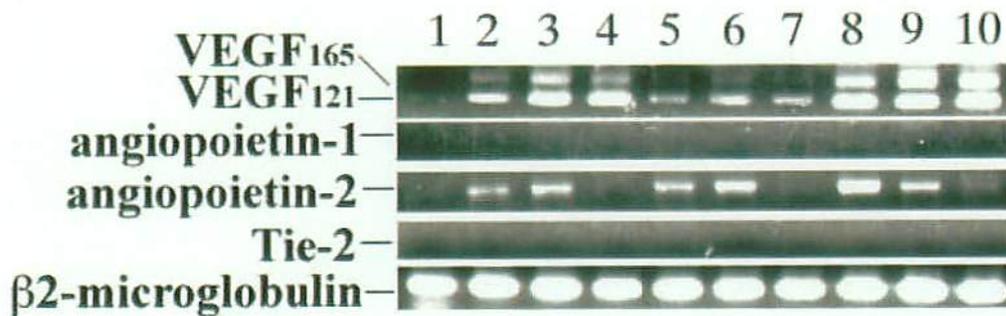
**A****B****C**

図4. VEGF, angiopoietinのRT-PCR

A. 骨髄腫及びその他の細胞株のRT-PCR結果。

レーン 1, KHM-4; レーン 2, U266; レーン 3, KMS 12-PE; レーン4, KMS-12-BM;

レーン 5, RPMI8226; レーン 6, KHM-11; レーン 7, KHM-1B; レーン 8, ARH77;

レーン 9, Jurkat; レーン 10, CEM; レーン 11, K562; レーン 12, HepG2;

レーン 13, HL-60. PC は陽性コントロールでHUVECsを用いた。

B. 代表的な純化した患者由来骨髄腫細胞のRT-PCR。

C. MGUS患者の骨髄より純化した形質細胞 (C-レーン 1 及び 2) 及び反応性形質細胞増多症患者由来の形質細胞 (C-レーン3)のRT-PCR。

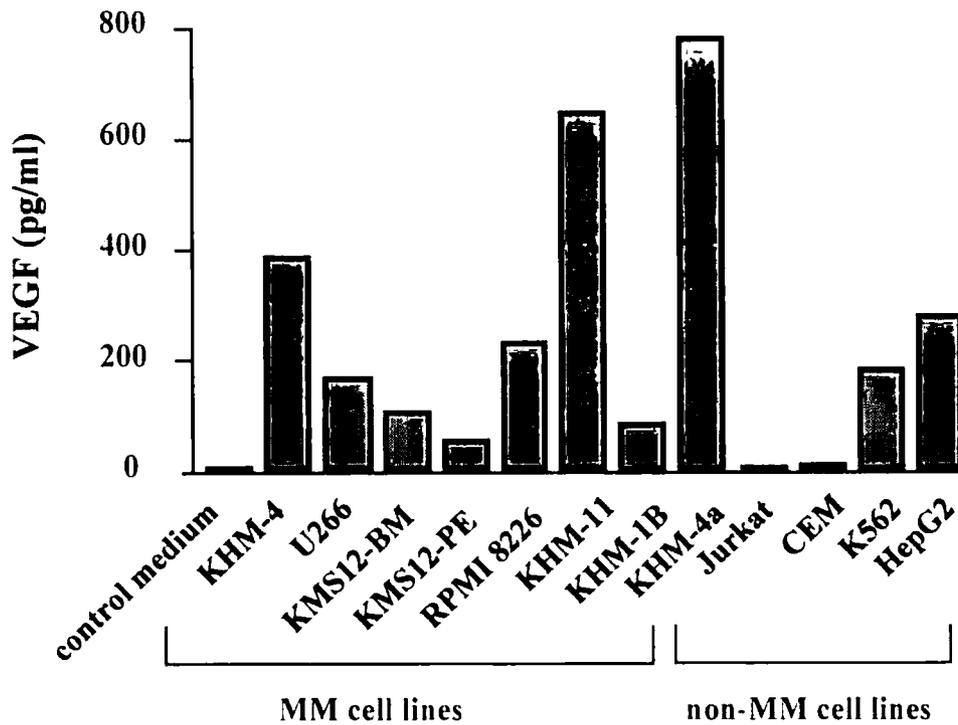


図5. 培養上清中 VEGF<sub>165</sub>濃度

VEGF<sub>165</sub>濃度はELISAにて測定した。特にKHM-4, U266, RPMI8226, KHM-11では高濃度のVEGF<sub>165</sub>を検出した。培養上清中のVEGF濃度は様々であった。

また、KHM-4をマウス皮下に継代して5世代目の細胞(KHM-4a)は親株KHM-4より多くのVEGF<sub>165</sub>を産生した。

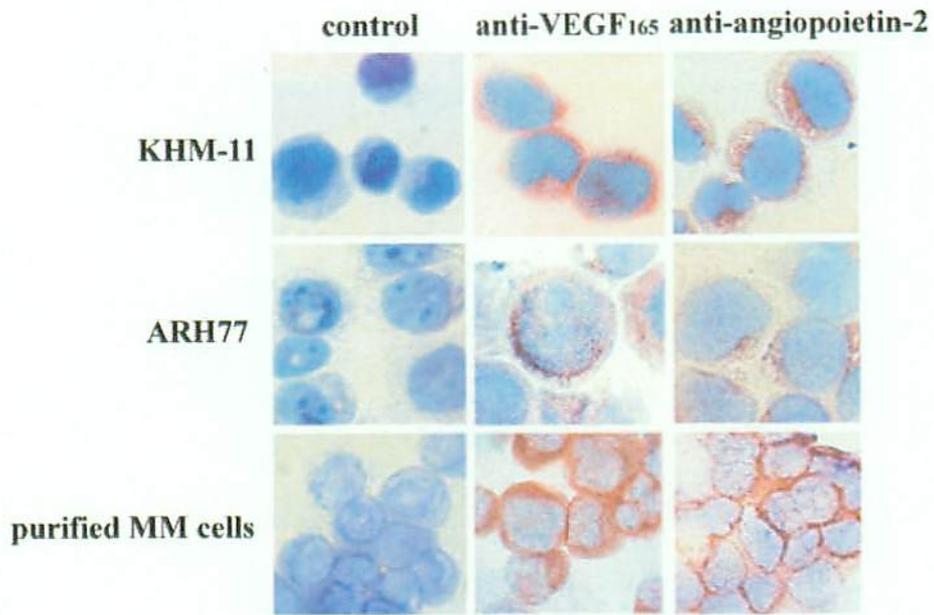


図6. VEGF<sub>165</sub>, angiopoietin-2の免疫染色

骨髓腫細胞株 KHM-11, ARH77と患者由来純化骨髓腫細胞の免疫染色細胞質内にVEGF<sub>165</sub>とAng2が発現していた。(400倍)

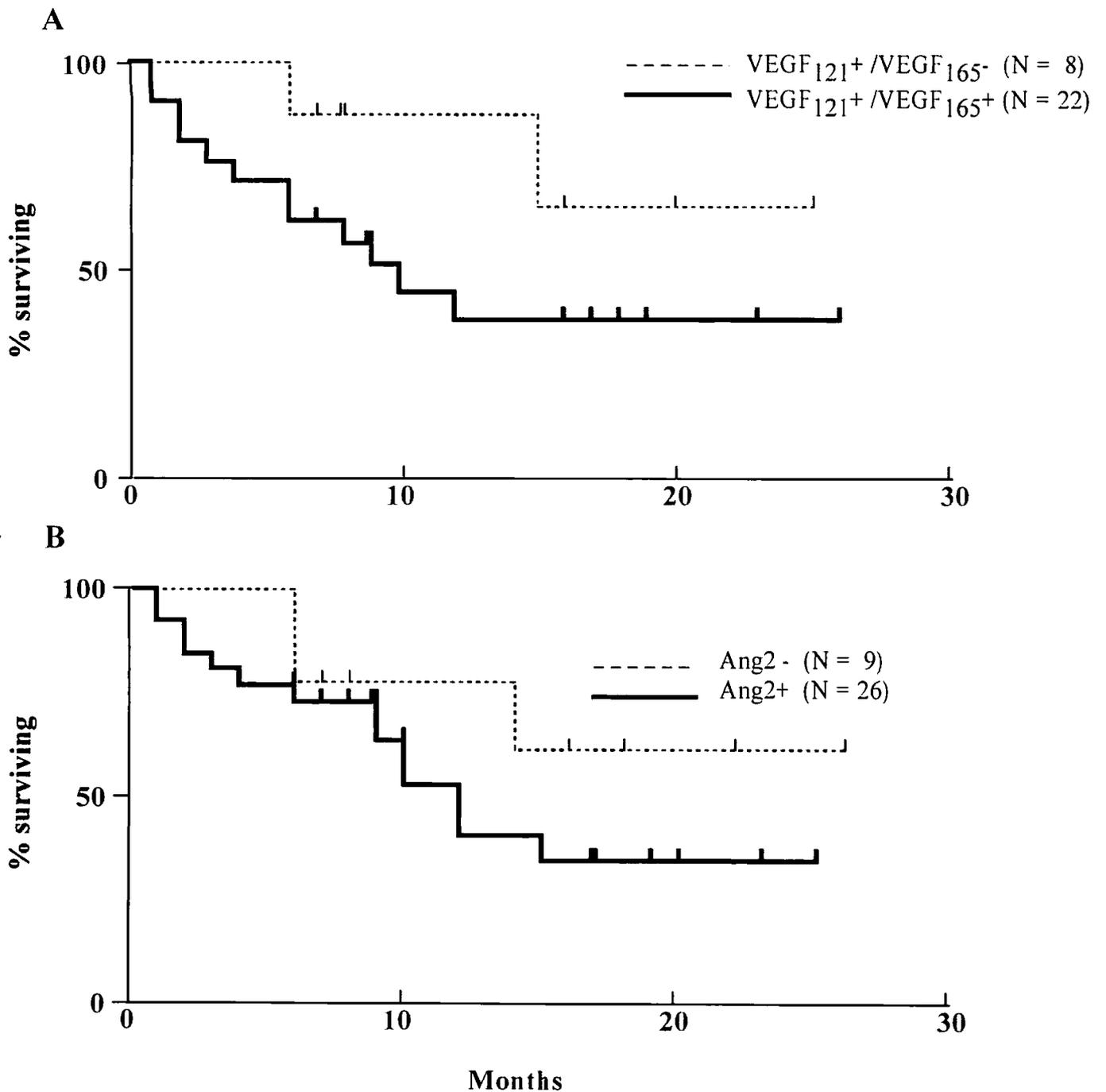


図7. VEGF165, angiopoietin-2の発現と予後

A. VEGF<sub>121</sub>を発現する症例のうちVEGF<sub>165</sub>を発現しない症例(n=8, 破線)と、VEGF<sub>165</sub>を発現する症例(n=22, 実線)を比較した。VEGF<sub>165</sub>を発現する症例は予後不良であった。(p<0.05, Cox-Mantel test)

B. Angiopoietin-2を発現しない症例(n=9, 破線)と、発現する症例(n=26, 実線)の比較。Angiopoietin-2を発現する症例も予後不良であった。(p<0.05, Cox-Mantel test)

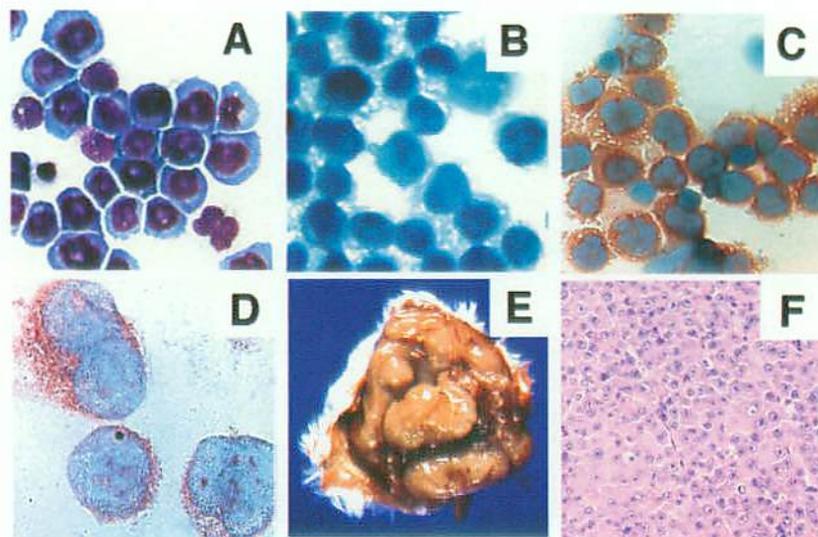


図8. KHM-4細胞とKHM-4腫瘍の形態

- A. KHM-4のMay-Giemsa染色の顕微鏡所見。
- B. 陰性コントロール(ポリクローナルIgG)
- C. 抗ヒトVEGF<sub>165</sub>抗体による免疫染色。細胞質内にVEGFが認められる
- D. 抗ヒトiNOS抗血清による免疫染色。細胞質内にiNOSが発現している。
- E, F. マウス皮下に継代したKHM-4腫瘍の肉眼及び顕微鏡所見。

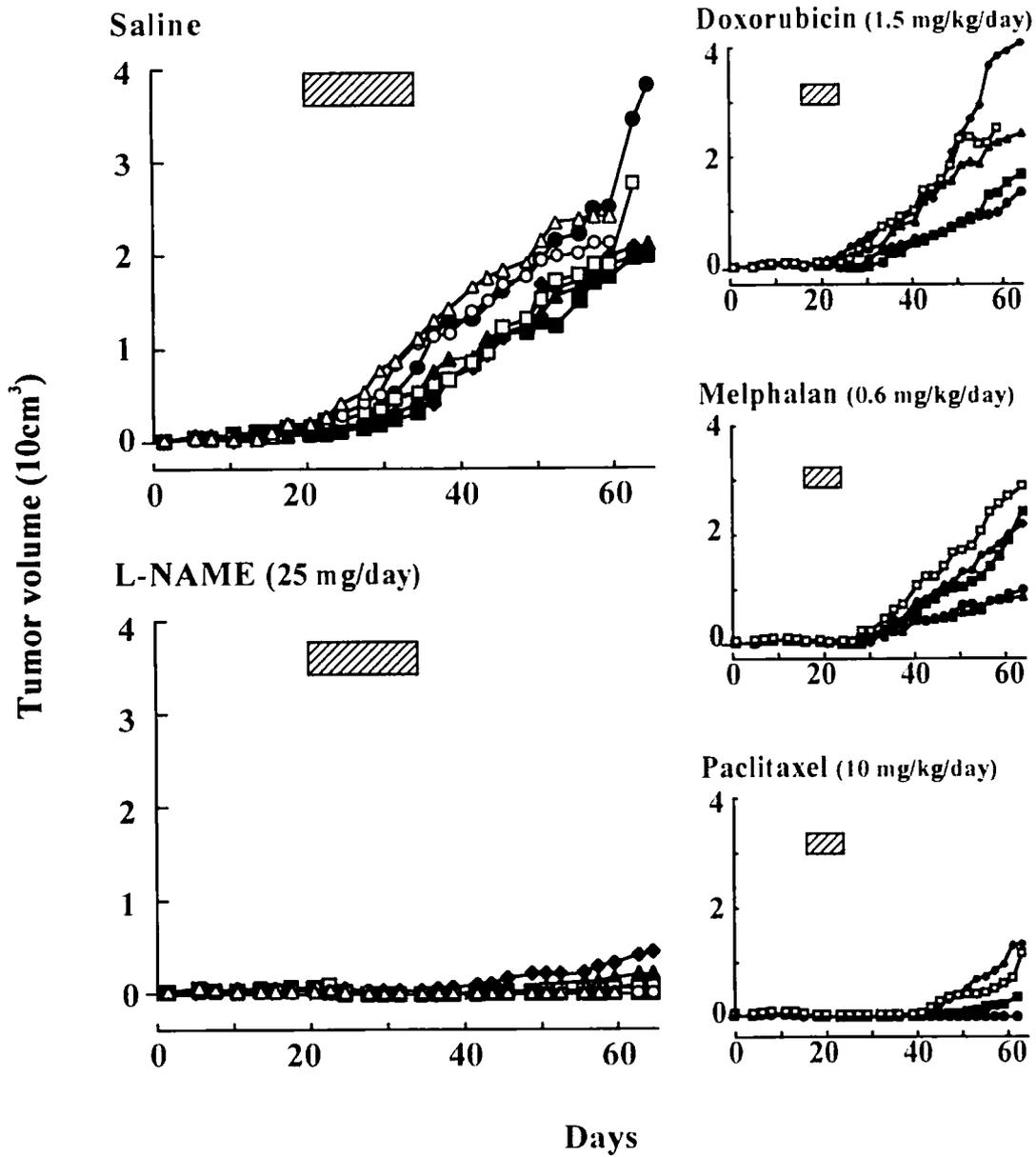


図9. L-NAMEによるKHM-4腫瘍増大の抑制

KHM-4を継代したSCIDマウスに、L-NAMEを投与したもの (n = 7) と生理食塩水を投与したもの (n = 7) の腫瘍サイズの変化。Doxorubicin, melphalan, paclitaxel を投与したマウス (各群n = 5) の腫瘍量の変化も計測した。L-NAME とpaclitaxelを投与したマウスは40日目まで明らかに腫瘍の増大が抑制された。

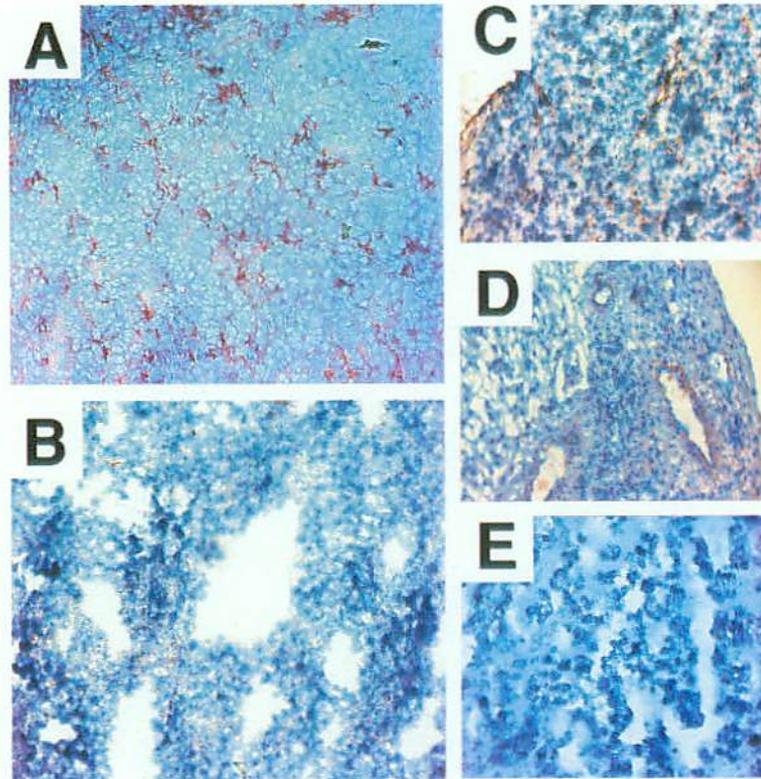


図10. L-NAMEによるKHM-4およびpaclitaxelを投与したマウスの血管新生の抑制  
 マウスより摘出したKHM-4腫瘍の抗第VIII因子関連抗原抗体による免疫染色。  
 Aはコントロール(生理食塩水)投与マウスの腫瘍組織。BはL-NAME投与マウス, Cは  
 doxorubicin, Dはmelphalan, Eはpaclitaxelを投与したマウスの腫瘍組織所見である。  
 L-NAMEを投与したマウスとpaclitaxelを投与したマウスでは, 生理食塩水・  
 doxorubicin・melphalanを投与したマウスと比較して明らかな血管新生の抑制が認めら  
 れた。

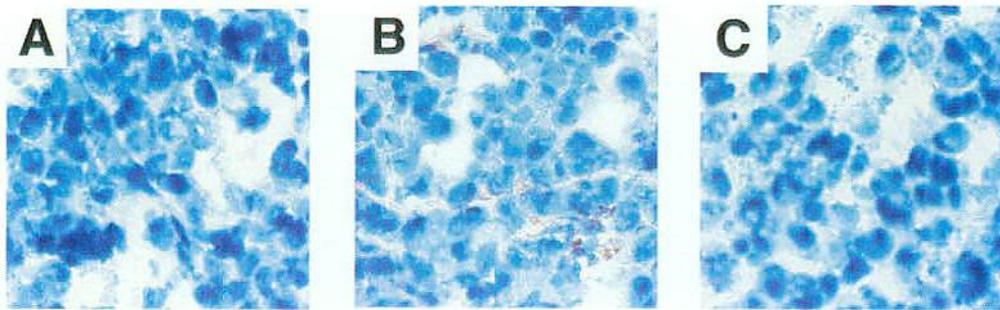


図11. KHM-4腫瘍の腫瘍血管はマウス由来である  
A. 陰性コントロール(ポリクローナルIgG)  
B. 抗第 VIII 因子ウサギポリクローナル抗体  
C. ヒトCD34モノクローナル抗体による免疫染色

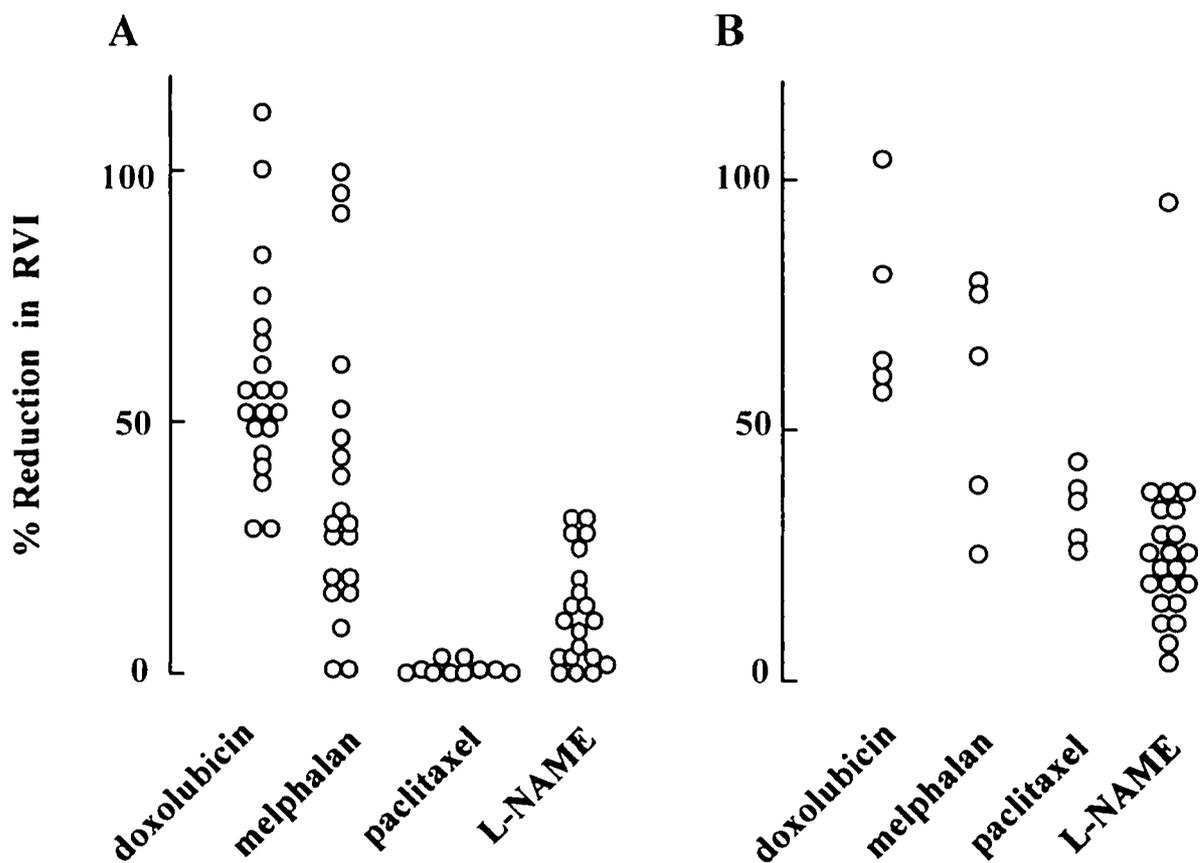


図12. マウス腫瘍組織の血管新生の定量化

A. KHM-4腫瘍組織の血管を第VIII因子関連抗原抗体で免疫染色し、顕微鏡下で全視野からランダムに20視野を選びイメージアナライザーで解析。% reduction in RVIを計測した。

B. 同様に非壊死部のみを選択し同部分の血管で計測した。

いずれの方法でも、L-NAME予備paclitaxelを投与したマウスの腫瘍組織では血管新生抑制を認めた。

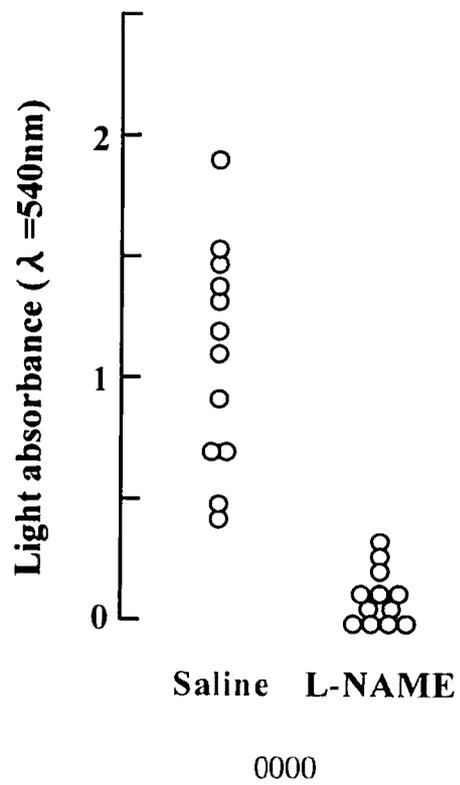


図13. マウス腫瘍組織の血管新生の定量化

生理食塩水を投与したマウスとL-NAMEを投与したマウスの腫瘍組織の、ヘモグロビンの吸光度を測定し比較した。

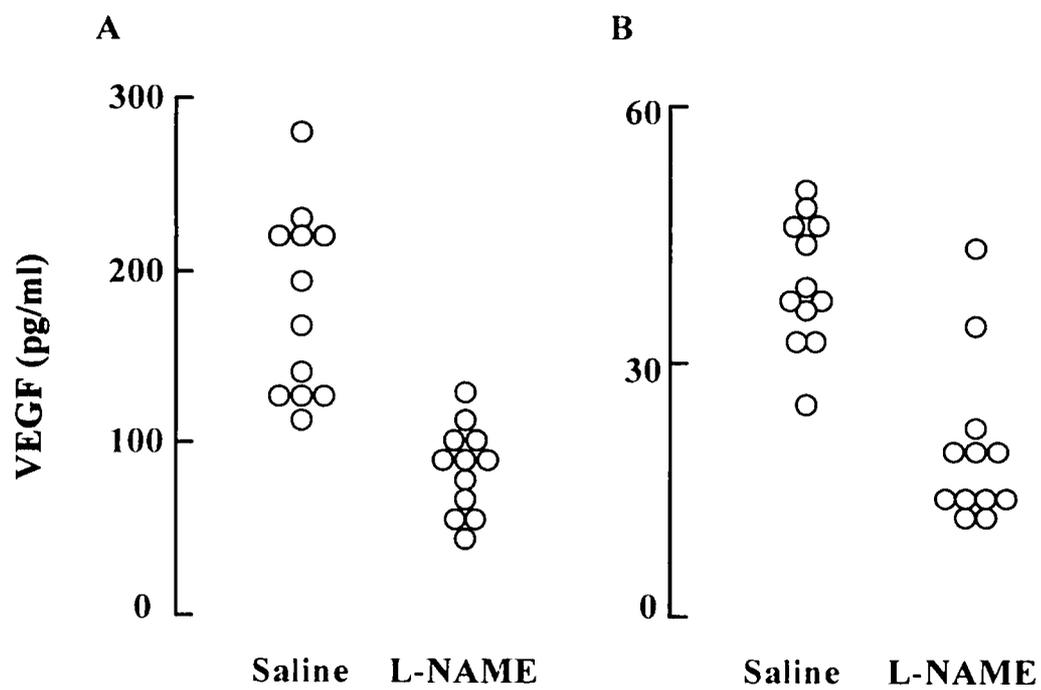


図14. 腫瘍内のヒト及びマウス由来VEGF値の測定

生理食塩水およびL-NAMEを投与したマウスに於ける、KHM-4腫瘍組織lysate中のヒト (panel A) 及びマウス(panel B) のVEGF 値をELISA法にて測定した。

## 11) 参考文献

1. Berenson, J. M. Advances in the biology and treatment of myeloma bone disease, Hematology 2000 (American society of hematology education program book). 154, 2000.
2. Choi, S. J., Cruz, J. C., Craig, F., Chung, H., Devlin, R. D., Roodman, G. D., and Alsina, M. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma, Blood. 96: 671-5., 2000.
3. Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Moriyama, K., Hashimoto, T., Ozaki, S., Wakatsuki, S., Kosaka, M., Kido, S., Inoue, D., and Matsumoto, T. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma, Blood. 100: 2195-202., 2002.
4. Uneda, S., Hata, H., Matsuno, F., Mitsuya, Y., Kawano, F., and Mitsuya, H. Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM.. Br J Haematol. 120: 53-5., 2003.
5. Davies, F. E. and Anderson, K. C. Novel therapeutic targets in multiple myeloma, Eur J Haematol. 64: 359-67., 2000.
6. Alexanian, R., Haut, A., Khan, A. U., Lane, M., McKelvey, E. M., Migliore, P. J., Stuckey, W. J., Jr., and Wilson, H. E. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens, Jama. 208: 1680-5., 1969.
7. Barlogie, B., Smith, L., and Alexanian, R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents, N Engl J Med. 310: 1353-6., 1984.

8. Fritz, E. and Ludwig, H. Interferon-alpha treatment in multiple myeloma: meta-analysis of 30 randomised trials among 3948 patients, *Ann Oncol.* *11*: 1427-36., 2000.
9. Barlogie, B., Jagannath, S., Vesole, D. H., Naucke, S., Cheson, B., Mattox, S., Bracy, D., Salmon, S., Jacobson, J., Crowley, J., and Tricot, G. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma, *Blood.* *89*: 789-93., 1997.
10. Bjorkstrand, B. B., Ljungman, P., Svensson, H., Hermans, J., Alegre, A., Apperley, J., Blade, J., Carlson, K., Cavo, M., Ferrant, A., Goldstone, A. H., de Laurenti, A., Majolino, I., Marcus, R., Prentice, H. G., Remes, K., Samson, D., Sureda, A., Verdonck, L. F., Volin, L., and Gahrton, G. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Blood.* *88*: 4711-8., 1996.
11. Badros, A., Barlogie, B., Morris, C., Desikan, R., Martin, S. R., Munshi, N., Zangari, M., Mehta, J., Toor, A., Cottler-Fox, M., Fassas, A., Anaissie, E., Schichman, S., Tricot, G., and Aniasie, E. High response rate in refractory and poor-risk multiple myeloma after allotransplantation using a nonmyeloablative conditioning regimen and donor lymphocyte infusions, *Blood.* *97*: 2574-9., 2001.
12. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat Med.* *1*: 27-31., 1995.
13. Carmeliet, P. and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature.* *407*: 249-57., 2000.
14. Folkman, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical

- applications of research on angiogenesis, *N Engl J Med.* 333: 1757-63., 1995.
15. Xiangming, C., Hokita, S., Natsugoe, S., Tanabe, G., Baba, M., Takao, S., Kuroshima, K., and Aikou, T. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer, *Ann Surg Oncol.* 5: 585-9., 1998.
  16. Beasley, N. J., Prevo, R., Banerji, S., Leek, R. D., Moore, J., van Trappen, P., Cox, G., Harris, A. L., and Jackson, D. G. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer, *Cancer Res.* 62: 1315-20., 2002.
  17. Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M. J., Squartini, F., and Angeletti, C. A. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer, *Lancet.* 340: 145-6., 1992.
  18. Giatromanolaki, A. Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer, *Anticancer Res.* 21: 4373-82., 2001.
  19. Bellamy, W. T., Richter, L., Frutiger, Y., and Grogan, T. M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies, *Cancer Res.* 59: 728-33., 1999.
  20. Aguayo, A., Estey, E., Kantarjian, H., Mansouri, T., Gidel, C., Keating, M., Giles, F., Estrov, Z., Barlogie, B., and Albitar, M. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia, *Blood.* 94: 3717-21., 1999.
  21. Okada, M., Matsumori, A., Ono, K., Miyamoto, T., Takahashi, M., and Sasayama, S. Hepatocyte growth factor is a major mediator in heparin-induced angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun.* 255: 80-7., 1999.
  22. Teraoka, H., Sawada, T., Nishihara, T., Yashiro, M., Ohira, M., Ishikawa, T., Nishino,

- H., and Hirakawa, K. Enhanced VEGF production and decreased immunogenicity induced by TGF- beta 1 promote liver metastasis of pancreatic cancer, *Br J Cancer*. 85: 612-7., 2001.
23. Haraguchi, M., Miyadera, K., Uemura, K., Sumizawa, T., Furukawa, T., Yamada, K., Akiyama, S., and Yamada, Y. Angiogenic activity of enzymes, *Nature*. 368: 198., 1994.
24. Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Elner, V. M., Martonyi, C. L., Koch, A. E., Polverini, P. J., and Elner, S. G. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization, *Am J Pathol*. 141: 1279-84., 1992.
25. Cervenak, L., Morbidelli, L., Donati, D., Donnini, S., Kambayashi, T., Wilson, J. L., Axelson, H., Castanos-Velez, E., Ljunggren, H. G., Malefyt, R. D., Granger, H. J., Ziche, M., and Bejarano, M. T. Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10, *Blood*. 96: 2568-73., 2000.
26. Czubayko, F., Smith, R. V., Chung, H. C., and Wellstein, A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors, *J Biol Chem*. 269: 28243-8., 1994.
27. Grossfeld, G. D., Ginsberg, D. A., Stein, J. P., Bochner, B. H., Esrig, D., Groshen, S., Dunn, M., Nichols, P. W., Taylor, C. R., Skinner, D. G., and Cote, R. J. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression, *J Natl Cancer Inst*. 89: 219-27., 1997.
28. Papadopoulos, I., Sivridis, E., Giatromanolaki, A., and Koukourakis, M. I. Tumor angiogenesis is associated with MUC1 overexpression and loss of prostate-specific antigen expression in prostate cancer, *Clin Cancer Res*. 7: 1533-8., 2001.

29. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell*. *79*: 315-28., 1994.
30. Bertolini, F., Paolucci, M., Peccatori, F., Cinieri, S., Agazzi, A., Ferrucci, P. F., Cocorocchio, E., Goldhirsch, A., and Martinelli, G. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma, *Br J Haematol*. *106*: 504-9., 1999.
31. Musso, O., Rehn, M., Theret, N., Turlin, B., Bioulac-Sage, P., Lotrian, D., Campion, J. P., Pihlajaniemi, T., and Clement, B. Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas, *Cancer Res*. *61*: 45-9., 2001.
32. Mesri, M., Morales-Ruiz, M., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Pober, J. S., Sessa, W. C., and Altieri, D. C. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting, *Am J Pathol*. *158*: 1757-65., 2001.
33. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA, *Mol Endocrinol*. *5*: 1806-14., 1991.
34. Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF, *Mol Biol Cell*. *4*: 1317-26., 1993.
35. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *Faseb J*. *13*: 9-22., 1999.

36. Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M. G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 9267-71., 1991.
37. Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K., and Eriksson, U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 2576-81., 1996.
38. Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S. M., Avraham, H., and Wood, W. I. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 1988-92., 1996.
39. Yamada, Y., Nezu, J., Shimane, M., and Hirata, Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D, *Genomics.* 42: 483-8., 1997.
40. Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan, T. E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. C., and Yancopoulos, G. D. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning, *Cell.* 87: 1161-9., 1996.
41. Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis, *Science.* 277: 55-60., 1997.
42. Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G. D., and Isner, J. M. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF- induced postnatal neovascularization, *Circ Res.* 83:

233-40., 1998.

43. Koga, K., Todaka, T., Morioka, M., Hamada, J., Kai, Y., Yano, S., Okamura, A., Takakura, N., Suda, T., and Ushio, Y. Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis, *Cancer Res.* *61*: 6248-54., 2001.
44. Tanaka, S., Mori, M., Sakamoto, Y., Makuuchi, M., Sugimachi, K., and Wands, J. R. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma, *J Clin Invest.* *103*: 341-5., 1999.
45. Perez-Atayde, A. R., Sallan, S. E., Tedrow, U., Connors, S., Allred, E., and Folkman, J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia, *Am J Pathol.* *150*: 815-21., 1997.
46. Di Raimondo, F., Palumbo, G. A., Azzaro, M. P., and Giustolisi, R. Angiogenesis in acute myeloid leukemia, *Blood.* *96*: 3656-7., 2000.
47. Monestiroli, S., Mancuso, P., Burlini, A., Pruneri, G., Dell'Agnola, C., Gobbi, A., Martinelli, G., and Bertolini, F. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma, *Cancer Res.* *61*: 4341-4., 2001.
48. Vacca, A., Ribatti, D., Roncali, L., Ranieri, G., Serio, G., Silvestris, F., and Dammacco, F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma, *Br J Haematol.* *87*: 503-8., 1994.
49. Podar, K., Tai, Y. T., Davies, F. E., Lentzsch, S., Sattler, M., Hideshima, T., Lin, B. K., Gupta, D., Shima, Y., Chauhan, D., Mitsiades, C., Raje, N., Richardson, P., and Anderson, K. C. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration, *Blood.* *98*: 428-35., 2001.

50. Dankbar, B., Padro, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, W. E., and Kienast, J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor- stromal cell interactions in multiple myeloma, *Blood*. *95*: 2630-6., 2000.
51. Moncada, S. and Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway, *N Engl J Med*. *329*: 2002-12., 1993.
52. Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S., and Esumi, H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells, *Oncogene*. *15*: 437-42., 1997.
53. Garcia-Cardena, G. and Folkman, J. Is there a role for nitric oxide in tumor angiogenesis?, *J Natl Cancer Inst*. *90*: 560-1., 1998.
54. Gardiner, S. M., Compton, A. M., Kemp, P. A., and Bennett, T. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester or indomethacin on differential regional and cardiac haemodynamic actions of arginine vasopressin and lysine vasopressin in conscious rats, *Br J Pharmacol*. *102*: 65-72., 1991.
55. Stromblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C., and Cheresh, D. A. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis, *J Clin Invest*. *98*: 426-33., 1996.
56. Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Monge, J. C., Mohamed, F., Bendeck, M. P., and Stewart, D. J. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor, *Circ Res*. *82*: 1007-15., 1998.
57. de Wilt, J. H., Manusama, E. R., van Etten, B., van Tiel, S. T., Jorna, A. S., Seynhaeve, A. L., ten Hagen, T. L., and Eggermont, A. M. Nitric oxide synthase inhibition results

- in synergistic anti-tumour activity with melphalan and tumour necrosis factor alpha-based isolated limb perfusions, *Br J Cancer*. 83: 1176-82., 2000.
58. Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Storchi, I., Vergari, W. A., and Ziche, M. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer, *J Natl Cancer Inst*. 90: 587-96., 1998.
59. Jadeski, L. C. and Lala, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors, *Am J Pathol*. 155: 1381-90., 1999.
60. Matsuzaki, H., Matsuno, F., Yoshida, M., Hata, H., Okazaki, K., and Takatsuki, K. Human myeloma cell line (KHM-4) established from a patient with multiple myeloma associated with hyperammonemia, *Intern Med*. 31: 339-43., 1992.
61. Matsuzaki, H., Hata, H., Takeya, M., and Takatsuki, K. Establishment and characterization of an amylase-producing human myeloma cell line, *Blood*. 72: 978-82., 1988.
62. Hata, H., Matsuzaki, H., Sonoki, T., Takemoto, S., Kuribayashi, N., Nagasaki, A., and Takatsuki, K. Establishment of a CD45-positive immature plasma cell line from an aggressive multiple myeloma with high serum lactate dehydrogenase, *Leukemia*. 8: 1768-73., 1994.
63. Ohtsuki, T., Yawata, Y., Wada, H., Sugihara, T., Mori, M., and Namba, M. Two human myeloma cell lines, amylase-producing KMS-12-PE and amylase- non-producing KMS-12-BM, were established from a patient, having the same chromosome marker, t(11;14)(q13;q32), *Br J Haematol*. 73: 199-204., 1989.
64. 今村幸雄. 骨髓腫, 癌の臨床. 27: 1067-74, 1981.

65. Giorno, R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction, *Diagn Immunol.* 2: 161-6, 1984.
66. Wood, P. J., Sansom, J. M., Newell, K., Tannock, I. F., and Stratford, I. J. Reduction of tumour intracellular pH and enhancement of melphalan cytotoxicity by the ionophore Nigericin, *Int J Cancer.* 60: 264-8., 1995.
67. Kitaura, K., Watanabe, Y., Ishihara, Y., and Takahara, H. Studies on antitumor activity of Adriamycin., *Japanese Journal of Antibiotics.* 115: 65-71, 1972.
68. Cavaletti, G., Tredici, G., Braga, M., and Tazzari, S. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol, *Exp Neurol.* 133: 64-72., 1995.
69. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma, *N Engl J Med.* 324: 1-8., 1991.
70. Bauer, K. S., Dixon, S. C., and Figg, W. D. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent, *Biochem Pharmacol.* 55: 1827-34., 1998.
71. Raje, N. and Anderson, K. Thalidomide--a revival story, *N Engl J Med.* 341: 1606-9., 1999.
72. Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., Zeddis, J., and Barlogie, B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma, *N Engl J Med.* 341: 1565-71., 1999.
73. Tosi, P., Zamagni, E., Cellini, C., Ronconi, S., Patriarca, F., Ballerini, F., Musto, P., Di Raimondo, F., Ledda, A., Lauria, F., Masini, L., Gobbi, M., Vacca, A., Ria, R.,

- Cangini, D., Tura, S., Baccarani, M., and Cavo, M. Salvage therapy with thalidomide in patients with advanced relapsed/refractory multiple myeloma, *Haematologica*. 87: 408-14., 2002.
74. Barlogie, B., Desikan, R., Eddlemon, P., Spencer, T., Zeldis, J., Munshi, N., Badros, A., Zangari, M., Anaissie, E., Epstein, J., Shaughnessy, J., Ayers, D., Spoon, D., and Tricot, G. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients, *Blood*. 98: 492-4., 2001.
75. Greipp, P. R. Advances in the diagnosis and management of myeloma, *Semin Hematol*. 29: 24-45., 1992.
76. Rajkumar, S. V., Leong, T., Roche, P. C., Fonseca, R., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Witzig, T. E., Kyle, R. A., Gertz, M. A., and Greipp, P. R. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma, *Clin Cancer Res*. 6: 3111-6., 2000.
77. Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Quondamatteo, F., Ria, R., Minischetti, M., Marzullo, A., Herken, R., Roncali, L., and Dammacco, F. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma, *Br J Cancer*. 79: 451-5., 1999.
78. Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M., Minischetti, M., Iurlaro, M., Ria, R., Albini, A., Bussolino, F., and Dammacco, F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma, *Blood*. 93: 3064-73., 1999.
79. Sezer, O., Jakob, C., Eucker, J., Niemoller, K., Gatz, F., Wernecke, K., and Possinger,

- K. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma, *Eur J Haematol.* 66: 83-8., 2001.
80. Di Raimondo, F., Azzaro, M. P., Palumbo, G., Bagnato, S., Giustolisi, G., Florida, P., Sortino, G., and Giustolisi, R. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood, *Haematologica.* 85: 800-5., 2000.
81. Lobov, I. B., Brooks, P. C., and Lang, R. A. From the Cover: Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 11205-10., 2002.
82. Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, *Science.* 284: 1994-8., 1999.
83. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature.* 407: 242-8., 2000.
84. Borre, M., Nerstrom, B., and Overgaard, J. Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine- differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting, *Clin Cancer Res.* 6: 1882-90., 2000.
85. Werther, K., Christensen, I. J., and Nielsen, H. J. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma, *Br J Cancer.* 86: 417-23., 2002.
86. Niklinska, W., Burzykowski, T., Chyczewski, L., and Niklinski, J. Expression of

vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis, *Lung Cancer*. *34 Suppl 2*: S59-64., 2001.

87. Kyle, R. A. "Benign" monoclonal gammopathy--after 20 to 35 years of follow-up, *Mayo Clin Proc*. *68*: 26-36., 1993.
88. Dredge, K., Marriott, J. B., Macdonald, C. D., Man, H. W., Chen, R., Muller, G. W., Stirling, D., and Dalglish, A. G. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects, *Br J Cancer*. *87*: 1166-72., 2002.
89. Takatsuka, S., Yamada, N., Sawada, T., Ogawa, Y., Maeda, K., Ohira, M., Ishikawa, T., Nishino, H., Seki, S., and Hirakawa, Y. S. C. K. Contribution of angiogenesis to the progression of colon cancer: possible inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and hepatic metastasis, *Int J Oncol*. *17*: 253-8., 2000.
90. Lin, B., Podar, K., Gupta, D., Tai, Y. T., Li, S., Weller, E., Hideshima, T., Lentzsch, S., Davies, F., Li, C., Weisberg, E., Schlossman, R. L., Richardson, P. G., Griffin, J. D., Wood, J., Munshi, N. C., and Anderson, K. C. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment, *Cancer Res*. *62*: 5019-26., 2002.
91. Deroanne, C. F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clause, N., Blacher, S., Verdin, E., Foidart, J. M., Nusgens, B. V., and Castronovo, V. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling, *Oncogene*. *21*: 427-36., 2002.
92. Mitsuya, H., Matis, L. A., Megson, M., Cohen, O. J., Mann, D. L., Gallo, R. C., and

- Broder, S. Immune T cells reactive against human T-cell leukaemia/lymphoma virus, *Lancet. I*: 649-52., 1984.
93. Zhao, Q., Egashira, K., Inoue, S., Usui, M., Kitamoto, S., Ni, W., Ishibashi, M., Hiasa Ki, K., Ichiki, T., Shibuya, M., and Takeshita, A. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis, *Circulation. 105*: 1110-5., 2002.
94. Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T., Borsotti, P., Pitelli, M. R., Viale, G., Giavazzi, R., and Taraboletti, G. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity, *Clin Cancer Res. 2*: 1843-9., 1996.
95. Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., and D'Amato, R. J. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol, *Cancer Res. 57*: 81-6., 1997.
96. Miller, H. J., Leong, T., Khandekar, J. D., Greipp, P. R., Gertz, M. A., and Kyle, R. A. Paclitaxel as the initial treatment of multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1A93), *Am J Clin Oncol. 21*: 553-6., 1998.
97. Dimopoulos, M. A., Arbut, S., Huber, M., Weber, D., Lockett, R., Delasalle, K., and Alexanian, R. Primary therapy of multiple myeloma with paclitaxel (taxol), *Ann Oncol. 5*: 757-9., 1994.
98. Schilling, J., Cakmakci, M., Battig, U., and Geroulanos, S. A new approach in the treatment of hypotension in human septic shock by NG-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of the nitric oxide synthetase, *Intensive Care Med. 19*: 227-31, 1993.