

# アンジオテンシン変換酵素阻害剤の抗血管新生作用による 肝癌発育抑制効果の検討

奈良県立医科大学第3内科学教室

河田 充弘

## THE INHIBITORY EFFECT OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITOR ON TUMOR DEVELOPMENT AND ANGIOGENESIS IN THE MURINE HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

MITSUHIRO KAWATA

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 18, 2000

**Abstract:** Since angiogenesis is essential for the growth of any solid tumor, emerging efforts are being made to develop anti-angiogenic therapy. To date, however, no anti-angiogenic agent has become widely available in clinic. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitors are commonly used as antihypertensive agents, and have recently been suggested to decrease the risk of cancer. Here we show an ACE inhibitor, perindopril appears to be a potent inhibitor of tumor development and angiogenesis at clinical doses, whereas angiotensin-II receptor antagonists do not exert such an inhibitory effect. The potent angiogenic factor, vascular endothelial growth factor (VEGF) is significantly suppressed in tumors by perindopril, and it also inhibits VEGF-induced tumor growth. *In vitro* studies showed that perindopril is not cytotoxic for either tumor cells or endothelial cells. Since perindopril is already in widespread use clinically, it may represent a potential new strategy for anticancer therapy. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 369~380, 2000)

**Key words:** ACE inhibitor, angiogenesis, cancer, hepatocellular carcinoma, VEGF

### 緒 言

現在、すべての固形癌の発育は血管新生に依存することが広く知られている<sup>1,2)</sup>。腫瘍血管新生の研究は1970年代のFolkmanらの先駆的な仮説の提唱によって始まるとされている。彼らは、血管から酸素が拡散によって供給され得る距離はたかだか200から250 $\mu$ mであり、これより離れた腫瘍細胞は新生血管の誘導がなければ壊死することを示した<sup>3)</sup>。即ち、腫瘍細胞の生存、増殖には血管新生が必須であり、新たな血管新生がなければ腫瘍はわずか数mmでも成長することができず、休眠状態(tumor dormancy)を保っていると考えた。現在これらの仮説は実験的にも正しいことが証明されており、アン

ジオスタチンなどの内因性血管新生阻害因子を投与することにより、腫瘍が休眠状態となりそれ以上発育しないことが報告されている<sup>4,5)</sup>。

肝細胞癌(肝癌)は、世界中で年間発生数が25000から30000例と推定されており、現在もその総発生数は増加を示している<sup>6,7)</sup>。外科手術を始めとして様々な治療法が考案され試みられているが、多中心性に発育することや再発を来しやすいことなどから肝癌の生命予後は依然として不良であり、新しい観点からの治療法の開発が望まれている<sup>7)</sup>。肝癌の代表的な生物学的特徴の1つとして、極めて血管が豊富であることがあげられる。肝癌は腫瘍の発達につれ、肝動脈を中心とする著明な血管新生を伴うことが古くから臨床的に知られてきた<sup>8)</sup>。実際、ヒトの

肝癌組織標本において、様々な血管新生因子の産生が確認されており、それら因子の発現と予後との逆相関が報告されている<sup>9)</sup>。これらの事実より、肝癌の発育に血管新生が重要な役割を果たしていることは想像に難くない。

ところで、抗血管新生阻害剤は、遺伝的に均一とされる血管内皮細胞をターゲットとしており、これまでの一般的な抗癌剤に比べ薬剤耐性を生じにくいとされている。さらに、投与後の薬剤は非常に早く内皮細胞に到達するため、癌細胞を標的とした一般抗癌剤のように深部到達までの用量を必要とせず、生体への毒性も極めて低いなどの利点を有している<sup>4,5)</sup>。このため、現在世界中で腫瘍の血管新生を抑制する薬剤の開発が精力的に行われており、現在数種類の薬剤の臨床試験がアメリカなどの特定の施設で開始されている<sup>1-4)</sup>。しかし、残念ながら現時点では臨床の場で投与可能な認可されている薬剤はない。これまでも、動物実験レベルで臨床において投与されている薬剤のいくつかが抗血管新生作用を有することが報告されているが、その実験に使用されている投与量は人間の臨床投与量よりもはるかに多く、現実的ではない<sup>10,11)</sup>。

アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤は、降圧剤として広く使用されている ACE の経口阻害剤である。近年、ACE 阻害剤または他の降圧剤の投与を受け、10 年間 follow up された 5207 名の患者の retrospective cohort study において ACE 阻害剤が癌の発生率や癌による死亡率を減少させることが報告された<sup>12)</sup>。また、ある種の ACE 阻害剤が、抗血管新生作用を持つことも報告されている<sup>13,14)</sup>。そこで本研究において著者は、将来の血管新生阻害に基づく肝癌治療の可能性を念頭に置いて、ACE 阻害剤のマウス肝癌発育ならびに血管新生に及ぼす影響を検討すると共に、その作用メカニズムについても解析を加えた。

## 方 法

### (1) 薬剤, 細胞

ACE 阻害剤としてカプトプリル、テモカプリル、ベリンドプリルを用いた。カプトプリル、テモカプリルは三共製薬(東京)より、ベリンドプリルは第一製薬(東京)より提供を受けた。さらに、アンジオテンシン-II 1 型受容体(AT-II-R)拮抗剤としてカンデサルタンを武田製薬(東京)より、ロサルタンを萬有製薬(東京)より提供を受けた。マウス肝癌細胞として、同系マウスに移植可能な BNL, 1ME A, 7R, A HCC cells(BNL-HCC: 理研ジーンバンク, 東京)を今回の実験に使用した<sup>15)</sup>。またヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)は大日本製薬(大阪)より入手

した。

### (2) 皮下肝癌モデルの作製

175 cm<sup>2</sup> のフラスコに BNL-HCC 細胞を撒き、10% FCS, 100 units/ml のペニシリンおよび 100 μg/ml のストレプトマイシンを含む DMEM 培養液に、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。培養した細胞を 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml の細胞濃度に調整したのち、100 μl を同系の BALB/c マウス(日本エスエルシー, 浜松)の背部皮下に接種してマウス皮下肝癌モデルを作製した。腫瘍は週に 2 回ノギスを用いて測定し、腫瘍容積を経時的に測定した。なお、腫瘍容積は Carlson らの方法に従い、下記のように算定した。腫瘍容積(mm<sup>3</sup>) = [腫瘍長径(mm) × 腫瘍短径(mm)]<sup>2</sup> ÷ 2<sup>16)</sup>。

### (3) ACE 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

前述の皮下肝癌マウスを用いて、腫瘍を接種後 3 日目にマウスを無作為に各群 5-7 匹に分け実験を行った。まずはじめにベリンドプリル、テモカプリル、カプトプリルのいずれか一剤をそれぞれ 20 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与して、腫瘍発育に及ぼす影響について検討した。またベリンドプリルについては 20 mg/kg に加えて 10 mg/kg, 2 mg/kg の用量の異なった実験群を作成し同様に検討した。さらに腫瘍がある程度発育した時点よりベリンドプリル 2 mg/kg を同様に投与した群を作成し、すでに確立した腫瘍発育に対する効果についても同様に検討した。

### (4) AT-II-R 拮抗剤の抗腫瘍効果の検討

降圧剤として ACE 阻害剤と類似のメカニズムによって作用を示すとされる AT-II-R 拮抗剤について、同様の皮下肝癌マウスを用い、腫瘍接種 3 日後よりカンデサルタン、ロサルタンをそれぞれ 20 mg/kg の用量で 1 日に 1 回経口投与し、腫瘍容積を経時的に測定しベリンドプリル 20 mg/kg 投与群との比較検討を行った。

### (5) ACE 阻害剤(ベリンドプリル)の血管新生におよぼす影響の検討

#### a) *in vivo* 実験系

ベリンドプリルの腫瘍内における血管新生の抑制作用を検討するために、それぞれのグループの皮下腫瘍より凍結切片を作成して新生血管のマーカーとして広く知られている platelet/EC adhesion molecule(PECAM: CD31)の免疫染色を行った。免疫染色は、まず切片に 1 次抗体(CD31)を 37°C で 60 分間反応させた後、2 次抗体(anti-rat IgG)を 37°C 30 分間反応させ、アジピン-ビオチン標識酵素複合体(ABC)を加え 30 分間反応させた。さらに洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ不活化を行うために、蒸留水 2 ml に 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 ml と 100% メタノー

ル 7 ml を加えた溶液を作成して標本に加え、10 分間反応させた。その後ペルオキシダーゼ基質溶液(3,3'-Diaminobenzidine : DAB)を反応させることにより組織切片上の抗体の存在部位を検出した。最後に洗浄後へマトキシリン-マイヤーにて染色を行った後脱水処理を行った。さらに、微細新生血管の面積を半定量するために、画像解析システムを用いた。まず、200 倍視野で最も血管新生の強い、いわゆる hot spot といわれる部位を 5 カ所選んでポジフィルムを用いて写真撮影を行い、イメージスキャナを用いてデジタル化し、NIH image software を用いて新生血管の総面積を測定した。

#### b) *in vitro* 実験系

*in vitro* におけるペリンドブリルの血管新生の抑制効果は、内皮細胞(EC)の tubular formation assay によって検討した。すなわち、Matrigel™(Colaborative Biochemical Products, Bedford, MA, USA)を 6 well の培養皿(2 ml/well)に入れ、37°C で 30 分静置してゲル化し、 $2.5 \times 10^4$  個の HUVEC 細胞を各皿に入れ、ペリンドブリル  $1 \mu\text{M}$  添加あるいは非添加の条件で、10%FCS、100 units/ml のペニシリンおよび  $100 \mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシンを含む DMEM 培養液を加え、5%  $\text{CO}_2$  下で 20 時間培養し、EC の管腔形成を観察した。tubular formation の半定量は *in vitro* の時と同様に NIH image を用い、管腔形成された EC の長径の総和を測定した。

#### (6) ペリンドブリルの肝細胞癌及び EC 増殖能に対する影響

ペリンドブリルの肝細胞癌(BNL-HCC)及び EC の増殖に対する抑制効果を検討するために、MTT(tetrazolium, 3-(4,5-diethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay 法を用いて *in vitro* における細胞増殖能を観察した。96 well 培養皿に  $5 \times 10^3$  cell の BNL-HCC 及び EC を撒き、それぞれにペリンドブリルの活性体であるペリンドブリラートを種々の濃度で添加し、10%FCS、100 units/ml のペニシリンおよ

び  $100 \mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシンを含む DMEM 培養液を用い、37°C、5%  $\text{CO}_2$  の条件で 24 h、48 h、72 h、96 h 培養した後に MTT を  $0.5 \text{ mg/ml}$  の濃度で添加し、さらに 2~3 時間培養した後に培養液を取り除き、1 ml のジメチルスルホキシドを加え浸透させた後に吸光度を測定した。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて 540 nm フィルターで測定した。

#### (7) ペリンドブリルの腫瘍内 ACE 活性及び血管内皮増殖因子(VEGF)に対する影響

マウス皮下腫瘍を homogenize し、抽出物の蛋白濃度を測定してそれぞれの試料の蛋白濃度を均一にした後、代表的な血管新生因子である VEGF のレベルを ELISA 測定キット(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。さらに同じ試料で ACE 測定キット(Sigma, St. Louis, MO, USA)を用いて ACE 活性の定量も行い VEGF と比較検討した。

#### (8) ペリンドブリルの VEGF 誘導腫瘍発育に対する影響

ペリンドブリルの腫瘍抑制効果が VEGF の抑制によるものかどうかを検討するために、VEGF により増大発育した腫瘍に対するペリンドブリルの影響について検討した。この実験には、生体内で遺伝子発現を自由に制御できる Tetracycline-controlled transactivator-responsive promoter system(Tet-system)を用いて腫瘍内の VEGF 発現を制御した。Tet-system はテトラサイクリンで制御される遺伝子制御システムであり、マウスに飲料水に混じてテトラサイクリンを投与することにより腫瘍内の遺伝子発現を自在に制御できるものである<sup>17)</sup>。今回我々が用いた Retro-Tet system はレトロウイルスベクターを用い、通常の Tet-system に比べてより厳密な制御が可能となるように設計されたものである。VEGF を挿入した今回の実験に用いたベクターの構造を Fig. 1 に示す。このベクターを遺伝子導入した安定形質株(BNL-VEGF)を前述のように BALB/c マウス皮

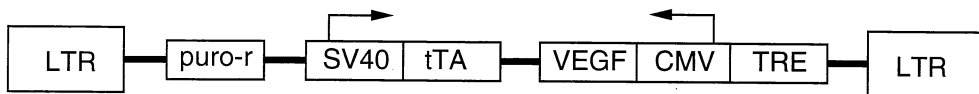


Fig. 1. Construction of the tetracycline-regulated retroviral-mediated VEGF expression vector. The vector contains a tetracycline-controlled transcriptional activator (tTA) and tetracycline responsive element (TRE) in the opposite direction. Human VEGF cDNA was cloned into the multicloning site of the response unit. The transcriptional direction is indicated by an arrow. LTR: long terminal repeat. Puro-r: puromycin resistance gene. SV40: simian virus 40 enhancer/promoter. CMV: cytomegalovirus enhancer/promoter.

下に接種し腫瘍の発育を経時的に測定し、以下の実験群間で比較した。

- 1) テトラサイクリンにより VEGF を完全に制御した群(VEGF-OFF 群)
  - 2) テトラサイクリンを使用せず VEGF を制御していない群(VEGF-ON 群)
  - 3) 2)の腫瘍接種マウスにペリンドプリル 2 mg/kg を投与した群
- (9) 統計学的処理

統計学有意差を Tukey の多変量検定を用いて解析し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 結 果

#### 1) ACE 阻害剤のマウス皮下肝癌発育への影響

ACE 阻害剤の腫瘍発育への効果を解明するために、BNL-HCC 細胞接種 3 日後から、ペリンドプリル、テモカプリル、カプトプリルをそれぞれ 20 mg/kg/day の濃度にて経口投与して腫瘍発育に及ぼす影響を検討した結果、Fig. 2 に示すように 3 種の ACE 阻害剤はすべてが control 群に比べ有意な腫瘍発育の抑制効果を示した。これらの薬剤のうち、ペリンドプリルは他の 2 つの ACE 阻害剤に比べても有意に強い、最も強力な腫瘍発育抑制

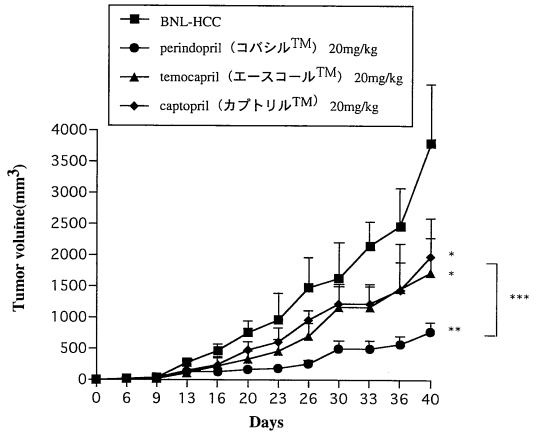
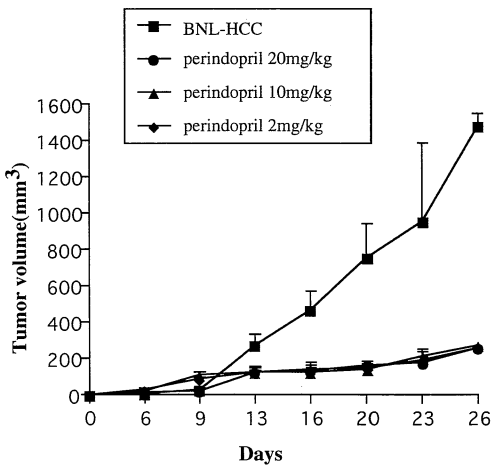


Fig. 2. The effect of ACE inhibitors on HCC-tumor development. ACE inhibitors (perindopril, temocapril, and captopril) were administrated by gavage once daily at 20 mg/kg/day from 3 days after tumor implantation. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=7). \* and \*\* represent significant differences vs. the control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ . \*\*\* represent significant differences at  $p < 0.05$ .

### A



### B

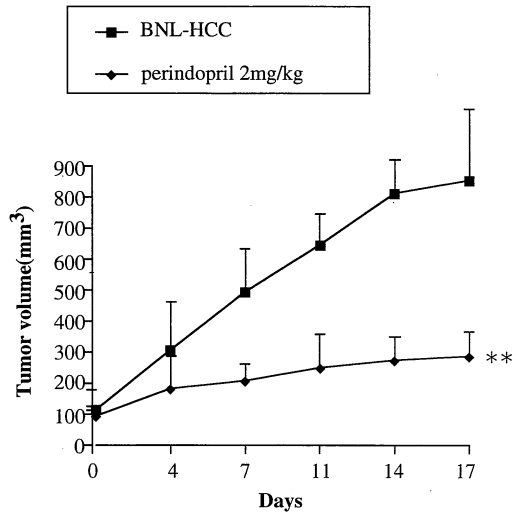


Fig. 3. A : The dose-ranging effect of perindopril on tumor development. Perindopril was administrated by gavage once daily at dose of 20, 10 and 2 mg/kg/day from 3 days after tumor implantation. (n=7) B : The effect of perindopril on the established-tumor development. Perindopril (2 mg/kg) was administrated when the mean tumor volume reached 94 mm<sup>3</sup>. (n=7; control group, n=6 perindopril-treated group).

効果を示した。従って以下の実験についてはペリンドプリルを中心に検討を行った。次に、ペリンドプリルが低用量においても抑制効果を有するかどうかを検討するために、同様のマウスにペリンドプリルを 20 mg/kg, 10 mg/kg, 2 mg/kg の用量で投与して検討した。その結果、2 mg/kg の低投与量でも 20 mg/kg 群と同様に強い腫瘍抑制効果が認められた (Fig. 3A)。さらに、実際の臨床における状況に近づけるため、腫瘍がある程度発育した後 (腫瘍体積, 平均約 94 mm<sup>3</sup>) にペリンドプリル 2 mg/kg の投与を開始した。この場合においても、腫瘍細胞接種 3 日後よりペリンドプリルを投与した群と同様に腫瘍発育は control 群に比べ有意に抑制されることが明らかとなった (Fig. 3B)。

#### 2) AT-II-R 拮抗剤のマウス皮下肝癌発育への影響

ACE 阻害剤は AT-II-R を介して降圧効果を示すとされている。ACE 阻害剤の腫瘍抑制についても、同様に AT-II-R 刺激による経路を介するものかどうかを検討するために、AT-II-R 拮抗剤の腫瘍抑制効果について検討した。その結果、ペリンドプリルが 2 mg/kg/day で control 群に比べ明らかな腫瘍抑制を認めたのに対し、カンデサルタンとロサルタンはどちらも 20 mg/kg/day の投与量でも腫瘍発育の明らかな抑制効果を示さなかった (Fig. 4)。この結果、ペリンドプリルは AT-II-R の阻害という降圧剤としての作用機序とは異なったメカニズムにより腫瘍発育を抑制することが示唆された。

#### 3) ペリンドプリルの血管新生に及ぼす影響

ペリンドプリルの腫瘍発育の抑制効果が腫瘍の血管新生の抑制に伴っているかどうかを調べるために、免疫組織化学による腫瘍内の CD31 の発現を検討した。その結果、ペリンドプリル治療群 (Fig. 5B) の腫瘍内新生血管は control 群 (Fig. 5A) に比べ明らかに減少していた。さらに NIH image を用いて CD31 陽性血管面積を半定量したところ、ペリンドプリル投与群では腫瘍内の新生血管は control 群の 8 分の 1 以下であった (Fig. 5C)。また EC tubular formation assay により検討した *in vitro* における実験においても、control 群 (Fig. 6A) では EC の管腔形成が認められたのに対し、ペリンドプリルの活性体であるペリンドプリラートを加えた群 (Fig. 6B) では EC の管腔形成は著明に抑制されていた。NIH image を用いた EC の管腔径の定量では、ペリンドプリラート群は control 群の 4 分の 1 以下であった (Fig. 6C)。これらの結果からペリンドプリルは *in vivo* でも *in vitro* でも血管新生を著明に抑制することが示された。

#### 4) ペリンドプリルの HCC, EC 増殖への影響

ペリンドプリルの腫瘍抑制効果が腫瘍細胞や血管内皮

細胞に対する細胞毒性によるかどうかを検討するために、ペリンドプリラートの添加による BNL-HCC 細胞の *in vitro* での増殖について検討した。その結果、*in vivo* での結果とは対照的に、ペリンドプリルは高濃度においても BNL-HCC 細胞の *in vitro* での増殖に影響を及ぼさなかった (Fig. 7A)。さらに EC 増殖のペリンドプリルの影響も検討したが、Fig. 7B に示すように、ペリンドプリルは *in vitro* での EC の増殖にも影響を及ぼさなかった。これらの結果は、ペリンドプリルによる腫瘍発育抑制効果が肝癌細胞や内皮細胞に対する細胞毒性によるものではないことを示唆している。

#### 5) ペリンドプリルの腫瘍内 ACE 及び VEGF に対する影響

ペリンドプリルによる ACE 活性抑制が主要な血管新生因子である VEGF に影響を与えているかどうかを検討するために、control 群とペリンドプリル投与群の腫瘍内における ACE 活性と VEGF レベルを測定した。Fig. 8 に示すように、control 群の腫瘍内 VEGF レベルに比べて、ペリンドプリル投与群では腫瘍内の VEGF レベルは明らかに減少していた。さらに、control 群に比べ

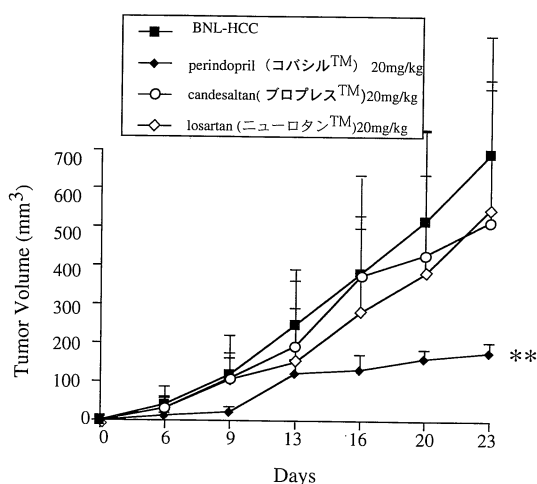


Fig. 4. The effect of perindopril and angiotensin-II type-1 receptor (AT-II-R) antagonists on tumor development. Perindopril and AT-II-R antagonists (candesartan and losartan) were administrated by gavage once daily at 2 and 20 mg/kg/day from 3 days after tumor implantation. (n=6 perindopril group, n=5 AT-II-R antagonists group).

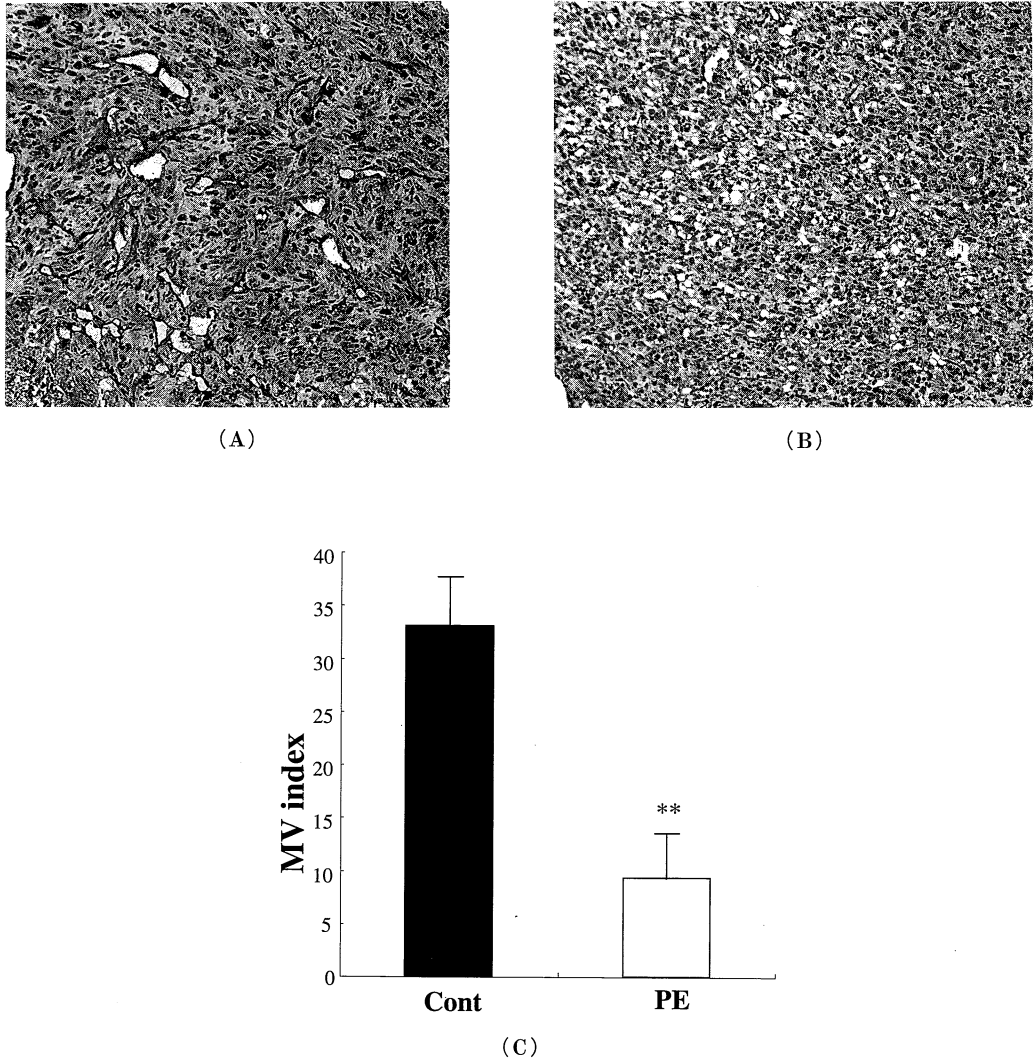


Fig. 5. The effect of perindopril on *in vivo* neovascularization. Tumor vascularization was visualized immunostaining of CD31 vascular endothelial adhesion molecule. (A) BNL-HCC control group. (B) perindopril-treated (2 mg/kg/day) group. (C): Semi-quantitation of the length of CD31-immunopositive vessels. Cont: BNL-HCC control, PE: perindopril-treated (2 mg/kg/day) group. Data represent mean  $\pm$  SD (n=5). \*\* represent significant differences vs. the control group at  $p < 0.01$ .

ペリンドプリル投与群は VEGF とともに ACE 活性も著明に抑制されていた ( $p < 0.01$ )。これらの結果よりペリンドプリルによる腫瘍発育と血管新生の抑制効果が VEGF の抑制によって規定されることが強く示唆され

た。

6) ペリンドプリルの VEGF 誘導腫瘍発育に対する影響

VEGF-OFF 群と VEGF-ON 群及びペリンドプリル

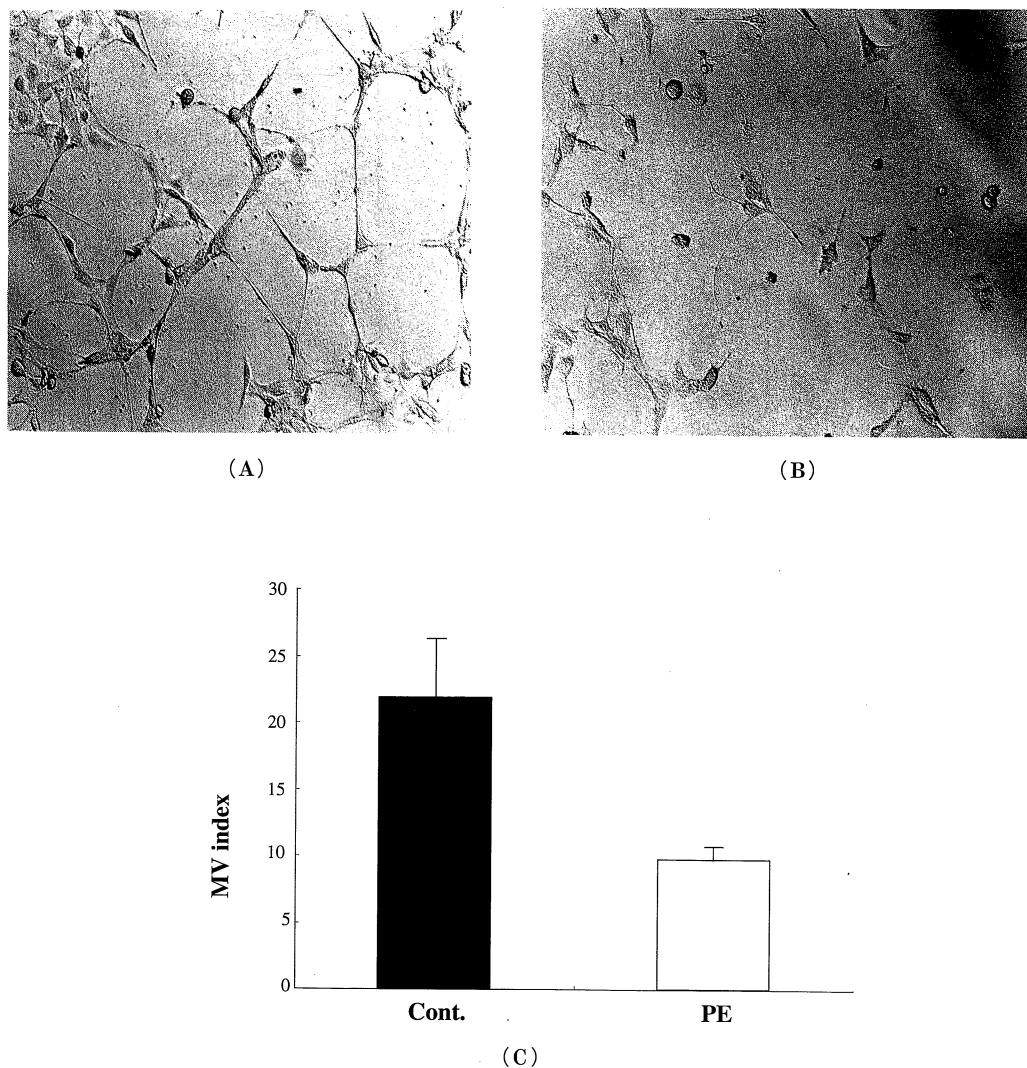


Fig. 6. The effect of perindopril on *in vitro* neovascularization. *In vitro* angiogenesis was evaluated by endothelial tubular formation. (A) BNL-HCC control group. (B) perindopril-treated (2 mg/kg/day) group. C: Semi-quantitation of the length of endothelial tubular formation. Cont: BNL-HCC control, PE & perindopril-treated (2 mg/kg/day) group. Data represents mean  $\pm$  SD (n=5). \*\* represents significant differences vs. the control group at  $p < 0.01$ .

2 mg/kg を投与した群の腫瘍発育の経時的変化を Fig. 9 に示す。これらと比較すると、VEGF-OFF 群とペリンドプリル投与群はほぼ同様の腫瘍発育を示しており、VEGF により増大した腫瘍発育がペリンドプリルの投与によってほぼ抑制されていることが明らかとなった。

この実験結果と先の結果をあわせると、ペリンドプリルの腫瘍抑制は腫瘍内の VEGF 発現を抑制することによるものであると考えられた。

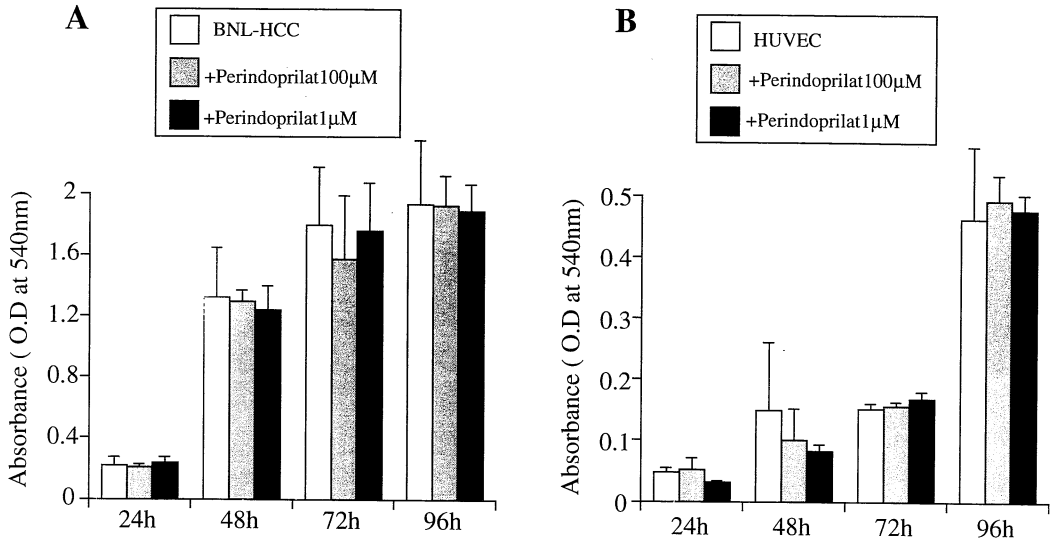


Fig. 7. Effect of perindoprilat on *in vitro* proliferation of the BNL-HCC cells (A) and the endothelial cells (HUVEC) (B). Cell proliferation was measured by the MTT assay after harvest at 24, 48, 72 and 96 hours. Perindoprilat was added into the medium at 1 and 100 μM. Each bar represents the mean ± SD of three separate experiments (n=6 each).

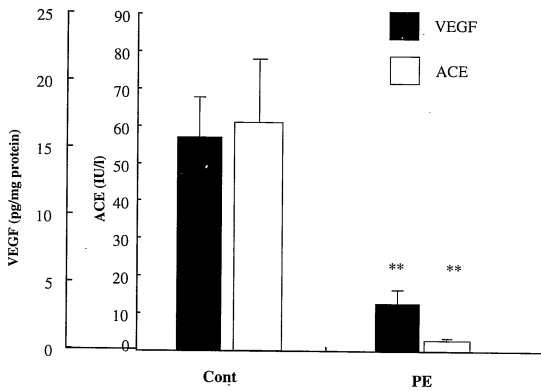


Fig. 8. The VEGF expression level in the tumor. Cont: control. PE: perindopril treated-group (2 mg/kg/day). VEGF level and ACE activity was measured by ELISA, using duplicate samples. Data represent mean ± SD (n=6). \*\* represents significant differences vs. the control group at p < 0.01.

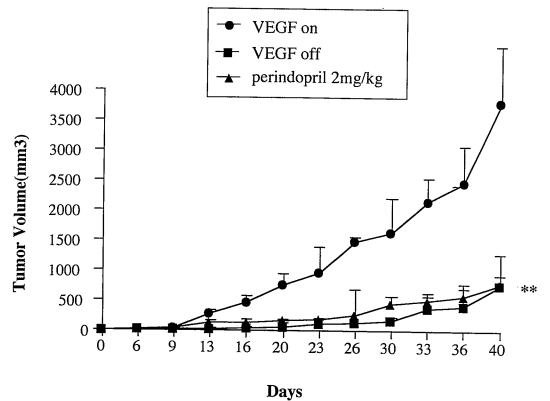


Fig. 9. Regulation of VEGF-mediated tumor development by tetracycline in the Retro-Tet system. VEGF-ON: VEGF-overexpressed in the Tet-VEGF-HCC cells. VEGF-OFF: VEGF expression was suppressed by tetracycline in the drinking water (1 mg/ml). Perindopril was administrated at the dose of 2 mg/kg to the VEGF (+) group.



## 考 察

血管新生が腫瘍発育において重要な役割を担っていることは現在周知の事実であり<sup>1-3)</sup>、腫瘍血管の抑制を目的とした治療は実験動物において腫瘍発育の阻害をもたらることが報告されている<sup>4,5)</sup>。ところで、抗血管新生治療薬は従来の化学療法のような副作用が少なく薬剤耐性を生じにくいという特徴を持っているとされている<sup>4,5)</sup>。従って抗血管新生組み替え蛋白、モノクローナル抗体やその他の薬剤を含め、抗血管新生治療薬の開発が世界中で精力的に行われている。これらのうちの一部は、現在特定の施設で臨床治験が行われているが、残念ながら現段階では臨床応用可能なものはない。実験動物レベルにおいて、これまでも臨床で使用される薬剤の一部において、腫瘍発育や血管新生を抑制することが報告されているが、それらのほとんどが人間の臨床投与量と比べきわめて高用量であり<sup>10,11)</sup>、臨床でこれらの薬剤を使用するのは現実的でないと思われる。ところで、ACE 阻害剤は高血圧やうっ血性心不全に対して骨髄抑制などの強い副作用がなく、一般的に使用されている薬剤である。近年、ACE 阻害剤の投与が発癌、および癌による死亡のリスクを減少させる可能性があるという大規模臨床試験の報告がなされた<sup>12)</sup>。Leber らは、5207 例の高血圧患者について 1980 年より 1995 年までの調査を行い、ACE 阻害剤を投与された患者の癌の発生率や癌による死亡率が、非 ACE 阻害薬服用例と比較して有意に低かったのに対し、他の降圧剤(カルシウム拮抗剤、利尿剤、 $\beta$ -ブロッカー)を投与された患者はこのような抑制効果が認められなかったと報告している<sup>12)</sup>。また近年 ACE 阻害剤の 1 つであるリシノプリルが血管新生の抑制により、I 型糖尿病における網膜症の進行を遅らせることが可能であるという報告もなされている<sup>18)</sup>。動物実験においてもこれまでに、ACE 阻害薬が腎細胞癌、線維肉腫、膵管癌などの移植モデルにおいて腫瘍の発育抑制をきたしたとの報告がある<sup>19-20)</sup>。そこで、本研究において著者は将来の肝癌治療への応用を念頭に置いて、マウス肝癌発育モデルにおいて ACE 阻害剤の効果を検討したところ、ACE 阻害剤のうちベリンドプリルが低濃度において極めて強い腫瘍発育抑制効果を示すことを見いだした。興味深いことに本実験においては、ACE 阻害剤と同様にレニン-アンジオテンシン系の抑制による降圧剤である AT-II-R 受容体拮抗剤では明らかな腫瘍抑制効果は認められなかった。このことよりベリンドプリルの腫瘍抑制のメカニズムは、降圧剤としての作用点である AT-II-R の阻害とは別であると考えられた。ACE 阻害剤と AT-II-R 拮抗剤の生

体内における作用の最大の違いは AT-II 濃度であるとされている。即ち、ACE 阻害剤投与時は、ACE の阻害のため AT-I から II への変換が妨げられ、AT-II 濃度は低下するが、AT-II-R 拮抗剤投与時には AT-II-R の阻害のため AT-II 濃度は逆にフィードバックメカニズムにより上昇するとされている。従って、本研究においては ACE 阻害剤による AT-II 濃度の低下が腫瘍の抑制に関連している可能性が非常に強いと考えられる。現在 AT-II は血圧に対する作用以外にも様々な生物学的作用をもつことが知られている<sup>21)</sup>。そのなかの 1 つに、AT-II の血管新生促進作用がある<sup>21-23)</sup>。AT-II の血管新生に対する作用機序として、最近 AT-II が主要な血管新生因子である VEGF の産生を刺激するという報告がなされている<sup>24)</sup>。現在までに多くの血管新生因子が同定されているが、このうち VEGF は最も強力な血管新生因子であり、血管新生において中心的な役割を担っていることが知られている<sup>23)</sup>。VEGF は 32-42 kd のヘパリン結合領域を持ち、二量体となることで活性を示す、二硫化結合した糖蛋白であり、alternative splicing により数種の同位体を持つ。強い血管透過因子である VEGF は、ヒスタミンの 50000 倍以上のレベルで毛細血管を透過する強い能力を持っている<sup>25)</sup>。実験モデル動物において、VEGF の過剰発現は腫瘍発育を増強し、VEGF の抑制により腫瘍発育が阻害されることが多くの施設より報告されている<sup>26-30)</sup>。実際 VEGF は、ヒトにおける様々なタイプの腫瘍内において著明な発現増加が認められ、その進行性や予後と相関するとされている<sup>8,9,30-32)</sup>。ヒト肝癌においても、VEGF が腫瘍内において肝硬変などの非癌部に比べてその発現が著明に増加していることが報告されている<sup>8,9,30,31)</sup>。さらに VEGF は血管新生因子としての作用のみならず、血管内皮細胞の生存に必須であるいわゆる survival factor であることも示されている<sup>33)</sup>。本研究において、著者はベリンドプリルによる ACE の阻害が腫瘍内での VEGF の抑制と相関する事を見いだした。さらに、遺伝子導入により得られた VEGF による腫瘍の増加をベリンドプリルがほぼ抑制することも明らかとなった。ベリンドプリルは腫瘍内の血管新生を著明に抑制するが、*in vitro* における HCC、EC の増殖に対しては影響を与えないという他の実験結果とあわせて考えると、ベリンドプリルは腫瘍内の AT-II による VEGF 産生を抑制することによる腫瘍発育抑制効果を発揮しているものと考えられた。今回の実験において、カプトプリル、テモカプリル、ベリンドプリルの全ての ACE 阻害剤が腫瘍発育や血管新生を抑制する事が示されたが、このうちベリンドプリルは、他の 2 薬剤よりも強力な抑制効果

を示した。その正確な理由については今後の検討課題であるが、ペリンドプリルは水溶性の薬剤であり、これに対し他の薬剤は脂溶性指向が強いとされている。通常の臓器においては水溶性物質よりも脂溶性物質の方が親和性が高く組織への移行が良好であるとされている。そのなかで、肝細胞膜は特異的に、単純な拡散により通過する脂溶性薬剤よりもはるかに効率よく水溶性物質を通過させる特異的な有機アニオン輸送体を持つ<sup>34,35)</sup>。ペリンドプリルは体内で代謝、活性化された後に有機アニオンとなるとされている。このためにペリンドプリルは他の2薬剤よりも肝に対して高い親和性を持ち、その結果肝腫瘍内で高濃度になっている可能性が高いと思われる。加えて、これらの薬剤の構造上の差も関与していると思われる。カプトプリルはその構造内にSH基を有しているが、このSH基は血管新生に重要なmatrix metalloproteinase(MMP)活性の抑制や酸化ストレスの防御、内因性血管新生阻害因子であるアンジオスタチンの産生などの作用を有することから、本剤の血管新生阻害はACE活性の阻害ではなく、これらの作用によると考えられている<sup>14,36)</sup>。一方、他のACE阻害剤であるキナプリルは、虚血再還流実験のウサギモデルにおいて血管新生を逆に促進する事が示されている<sup>37)</sup>。以上のようにACE阻害剤の血管新生阻害は、AT-IIの抑制によると考えられるものの、個々の薬剤による薬理作用が異なることが想定される。ペリンドプリルは骨髄抑制などの重篤な副作用がほとんどなく、降圧剤として100カ国以上で広く使用されている薬剤である。本研究においてペリンドプリルは低用量においても著明な血管新生阻害を伴う腫瘍抑制効果を認めたことよりペリンドプリルの肝癌に対する、抗血管新生剤としての将来の臨床応用の可能性が期待される。

結 語

マウス肝癌腫瘍発育に対するACE阻害剤の効果を検討し、以下の結果を得た。

1. マウス皮下肝癌発育に対しペリンドプリル、テモカプリル、カプトプリルのACE阻害剤は有意な腫瘍発育の抑制効果を認めた。その中でペリンドプリルは最も強い抑制効果を示し、その作用は2mg/kgという低用量においても認められた。さらに、ペリンドプリルの腫瘍抑制効果は、すでに腫瘍が十分に発育した後に投与を開始しても認められた。これに対しAT-II-R拮抗剤は有意な腫瘍発育抑制を認めなかった。

2. ペリンドプリルは*in vivo*, *in vitro*において著明な血管新生抑制作用を示した。この抑制作用は、ペリ

ンドプリルがECの増殖能に対し影響を与えなかったことより、内皮細胞に対する毒性効果によるものではないと考えられた。またペリンドプリルは肝癌細胞に対しても、その増殖能に影響を与えなかった。

3. 腫瘍内のVEGF濃度はペリンドプリル投与により著明に減少し、VEGF濃度とACEの阻害活性には密接な相関が認められた。

以上より、ペリンドプリルの腫瘍発育抑制効果は腫瘍内のVEGFを抑制して、血管新生を阻害することに起因することが示唆された。

(本論文の要旨の一部は、第58回日本癌学会総会、第3回日本肝臓学会大会、第36回日本肝臓学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました福井 博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言をいただきました腫瘍病理学教室小西陽一教授ならびに第1外科学教室中野博重教授に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたり常に御指導、御助力をいただきました吉治仁志博士に感謝いたします。また、終始、御協力いただきました第3内科学教室の諸兄に感謝の意を表します。)

文 献

- 1) Fidler, I. J. and Ellis, L. M. : The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79** : 185-8, 1994.
- 2) Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. : The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18** : 4-25, 1997.
- 3) Folkman, J. : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1** : 27-31, 1995.
- 4) Ferrara, N. and Alitalo, K. : Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* **5** : 1359-64, 1999.
- 5) Lau, K. and Bicknell, R. : Antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther.* **6** : 1793-1795, 1999.
- 6) Yamanaka, N., Okamoto, E., Toyosaka, A., Mitunobu, M., Fujihara, S., Kato, T., Fujimoto, J., Oriyama, T., Furukawa, K. and Kawamura, E. : Prognostic factors after hepatectomy for hepatocellular carcinomas. A univariate and multivariate analysis. *Cancer.* **65** : 1104-10, 1990.

- 7) Okuda, K., Musha, H., Nakajima, Y., Kubo, Y., Shimokawa, Y., Nagasaki, Y., Sawa, Y., Jinnouchi, S., Kaneko, T., Obata, H., Hisamitsu, T., Motoike, Y., Okazaki, N., Kojiro, M., Sakamoto, K. and Nakashima, T. : Clinicopathologic features of encapsulated hepatocellular carcinoma : a study of 26 cases. *Cancer* **40** : 1240-5, 1977.
- 8) Mise, M., Arai, S., Higashitani, H., Furutani, M., Niwano, M., Harada, T., Ishigami, S., Toda, Y., Nakayama, H., Fukumoto, M., Fujita, J. and Imamura, M. : Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology*. **23** : 455-64, 1996.
- 9) Miura, H., Miyazaki, T., Kuroda, M., Oka, T., Machinami, R., Kodama, T., Shibuya, M., Makuuchi, M., Yazaki, Y. and Ohnishi, S. : Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **27** : 854-61, 1997.
- 10) Ono, M., Kawahara, N., Goto, D., Wakabayashi, Y., Ushiro, S., Yoshida, S., Izumi, H., Kuwano, M. and Sato, Y. : Inhibition of tumor growth and neovascularization by an anti-gastric ulcer agent, irsogladine. *Cancer Res.* **56** : 1512-6, 1996.
- 11) Brem, S. S., Zagzag, D., Tsanacis, A. M., Gately, S., Elkouby, M. P. and Brien, S. E. : Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am. J. Pathol.* **137** : 1121-42, 1990.
- 12) Lever, A. F., Hole, D. J., Gillis, C. R., McCallum, I. R., McInnes, G. T., MacKinnon, P. L., Meredith, P. A., Murray, L. S., Reid, J. L. and Robertson, J. W. : Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* **352** : 179-84, 1998.
- 13) Chen, L., Re, R. N., Prakash, O. and Mondal, D. : Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196** : 280-3, 1991.
- 14) Volpert, O. V., Ward, W. F., Lingem, M. W., Chesler, L., Solt, D. B., Johnson, M. D., Molteni, A., Polverini, P. J. and Bouck, N. P. : Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J. Clin. Invest.* **98** : 671-9, 1996.
- 15) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ways, D. K., Yoshii, J., Miyamoto, Y., Kawata, M., Ikenaka, Y., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Shibuya, M. and Fukui, H. : Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res.* **59** : 4413-8, 1999.
- 16) Carlsson, G., Gullberg, B. and Hafstrom, L. : Estimation of liver tumor volume using different formulas-An experimental study in rats. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* **105** : 20-23, 1983.
- 17) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Yamazaki, M., Kikukawa, M., Tsujinoue, H., Nakatani, T. and Fukui, H. : Vascular endothelial growth factor tightly regulates In vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **28** : 1489-96, 1998.
- 18) Chaturvedi, N., Sjolie, A. K., Stephenson, J. M., Abrahamian, H., Keipes, M., Castellarin, A., Rogulja-Pepeonik, Z. and Fuller, J. H. : Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. *EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Lancet* **351** : 28-31, 1998.
- 19) Hii, S. I., Nicol, D. L., Gotley, D. C., Thompson, L. C., Green, M. K. and Jonsson, J. R. : Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **77** : 880-3, 1998.
- 20) Reddy, M. K., Baskaran, K. and Molteni, A. : Inhibitors of angiotensin-converting enzyme modulate mitosis and gene expression in pancreatic cancer cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **210** : 221-6, 1995.
- 21) Fernandez, L. A., Twickler, J. and Mead, A. : Neovascularization produced by angiotensin II. *J. Lab. Clin. Med.* **105** : 141-5, 1985.
- 22) Le Noble, F. A., Hekking, J. W., Van Straaten, H. W., Slaaf, D. W. and Struyker Boudier, H.

- A. : Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Eur. J. Pharmacol.* **195** : 305-6, 1991.
- 23) Williams, B., Baker, A. Q., Gallacher, B. and Lodwick, D. : Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **25** : 913-7, 1995.
- 24) Krishna, P. S., Nakata, M., Nakajima, T., Kitajima, I. and Maruyama, I. : Increased production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by angiotensin II. *Neurosci. Res. Commun.* **25** : 79-88, 1999.
- 25) Fox, S. B., Gatter, K. C. and Harris, A. L. : Tumour angiogenesis. *J. Pathol.* **179** : 232-7, 1996.
- 26) Potgens, A. J., van Altena, M. C., Lubsen, N. H., Ruiter, D. J. and de Waal, R. M. : Analysis of the tumor vasculature and metastatic behavior of xenografts of human melanoma cell lines transfected with vascular permeability factor. *Am. J. Pathol.* **148** : 1203-17, 1996.
- 27) Yoshiji, H., Harris, S. R. and Thorgeirsson, U. P. : Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **57** : 3924-8, 1997.
- 28) Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. and Ferrara, N. : Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362** : 841-4, 1993.
- 29) Saleh, M., Stacker, S. A. and Wilks, A. F. : Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res.* **56** : 393-401, 1996.
- 30) Chow, N. H., Hsu, P. I., Lin, X. Z., Yang, H. B., Chan, S. H., Cheng, K. S., Huang, S. M. and Su, I. J. : Expression of vascular endothelial growth factor in normal liver and hepatocellular carcinoma : an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* **28** : 698-703, 1997.
- 31) Suzuki, K., Hayashi, N., Miyamoto, Y., Yamamoto, M., Ohkawa, K., Ito, Y., Sasaki, Y., Yamaguchi, Y., Nakase, H., Noda, K., Enomoto, N., Arai, K., Yamada, Y., Yoshihara, H., Tujimura, T., Kawano, K., Yoshikawa, K. and Kamada, T. : Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **56** : 3004-9, 1996.
- 32) Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M. and Thorgeirsson, U. P. : Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* **56** : 2013-6, 1996.
- 33) Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J. and Keshet, E. : Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* **1** : 1024-8, 1995.
- 34) 杉山雄一 : 有機アニオンおよび胆汁酸類の肝胆系移送—血中アルブミンから胆汁酸へ—. *肝胆臓* **21** : 721-737, 1990.
- 35) 杉山雄一, 山崎雅代 : HMG-CoA 還元酵素阻害薬, プラバスタチンの肝細胞への取り込み : 有機アニオン輸送系との関連. *Prog. Med.* **11** : 2397-2403, 1991.
- 36) Gately, S., Twardowski, P., Stack, M. S., Cundiff, D. L., Grella, D., Castellino, F. J., Enghild, J., Kwaan, H. C., Lee, F., Kramer, R. A., Volpert, O., Bouck, N. and Soff, G. A. : The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiotatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** : 10868-72, 1997.
- 37) Fabre, J. E., Rivard, A., Magner, M., Silver, M. and Isner, J. M. : Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* **99** : 3043-9, 1999.