

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※ Integrin $\alpha v \beta 3$ 對抗劑對於神經膠質瘤 ※

※ 引起的血管生成的作用 ※

✧ The Effects of Integrin $\alpha v \beta 3$ Antagonist ✧

✂ on the Glioma-induced Angiogenesis ✂

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：NSC89-2314-B-002-180-

執行期間： 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：林 瑞 明

共同主持人：曾 勝 弘

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院外科

中 華 民 國 89 年 10 月 5 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
Integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑對於神經膠質瘤引起的血管生成的作用
The Effects of Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonist
on the Glioma-induced Angiogenesis

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-180

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：林瑞明 國立台灣大學醫學院外科

共同主持人：曾勝弘 國立台灣大學醫學院附設醫院外科部

一、中文摘要

本研究計畫主要在探討 integrin $\alpha_v\beta_3$ 在神經膠質瘤引起之血管生成上所扮演的角色，並研究 integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑對於 angiogenic blood vessels 的作用及對於神經膠質瘤的療效。

首先針對 RT-2 神經膠質瘤細胞作 integrin $\alpha_v\beta_3$ 的免疫細胞學分析，結果發現 RT-2 細胞沒有表現 $\alpha_v\beta_3$ ，再將 RT-2 神經膠質瘤細胞植入 Fischer 大鼠皮下，在第 2、3、4 週時將腫瘤取下，作同樣的檢查，結果發現腫瘤中的血管細胞有較明顯的 β_3 的表現，但 α_v 的表現較不明顯。Western blot 分析也獲得相同的結果。以 1 μ M 的 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) 與 10^6 的 RT-2 細胞混合打入大鼠皮下，結果發現 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑對於 RT-2 腫瘤的生長並無抑制作用，植入腫瘤後的不同時間點的腫瘤大小與對照組並無顯著的差異，取出腫瘤進行組織學檢查，結果發現二組之間的血管數目無明顯差異，顯示 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) 對於 RT-2 神經膠質瘤的血管增生並無影響。後續我們將進一步以其他對抗劑或 $\alpha_v\beta_3$ 抗體來進行研究。

關鍵詞：血管生成，神經膠質瘤，integrin $\alpha_v\beta_3$ ，integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑，治療效果

Abstract

The purpose of this project is to investigate the role of integrin $\alpha_v\beta_3$ in the glioma-induced angiogenesis, and the effects

of integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists on the angiogenic blood vessels and the gliomas.

Immunohistochemical analyses revealed no expression of the integrin $\alpha_v\beta_3$ in the RT-2 glioma cells. However, there was significant expression of β_3 , in the endothelial cells of the tumor vessels at week 2, 3, and 4 after glioma cell implantation to the subcutaneous tissue of the rats. Western blot analysis showed similar results. Mixture of the 1 μ M $\alpha_v\beta_3$ antagonist cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) and 10^6 RT-2 cells was implanted to the subcutaneous tissue of the rats to observe the tumor growth rate of the RT-2 cells. The results showed there was no difference of the tumor growth rate between the experimental and control groups. Histological studies showed no difference of the number of the vessels between these two groups, which indicated that the $\alpha_v\beta_3$ antagonist cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) had no effect on the angiogenesis of the RT-2 glioma. Further studies using $\alpha_v\beta_3$ antibody or other kinds of $\alpha_v\beta_3$ antagonists were necessary for the clarification of the role of in the angiogenesis of the glioma and the therapeutic application of the inhibitor of $\alpha_v\beta_3$ in the treatment of gliomas.

Keywords: angiogenesis, glioma, integrin $\alpha_v\beta_3$, integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist, therapeutic effects

二、緣由與目的

血管生成(angiogenesis)會促進腫瘤的生長及轉移，視網膜病變(retinopathy)，及

各種不正常的發炎反應 [1,10,25]。腫瘤的血管生成會提供腫瘤生長所須的養分，並且也提供腫瘤細胞轉移所須的管道，在乳癌及攝護腺癌，腫瘤中的血管數目與病人的預後有關 [23,24]；同樣的，惡性神經膠質瘤是所有的惡性腫瘤中，血管生成現象最明顯的一種，其腫瘤中的血管數目與腫瘤的惡性度有關 [2,3]。

血管生成受到一些因素的影響，而這些因素不只與血管細胞的增殖分裂有關，也會調控這些細胞的 invasion 及新生血管的分化 [11]。許多 cytokine 及 growth factor 會引起血管生成 [16,20]，此外，Integrin $\alpha_v\beta_3$ 與腫瘤的血管生成的關係也很密切，包括 melanoma、肺癌、胰臟癌、喉癌及乳癌等 [4-6]。神經膠質瘤細胞會表現包括 integrin $\alpha_v\beta_3$ 在內的多種 integrin 及 extracellular matrix (ECM)；神經膠質瘤的 invasion 也與 integrin family 中的多種 adhesion molecule 有關 [12,15,19,21,22]。刺激神經膠質瘤細胞表面的 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 及其 proteolytic activity，會改變 ECM 的組成及細胞表面 adhesion receptor 的表現，因此會改變神經膠質瘤細胞的 migration，而這種作用會受到 integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑的抑制，[9]。Integrin $\alpha_v\beta_3$ 也和其血管生成有密切的關係，惡性神經膠質瘤有相當明顯的血管生成，其腫瘤中的血管數目與腫瘤的惡性度有關 [2,3]，而 integrin $\alpha_v\beta_3$ 與血管生成有密切的關係，文獻上已有報告證明一些血管生成的對抗劑會抑制腫瘤的生長 [8,13,14,17,18,26]。在神經膠質瘤對於 brain aggregates 的 invasiveness 的研究中，integrin $\alpha_v\beta_3$ 抗體對於 glioma tissue 的 invasiveness 有明顯的抑制作用 [21]。

整體而言，integrin $\alpha_v\beta_3$ 不只是神經膠質瘤及血管的標記(marker)而已，也在神經膠質瘤的生長，invasiveness，及血管生成扮演重要角色。此外，integrin $\alpha_v\beta_3$ 有一些特性，可作為神經膠質瘤治療上的標的(target)：(1)它只會在新生血管表現，不會在 pre-existing quiescent blood vessel 表現，(2)它的抗體或對抗劑會破壞 tumor-associated angiogenesis，(3)它的對抗劑會破壞 ECM-mediated survival signal，抑制 angiogenic endothelial cell 的 invasion 及

proliferation [7]。神經膠質瘤是最常見的原發性腦瘤，其預後相當不好，因此對於神經膠質瘤研究一新的、有效的治療方法一直是大家努力的目標。我們擬在本研究計畫中探討 integrin $\alpha_v\beta_3$ 在 *in vitro* 神經膠質瘤細胞及 *in vivo* 神經膠質瘤細胞及內皮細胞的表現，並且在動物實驗以 integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑治療神經膠質瘤，觀察其療效。這方面的研究尚未有文獻報告過，如果研究證明以 integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑治療神經膠質瘤確實有效，則將為惡性腦瘤的治療提供一新的治療方式，希望將來能真正應用在臨床上惡性腦瘤的治療，造福人群。

三、結果與討論

本研究計畫主要在探討 integrin $\alpha_v\beta_3$ 在神經膠質瘤引起之血管生成上所扮演的角色，並研究 integrin $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑對於神經膠質瘤及 angiogenic blood vessels 的作用。

首先針對 RT-2 cell culture 作 integrin $\alpha_v\beta_3$ 的免疫細胞學分析，結果發現 RT-2 細胞沒有表現 $\alpha_v\beta_3$ ，再將 RT-2 神經膠質瘤細胞植入 Fischer 大鼠皮下，分別在 1, 2, 3, 4 週後取出腫瘤，以免疫組織學分析 integrin $\alpha_v\beta_3$ 在 RT-2 神經膠質瘤的表現，結果發現在第 2, 3, 4 週時腫瘤中的血管細胞有較明顯的 β_3 的表現，但 α_v 的表現較不明顯。Western blot 分析也獲得相同的結果。所以我們證明了神經膠質瘤細胞不會表現 $\alpha_v\beta_3$ ，但在生物體內的生長的腫瘤中的血管細胞會表現 $\alpha_v\beta_3$ ，這表示 $\alpha_v\beta_3$ 在 RT-2 神經膠質瘤的血管增生扮演重要角色。接著在 cell culture 進行 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑(cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-))對於 RT-2 細胞毒性的研究，以 MTT test 來觀察，結果發現 1 μ M 是此對抗劑不影響 RT-2 細胞的增殖分裂的最高濃度。緊接著，我們再進行動物實驗，以 1 μ M 的 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)與 10^6 的 RT-2 細胞混合打入大鼠皮下，觀察腫瘤的生長情況及大鼠的存活，結果發現 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑對於 RT-2 腫瘤的生長並無抑制作用，植入腫瘤後的不同時間點的腫瘤大小與對

照組並無顯著的差異,取出腫瘤進行組織學檢查,二組之間的血管數目並無明顯差異,這顯示 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)對於 RT-2 神經膠質瘤的血管增生並無影響。後續我們將進一步以其他對抗劑或 $\alpha_v\beta_3$ 抗體來進行研究,以了解 integrin $\alpha_v\beta_3$ 在神經膠質瘤的生長及其血管生成上扮演的角色,及 $\alpha_v\beta_3$ 的抑制是否會影響神經膠質瘤的生長及將來臨床上的可行性。

四、計畫成果自評

本計畫的進行初期相當順利,但是在動物實驗部份未能獲得正面的結果,雖經多方面的檢討改進,仍未証明 $\alpha_v\beta_3$ 對抗劑對於 RT-2 腫瘤的生長有抑制作用,所以將來有待繼續努力,研究其他對抗劑或 $\alpha_v\beta_3$ 抗體對於神經膠質瘤的生長及其血管生成的作用。

五、參考文獻

1. Blood CH, et al: Biochem Biophys Acta 1032: 89-118, 1990.
2. Brem S, et al: J Natl Cancer Inst 48: 347-356, 1972.
3. Brem S: Clin Neurosurg 23:440-453, 1976.
4. Brooks PC, et al: Science 264: 569-571, 1994.
5. Brooks PC, et al: Cell 79: 1157-1164, 1994.
6. Brooks PC, et al: J Clin Invest 96:1815-1822, 1995
7. Chers DA: Nature Med 4: 395-396, 1998.
8. D'Amato RJ, et al: Proc Natl Acad Sci USA 91:4082-4085, 1994.
9. Deryugina EI, et al: J Cell Sci 110: 2473-2482, 1997.
10. Folkman J: Semin Cancer Biol 3: 65-71, 1992.
11. Friedlander M, et al: Science 270: 1500-1502, 1995.
12. Giese A, et al: Anticancer Res 18: 2435-2448, 1998.
13. Ingber D, et al: Nature 348: 555-557, 1990.
14. Maione TE, et al: Science 247:77-79, 1990.
15. Malek-Hedayat S, et al: J Neurosci Res 31: 470-478, 1992.
16. Maxwell PB, et al: Cancer Res 51:1345-1351, 1991.
17. Millauer B, et al: Nature 367:576-579, 1994.
18. O'Reilly MS, et al: Cell 79:315-328, 1994.
19. Paulus W, et al: J Neurosurg 80: 515-519, 1994.
20. Plate KH, et al: Nature 359: 845-848, 1992.
21. Tonn JC, et al: Anticancer Res 18: 2599-2606, 1998.
22. Umezawa K, et al: Brain Res 659: 23-32, 1994.
23. Weidner N, et al: J Natl Cancer Inst 84: 1875-1887, 1992.
24. Weidner N, et al: J Natl Cancer Inst 143: 401-409, 1993.
25. Weinstein-Saslow D, et al: FASEB J 8: 401-407, 1994.
26. Yuan F, et al: Proc Natl Acad Sci USA 93:14756-14770, 1996.