

マウス扁平上皮癌の増殖に対する iNOS 阻害薬の影響

堤 陽一

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山 三郎 教授)

(受付：2003年12月18日)

(受理：2004年1月6日)

Abstract : Angiogenesis is associated with tumor growth and metastasis in patients with solid tumors, including those of the head and neck. Nitric oxide (NO) production may contribute to these processes. NO production in the tumor depends on the iNOS. 1400W is the most selective iNOS inhibitor and strongly prevents NO production by the iNOS. In the present study, the effect of 1400W on tumor-induced angiogenesis and tumor proliferation was examined using a weakly immunogenic squamous cell carcinoma of the WHT/Ht mouse.

1400W inhibited the angiogenesis induced by the murine tumor dose-dependently, and the number of blood vessels orientated towards the intradermal tumor was maximally reduced by 62.5% compared to the control. In the tumor proliferation assay, 1400W significantly inhibited proliferation of the subcutaneously inoculated tumor, and reduced the tumor volume by 60.0% (20 mg/kg) and 75.7% (10mg/kg) compared to the control. Subcutaneously inoculated tumors were observed by the Immunohistochemistry and Western blot analysis, and iNOS and VEGF expression was lowered with administration of 1400W compared to the control.

These results suggest that 1400W has significant inhibitory activities against in vivo tumor-induced angiogenesis and proliferation of murine squamous cell carcinoma.

Key words : angiogenesis, selective iNOS inhibitor, 1400W, murine squamous cell carcinoma

緒 言

一酸化窒素 (NO) は、内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) の本体として同定され¹⁾、循環系のみならず免疫系や神経系においても多彩な生理機能をもつ生理活性物質であるが、一方で多くの疾病の発症ならびに進展に深く関わっている²⁾。生体内での NO 生成は NO 合成酵素 (NOS) が担っており、その酵素学的特性や酵素タンパク質の一次構造の解析により、NOS には、神経型

NOS (nNOS)、血管内皮型 NOS (eNOS)、誘導型 NOS (iNOS) の3種のアイソザイムが存在することが分っている³⁾。一般に、活性がカルシウムシグナルによって制御される nNOS や eNOS は生理機能の維持に必要な少量の NO を産生するのに対し、病的刺激によって誘導される iNOS は持続的に大量の NO を産生し、様々な生体障害作用を示すと考えられている³⁾。

近年、ヒト前癌病変や癌組織で、iNOS が発現している例が数多く報告されている⁴⁻⁶⁾。

Effect of iNOS inhibitor on proliferation of murine squamous cell carcinoma

Yoichi Tsursumi

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, morioka, Iwate 020-8505 Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 29 : 24-32, 2004

iNOS は、主として癌組織に浸潤した免疫細胞や血管内皮細胞、および癌細胞自身に発現しており、iNOS によって過剰に産生された NO は、血管の拡張、透過性および新生を促進して癌細胞への栄養、酸素の補給を容易にする。iNOS は正常組織では発現していないため、3種の NOS アイソザイムのうち腫瘍に発現した iNOS を選択的に阻害すれば正常組織への影響が少なく癌の増殖を抑制できる可能性が期待される。しかし、これまで NOS 阻害薬を用いた研究は非特異的 NOS 阻害薬を用いたものが多く、in vivo において腫瘍に対する選択的 iNOS 阻害薬の影響について検討したものは極めて少ない⁷⁾。特に扁平上皮癌に対して選択的 iNOS 阻害薬を用いて検討したという報告は渉猟し得る範囲では見当たらなかった。

そこで本研究では近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した移植可能な扁平上皮癌の増殖と血管新生および腫瘍中の血管内皮増殖因子 (VEGF) に対する選択的 iNOS 阻害薬の影響について検討した。

材料および方法

1. 実験動物

岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座にて兄妹交配により、近交系として維持している WHT/Ht マウス⁸⁾の雌性、8~12週齢、体重24~26g のものを1群あたり5匹として使用し、固形飼料 (オリエンタル酵母工業) と水を自由に与え飼育した。

2. 腫瘍

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生し、tumorigenic dose rate 50 (TD₅₀) 値が14.4⁹⁾と極めて低免疫原性で継代移植可能な扁平上皮癌を使用した。

3. 細胞浮遊液の調整

近交系 WHT/Ht マウスに継代移植している腫瘍をマウスから無菌的に摘出し、滅菌した少量の phosphate buffer saline (以下 PBS) で洗浄後、剪刀で細切し、PBS を加えて攪拌した後、#150白金 mesh で濾過した。PBS を用い

て800rpm で3回遠心洗浄し、血球計算板上で生細胞数を算定した後、PBS で 1×10^6 個 / 0.1 ml に調製して使用した。生細胞数の算定は0.2% トリパンブルー染色した標本を用いて行い、細胞の viability が90%以上のものを使用した。

4. 使用薬剤

選択的 iNOS 阻害薬として、これまで報告のある化合物のうちで3種類のアイソザイムに対する Ki 値 (阻害定数) の比較から、iNOS に対して最も特異性が高いとされる 1400W (N-(3-(Aminomethyl) benzyl) acetamidine, dihydrochloride, Cayman Chemical)^{7,10)} を使用した。1400W は PBS に溶解し、1400W の濃度は第1群は10mg/kg、第2群は20mg/kg とし、濃度の調節は PBS を用いて行った。対照群には PBS を使用した。

5. 血管新生に対する1400W の影響

腫瘍細胞により誘導される血管新生に対する1400W の影響を Kreisle and Ershler の方法¹¹⁾ に準じて検討した。PBS にて 1×10^6 個 / 0.1ml に調整した腫瘍細胞浮遊液を、剃毛したマウスの脇腹部皮内2か所へ移植し、これを0日とした。腫瘍移植後、1日目、2日目に1400W を各濃度で背部皮下に投与し、腫瘍移植後3日目にマウスを屠殺した。誘導された血管新生を評価するため腹部中央より皮膚を切開し、腫瘍の生着した皮膚を皮下組織より剥離し、移植部周囲の生体血管より腫瘍に向かって走行する血管の数を手術用顕微鏡 (20倍, Carl Zeiss) を用いて測定し、2か所の平均血管数を求めた。同時に腫瘍のサイズを評価するため長径(a)と短径(b)をノギスを用いて測定し、腫瘍体積を $a \times b^2 \times 0.5$ の式より算出し、2か所の平均腫瘍体積を求めた。

6. 腫瘍増殖に対する1400W の影響

PBS にて 1×10^6 個 / 0.1ml に調整した腫瘍細胞浮遊液を、剃毛したマウスの背部皮下へ移植し、腫瘍の触知が可能となる長径7mmに達した時点をも0日とした。この時点から1400W を各濃度で8時間毎に計21回 (7日間) 腹腔内投与し、腫瘍の長径と短径を経日的に測定し、腫瘍

体積を前述の式より算出した。1400W の投与開始から 7 日目にマウスを屠殺し腫瘍重量を測定した。

7. 腫瘍細胞における iNOS と VEGF の発現

摘出した腫瘍中の iNOS および VEGF の発現を免疫組織化学的染色法およびウエスタンブロット法を用いて追究した。

8. 免疫組織化学的染色法による iNOS および VEGF の発現の追究

摘出した組織を 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定した。通法に従いアルコール上昇系列で脱水、パラフィンに包埋し、4 μ m に薄切してシランコート処理されたスライドガラス上にのせ標本を作製した。標本を通法にしたがって脱パラフィン後、0.1% Tween 20 添加 PBS (以下 PBS-T) にて 5 分間、3 回洗浄した。0.3% 過酸化水素添加メタノール液で 15 分間内因性ペルオキシダーゼを除去し、PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、非特異的反応を阻害するために 10% ヤギ正常血清で 20 分間ブロッキングした。PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、一次抗体として抗 iNOS ポリクローナル抗体 (M-19, Santa Cruz Biotechnology, 200 倍希釈)、抗 VEGF ポリクローナル抗体 (A-20, Santa Cruz Biotechnology, 200 倍希釈) を使用し、室温にて 1 時間反応させた。PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (ヒストファイン SAB-PO(R)キット, ニチレイ) を室温にて 30 分間反応させた。PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、酵素試薬としてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ヒストファイン SAB-PO(R)キット, ニチレイ) を使用し、室温で 10 分間反応させた。発色には 3,3'-ジアミノベンチジン (ヒストファイン DAB 基質キット, ニチレイ) を用い、対比染色はマイヤーのヘマトキシリンで行った。

9. ウエスタンブロット法による iNOS および VEGF の発現の追究

摘出した腫瘍の一部を極少量の PBS を加え剪刀にて細切し、#150 白金 mesh で濾過洗浄後、細胞溶解液 (1.0% Triton X-100 添加

PBS) 中でホモジナイズした。これを 4°C, 10,000 \times g, 15 分間遠心分離し、上清を蛋白抽出液とした。抽出液の蛋白濃度は Bradford 法に基づき測定した。蛋白量 20 μ g に相当する遠心上清を 10% のポリアクリルアミドゲル (e・パジェル E-T10L, ATTO) を用いて電気泳動 (SDS-PAGE) 後、ゲル中の蛋白を PVDF 膜 (Clear Blot Membrane-p, ATTO) に転写し、5% スキムミルクを含む 0.05% Tween 20 添加 PBS (以下 PBS-T) にて非特異的反応をブロッキングした。PBS-T にて 15 分間、3 回洗浄後、一次抗体として抗 iNOS ポリクローナル抗体 (M-19, Santa Cruz Biotechnology, 1,000 倍希釈)、抗 VEGF ポリクローナル抗体 (A-20, Santa Cruz Biotechnology, 1,000 倍希釈) を使用し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T にて 15 分間、3 回洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (HAF-012-1, EY LABORATORIES, 1,000 倍希釈) を使用し、室温で 1 時間反応させた。検出は ECL (Enhanced Chemiluminescence) 法に基づき ECL Western Blotting analysis system (Amersham Biosciences) を使用して暗室にて行った。感光用フィルムは、ECL 系の発光波長に一致した特性をもつ Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) を使用した。

10. マウスの体重に対する 1400W の影響

全身毒性の評価の指標として、腫瘍細胞を背部に移植した各群のマウスにおける屠殺時の体重を測定した。

11. 統計学的検討

統計学的処理は Fisher's PLSD で行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

結 果

1. 血管新生に対する 1400W の影響

腫瘍移植後 3 日目において、移植部周囲の生体血管より分岐し、腫瘍に向かって走行する血管の数は、1400W を投与した第 1 群 (10mg/kg) では対照群の 82.7%、第 2 群 (20mg/kg) では 62.5% であり、各群間に有意な差異 ($p < 0.05$)

Table 1. Effect of 1400W on angiogenesis induced by squamous cell carcinoma.

Experimental group	Dose (mg/kg)	Tumor volume (mm ³) (mean ± S.D.)	No. of blood vessels (mean ± S.D.)
Control	—	62.4 ± 9.4	16.8 ± 0.8
Group 1	10	48.8 ± 7.1	13.9 ± 1.7
Group 2	20	41.1 ± 5.0	10.5 ± 1.0

Table 1. Effect of 1400W on angiogenesis induced by squamous cell carcinoma.

The statistical significance of differences between the groups was determined by applying Fisher's PLSD. (*p < 0.05).

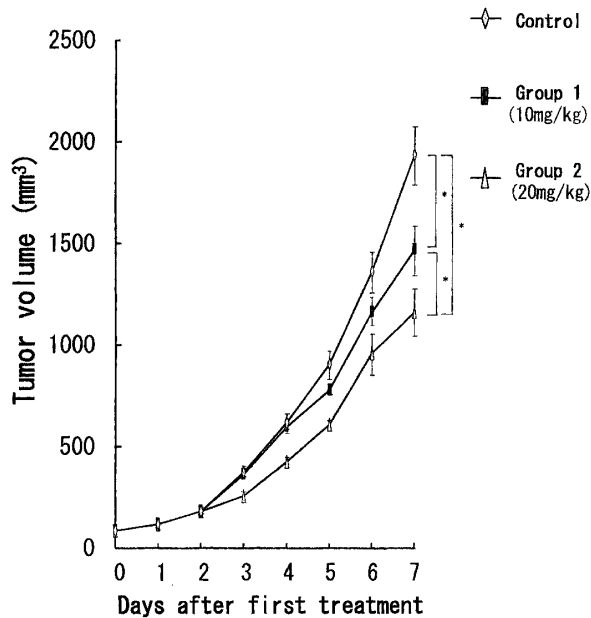


Fig. 1. Effect of 1400W on proliferation of murine squamous cell carcinoma. Each point represents tumor volume. Vertical bars indicate standard deviation. The statistical significance of differences between the groups was determined by applying Fisher's PLSD. (*p < 0.05).

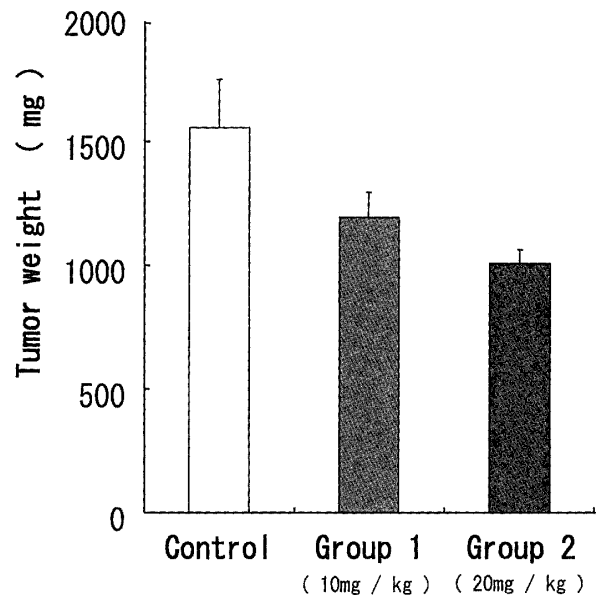


Fig. 2. The actual tumor weight proliferating in the WHT/Ht mice on day 7. Each bar represents the mean ± standard deviation. The statistical significance of differences between the groups was determined by applying Fisher's PLSD. (*p < 0.05).

を認めた。また、この時点における平均腫瘍体積は第1群では対照群の78.2%、第2群では65.8%であり1400Wが血管新生を抑制すると同時に腫瘍の増殖も有意に抑制することが示唆された (p < 0.05)。また、この実験群における1400Wの有意な血管新生抑制効果および腫瘍増殖抑制効果はともに第2群 (20mg/kg) で最

も著明であった (Table 1)。

2. 腫瘍増殖に対する1400Wの影響

腫瘍は移植後ほぼ球状に増殖し、その長径は6日目に7mmに達した。この時点より1400Wの投与を開始し、腫瘍体積は第1群では投与開始後5日目、第2群では3日目より対照群と比較して有意な差異 (p < 0.05) を認めた。1400W

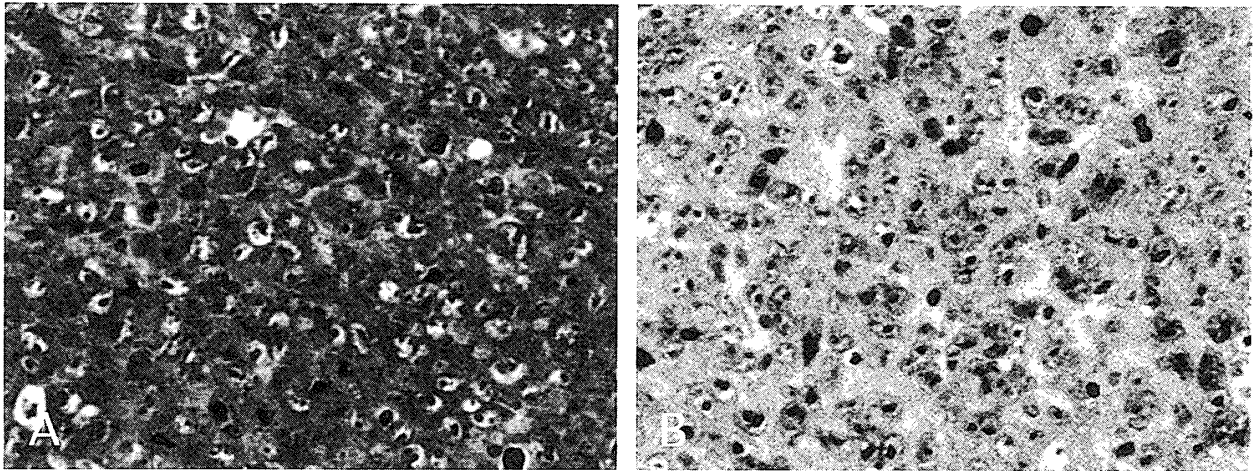


Fig. 3. Immunohistochemistry of iNOS in murine squamous cell carcinoma. iNOS protein is strongly expressed in tumor from a mouse that was treated with phosphate buffer saline (A). iNOS protein is poorly expressed in tumor from a mouse that was treated with 1400W (B).

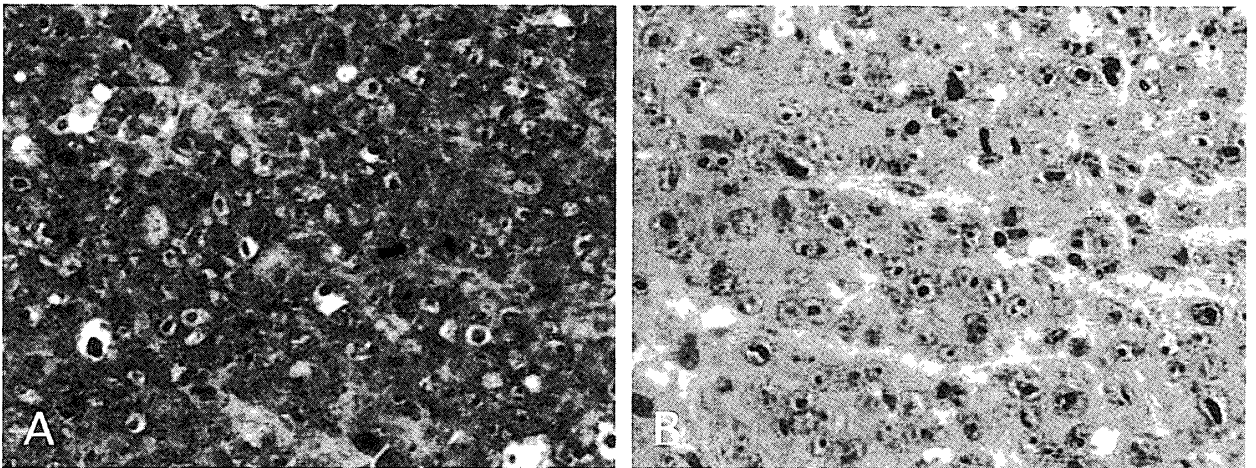


Fig. 4. Immunohistochemistry of VEGF in murine squamous cell carcinoma. VEGF protein is strongly expressed in tumor from a mouse that was treated with phosphate buffer saline (A). VEGF protein is poorly expressed in tumor from a mouse that was treated with 1400W (B).

投与開始後 7 日目における平均腫瘍体積は第 1 群では対照群の 75.7%，第 2 群では 60.0% であり対照群と処置群との間に有意な腫瘍増殖抑制効果 ($p < 0.05$) を認めた。この 1400W による腫瘍増殖抑制効果は腫瘍重量においても有意に認められ、1400W 投与開始後 7 日目における平均腫瘍重量は第 1 群では対照群の 77.1%，第 2 群では 64.9% ($p < 0.05$) であった。また、この時点での処置群における 1400W の有意な腫瘍増殖抑制効果は腫瘍体積、腫瘍重量ともに第 2 群 (20mg/kg) で最も著明であった (Fig. 1, 2)。

3. iNOS および VEGF の免疫組織化学的検討

抗 iNOS 抗体を用いた免疫組織化学的染色では対照群で腫瘍全体にわたり iNOS 陽性細胞の濃染が認められるが、処置群では、ほとんど染色されず、1400W の iNOS 阻害効果が確認された (Fig. 3)。抗 VEGF 抗体を用いた免疫組織化学的染色では対照群で腫瘍全体にわたり VEGF 陽性細胞の濃染が認められるが、処置群では、ほとんど染色されず、腫瘍中の VEGF の減少が認められた (Fig. 4)。

4. iNOS および VEGF のウエスタンブロット法

対照群の腫瘍組織において iNOS 蛋白の発現

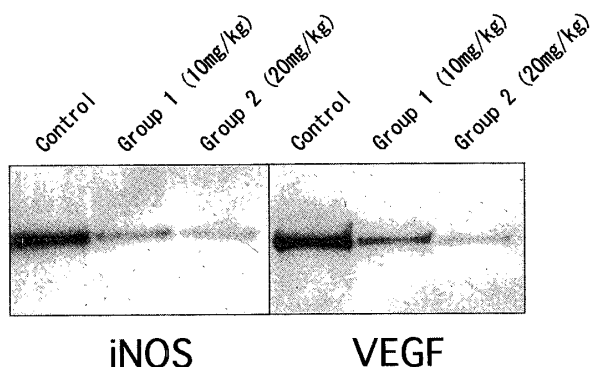


Fig. 5. Western blot analysis of iNOS and VEGF in murine squamous cell carcinoma. iNOS protein and VEGF protein content is decreased with administration of 1400W.

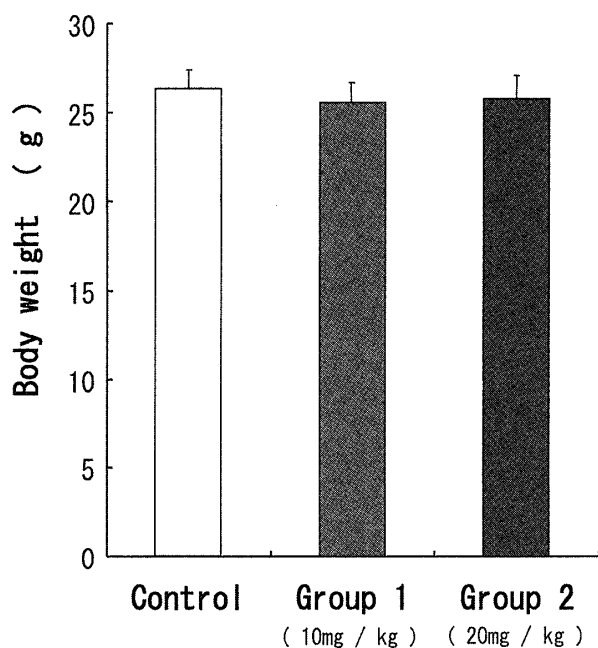


Fig. 6. Body weight of WHT/Ht mice at killing. Each bar represents the mean \pm standard deviation. The statistical significance of differences between the groups was determined by applying Fisher's PLSD. There was not a statistically significant difference between each group.

が認められたが、処置群では抑制傾向が認められた。また、対照群では VEGF 蛋白の発現が認められたが、処置群では蛋白発現の低下が認められた (Fig. 5)。

5. マウス体重に対する1400W の影響

1400W の全身毒性の評価の指標として、屠殺時におけるマウスの体重を測定した。第1群

の平均体重は対照群の97.0%，第2群では97.9%であり、各群の間に有意な差異は認められなかった (Fig. 6)。

考 察

近年、分子生物学の飛躍的發展で癌やシグナル伝達に關与する分子が明らかになりつつあり、従来の癌細胞を標的にした殺細胞効果を示す化学療法剤に代わってこのような分子を標的にした分子標的治療薬の開発が脚光を浴びている。なかでも血管新生阻害薬を使用した治療は休眠療法 (Dormancy Therapy)^{12~15)}とも呼ばれており、腫瘍血管新生を抑制することにより腫瘍の増大と転移を抑制し、腫瘍と共存していくことを目指しており、臨床的視点から非常に興味深い。

血管新生は癌細胞の増殖に対し極めて重要な役割を果たしており^{14~23)}、血管内皮増殖因子である VEGF は最も強力な血管新生因子として血管内皮細胞の遊走・増殖、管腔形成の促進や、血管透過性の亢進を誘導し、腫瘍血管新生のほとんどすべてのステップにおいて中心的役割を担っている²⁴⁾。

ヒト前癌病変や癌組織で発現している iNOS の NO 生成量は他の NOS の約1,000倍にも達するといわれている²⁵⁾。腫瘍に浸潤した炎症細胞や腫瘍細胞自身が発現する iNOS によって生成される NO は、血管拡張因子として可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP を生成して血管を拡張し血流を増加させる²⁶⁾。NO は固形腫瘍においては血管透過性を亢進させるため、NO 捕獲薬や NOS 阻害薬で NO の生成量を少なくすると、腫瘍組織での血流や血管透過性を抑制することができる²⁷⁾。また、NO は腫瘍の血管新生にも關与しており²⁸⁾、ヒト腫瘍細胞で VEGF の発現を高めているという報告がある²⁹⁾。したがって、腫瘍における NO の産生を抑制することによって、癌細胞への栄養や酸素の補給を阻害し、癌治療の効果を上げようという試みがなされている。

NO 合成阻害物質はその作用により NO 消去

薬などの NO 阻害関連物質とアミノ酸誘導体、アミジン誘導体、イソチオウレア誘導体などの NOS 阻害薬に分類されるが、アミノ酸誘導体である N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)を原形とするものが最も頻用されている。しかし、L-NMMA は iNOS のみに特異的な阻害薬ではないため、生体の恒常性の維持に必要な eNOS, nNOS をも阻害し、血圧上昇や組織灌流障害を引き起こす。

1400W はアミジン誘導体に分類される NOS 阻害薬で、3 種類のアイソザイムに対する Ki 値 (阻害定数) の比較から、これまで報告のある化合物のうちで iNOS に対して最も特異性が高い選択的 iNOS 阻害薬である³⁰⁾。したがって、本研究においても選択的阻害薬として 1400W を用いて実験を行った。

Thomsen ら⁷⁾は 1400W が *in vivo* でマウスの EMT 6 Adenocarcinoma の増殖を抑制したことを報告している。本研究においても WHT/Ht マウスに皮下移植した扁平上皮癌に対して平均腫瘍体積において第 1 群 (10mg/kg) では対照群の 75.7%, 第 2 群 (20mg/kg) では 60.0%, 平均腫瘍重量においては第 1 群では対照群の 77.1%, 第 2 群では 64.9% と著明に腫瘍の増殖を抑制した。

NO は血管の拡張、透過性を亢進するだけでなく、血管構築を脆弱化し、血管が発芽しやすい環境をつくることで血管新生を促進する。本研究において、1400W は WHT/Ht マウスに皮内移植した腫瘍に対して新生血管数を第 1 群では対照群の 82.7%, 第 2 群では 62.5% と著明に抑制した。この血管新生抑制作用は iNOS 阻害による NO 産生の抑制によるものと考えられる。

Lori ら³¹⁾は野生型マウスの肺腫瘍の免疫組織化学的染色では iNOS 陽性であったが、iNOS ノックアウトマウスでは陰性であり、ウエスタンブロット法による検討では iNOS ノックアウトマウスの腫瘍中 VEGF 含有量は野生型マウスより著しく少なかったと報告している。本研究においても皮下移植した扁平上皮癌の免疫組

織化学的染色で対照群では iNOS 陽性細胞が多く認められたのに対して 1400W 投与群では iNOS はほとんど染色されず、VEGF についても同様に発現の減少が認められた。また、ウエスタンブロット法による検討で 1400W の用量依存的な iNOS 阻害効果が確認されるとともに、腫瘍中の VEGF 蛋白発現の減少が認められた。この結果から NO は腫瘍中 VEGF の発現を誘導する作用を有しており、1400W は iNOS を阻害することで NO による VEGF 発現誘導を抑制する作用を示すと考えられる。

1400W の副作用についてはこれまでに報告されていないが、血管新生阻害作用を有する薬剤の中には体重に対する減少作用を有するものが報告されている³²⁾。したがって、本研究においては 1400W の全身毒性の評価の指標として、腫瘍を皮下移植した各群のマウスにおける屠殺時の体重を測定した。その結果、第 1 群における平均体重は対照群の 97.0%, 第 2 群では 97.9% であり、各群の間に有意差は認められなかった。しかし、NO にはダイナミックに血管の緊張性を拡張性に調節する作用だけでなく、持続的な抗動脈硬化作用があり、循環面から生体を保護する重要な働きがある。この作用は血管内皮あるいは支配神経に存在する構成型 NOS (eNOS, nNOS) により産生される NO で維持されており、その機能低下は血管攣縮、高血圧、動脈硬化、ED (erectile dysfunction)、心不全、腎不全、などの病態と深く関連している^{33~35)}。そのため実際に臨床応用する際にはさらに多角的な副作用の検討が必要と思われる。

以上の結果より、NO はマウス扁平上皮癌組織中の VEGF の発現を亢進する因子として関与しており、VEGF を介して腫瘍血管新生を促進していることが考えられる。また、NO は VEGF を介したこの血管新生の促進と cGMP を介した血管内皮の弛緩により、腫瘍を増殖させる正の因子としての一端を担っていると考えられる。

NO の血管新生や腫瘍増殖に対する作用はいまだ不明な点が多く、選択的 iNOS 阻害薬や

ノックアウトマウスなどを用いて今後さらに解明されることが望まれる。

結 論

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した可移植性扁平上皮癌の増殖に対する選択的 iNOS 阻害薬 (1400W) の影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. WHT/Ht マウスの皮内に移植した扁平上皮癌細胞により誘導された血管の数は、20mg/kg投与群で最も有意に抑制された。
2. WHT/Ht マウスの皮下に移植した扁平上皮癌の腫瘍体積は対照群と比較して20mg/kg投与群で最も有意な増殖抑制効果が認められた。また、各群の平均腫瘍重量の比較においても同様であった。
3. WHT/Ht マウスに皮下移植した扁平上皮癌組織の免疫組織化学的染色法およびウエスタンブロット法において1400W の iNOS 阻害効果が確認され、VEGF 蛋白発現の減少が認められた。
4. 実験期間中における体重の変動は各群の間に有意差は認められなかった。
5. 1400W は本腫瘍の血管新生と増殖に対し、抑制活性を有していることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導、校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。貴重な器材の使用をご快諾頂きご懇切な助言を賜りました本学口腔病理学講座佐藤方信教授に衷心より謝意を捧げます。また、ご指導、ご校閲を頂きました本学口腔外科学第一講座水城春美教授に深謝致します。また、ご親切な指導と鞭撻を頂きました当講座杉山芳樹助教授に深く感謝致します。さらに、懇切丁寧な実験手技のご指導を賜りました本学口腔病理学講座畠山節子講師に心から感謝の意を表します。最後に、様々な面にて御協力御援助を頂きました口腔外科学第二講座医局員各位に深く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、2003年10月24日、第48回日本口腔外科学会総会（富山市）において発表した。

文 献

- 1) Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature* 288 : 373 - 376, 1980.
- 2) Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S., and Kadowitz, P. J. : Activation of Purified Soluble Guanylate Cyclase by Endothelium-Derived Relaxing Factor from Intrapulmonary Artery and Vein: Stimulation by Acetylcholine, Bradykinin and Arachidonic Acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237 : 893 - 900, 1986.
- 3) Bred, D. S., and Snyder, S. H. : NITRIC OXIDE: A Physiologic Messenger Molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63 : 175 - 195, 1994.
- 4) Brennan, P. A., Palacios-Callender, M., Umar, T., Hughes, D., Spedding, A. V., Zaki, G. A., and Langdon, J. D. : Correlation between type II nitric oxide synthase and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery.*, 38 : 627 - 632, 2000.
- 5) Brennan, P. A., Umar, T., Bowden, J., Hobkirk, A., Spedding, A. V., Conroy, B., Zaki, G. A., and Macpherson, D. W. : Nitric oxide synthase expression is downregulated in basal cell carcinoma of the head and neck. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 38 : 633 - 636, 2000.
- 6) Thomsen, L. L., Lawton, F. G., Knowles, R. G., Beesley, J. E., Riveros-Moreno, V., and Moncada, S. : Nitric Oxide Synthase Activity in Human Gynecological Cancer. *Cancer Res.* 54 : 1352 - 1354, 1994.
- 7) Thomsen, L.L., Scott, J. M. J., Topley, P., Knowles, R. G., Keerie, A., and Frend A. J. : Selective Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibits Tumor Growth in Vivo: Studies with 1400W, a Novel Inhibitor. *Cancer Res.* 57 : 3300 - 3304, 1997.
- 8) Hewitt, H. B., and Sakamoto, K. : The comparative survival of clonogenic cells of a murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. *British Journal of Radiology* 44 : 457 - 463, 1971.
- 9) Hewitt, H. B., Blake, E. R., and Walder, A. S. : A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33 : 241 - 259, 1976.
- 10) Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S.,

- Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittel, B. J. R., and Knowles, R. G. : 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric oxide Synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 272 : 4959 - 4963, 1997.
- 11) Kreisler, R. A., and Ershler, W. B. : Investigation of tumor angiogenesis in an Id mouse model : role of host-tumor interactions. *J. Natl. Cancer Inst.* 80 : 849 - 854, 1988.
- 12) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C., and Folkman, J. : Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumor in mice. *Nature Med.* 2 : 689 - 692, 1996.
- 13) Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M. S. : Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390 : 404 - 407, 1997.
- 14) Fox, S. B., Gatter, K. C., and Harris, A. L. : Tumor Angiogenesis. *J. Pathol.* 179 : 232 - 237, 1996.
- 15) Harris, S. R., and Thorgeirsson, U. P. : Tumor Angiogenesis. *In vivo* 12 : 563 - 570, 1998.
- 16) Folkman, J. : The vascularization of tumors. *Sci. Am.* 234 : 59 - 73, 1976.
- 17) Folkman, J., and Klagsbrun, M. : Angiogenic factors. *Science* 234 : 442 - 447, 1987.
- 18) Folkman, J. : Tumor angiogenesis : A possible control point in tumor growth. *Ann. Int. Med.* 83 : 96 - 100, 1975.
- 19) Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., and Hanahan, D. : Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339 : 58 - 61, 1989.
- 20) Folkman, J. : What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent ? *J. Natl. Cancer Inst.* 82 : 4 - 6, 1990.
- 21) Blood, C. H., and Zetter, B. R. : Tumor interactions with vasculature : angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Acta* 1032 : 89 - 118, 1990.
- 22) 渋谷正史 : 腫瘍の制御と血管新生 : 血管研究の最前線に迫る, 医学&サイエンスシリーズ. 羊土社 : 64 - 65, 2000.
- 23) 渋谷正史 : 血管の先端分子医学と臨床への躍進. 実験医学 20 : 83, 2002.
- 24) Kumar, R., Yoneda, J., Bucana, C. D., and Fidler, J. : Regulation of distinct step of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int. J. Oncol.* 12 : 749 - 757, 1998.
- 25) 宮本泰豪, 谷口直之 : 一酸化窒素. 臨床免疫 38 : 59 - 66, 2002
- 26) 岡村富夫, 安屋敷和秀, 戸田 昇 : NO 研究の最前線. 実験医学 18 : 937, 1999.
- 27) Maeda, H., Noguchi, Y., Sato, K., and Akaike, T. : Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by Nitric Oxide and inhibited by both new Nitric Oxide Scavenger and Nitric Oxide Synthase inhibitor. *J. J. Cancer Res.* 85 : 331 - 334, 1994.
- 28) Garcia-Cardena, G., and Folkman, J. : Is there a role for nitric oxide in tumor angiogenesis ? *J. Natl. Cancer Inst.* 90 : 560 - 561, 1998.
- 29) 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 - 442, 1997.
- 30) 中木敏夫 : NO の生理作用と疾患, 医学&サイエンスシリーズ, 羊土社 : 94 - 97, 1999.
- 31) Lori, R. K., Bradley, S. B., Alison, K. B., Lori, D. D., Benjamin Barthel, A. M., David, C. T. and Alvin, M. M. : Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase decreases mouse lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 62 : 6850 - 6856, 2002.
- 32) Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamura, T., Brem, H. and Hanahan, D. : Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 345 : 555 - 557, 1990.
- 33) Parmentier, S., Bohme, G. A., Lerouet, D., Damour, D., Stutzmann, J. M., Margail, I., and Plotkine, M. : Selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br. J. Pharmacology* 127 : 546 - 552, 1999.
- 34) 松岡文章, 外山勝英, 大湊政之, 佐藤武夫, 前波輝彦 : 実験的急性腎不全モデルラットにおける一酸化窒素合成酵素活性の経時的変動. 聖マリアンナ医科大学雑誌 29 : 673 - 679, 2001.
- 35) 松岡秀洋, 今泉 勉 : NO と治療薬. 治療学 33 : 32 - 35, 1999.