

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 大澤 崇宏

学位論文題名

The biological function of tumor endothelial cell specific markers
(腫瘍血管内皮細胞における特異マーカーの機能解析)

【背景と目的】 がんの進展・転移には血管新生が不可欠である。近年がん組織に栄養や酸素を供給する血管を標的とする血管新生阻害療法は新しいがんの治療法として注目されている。現在用いられている血管新生阻害薬は、がん患者の有意な延命効果をもたらした反面、これらの正常血管への作用により、消化管穿孔、喀血などの副作用があることも報告されはじめてきた。従来、血管新生阻害療法の根底には「がんの間質に存在する血管内皮細胞は正常である」という概念があった。しかしながら、腫瘍血管内皮細胞 (TEC) は高い増殖能・遊走能を持つなど正常血管内皮細胞 (NEC) と異なることが知られている。今回、ヒト腎がんを含む3種のがん細胞のヌードマウス皮下移植モデルから分離培養された TEC と NEC の遺伝子発現を DNA microarray により比較し、TEC に共通して発現亢進している遺伝子を汎 TEC マーカーとして解析を進めてきた。本研究では3種の TEC に共通して発現が亢進していた汎腫瘍血管内皮特異マーカーとして期待される遺伝子の中で、Prostacyclin receptor (IP receptor) と Lysyl oxidase (LOX) に着目し、TEC におけるこれらの分子の機能について解析した。IP receptor は、細胞膜を7回貫通する G 蛋白共役型の受容体であり、主に Prostacyclin (PGI₂) をリガンドとする。PGI₂ は血管内皮から放出され、血小板や血管平滑筋細胞に存在する IP receptor に作用し、血小板凝集抑制効果や血管平滑筋弛緩作用を持つ。がんでは COX-2 によって誘導される TXA₂、PGE₂ および PGI₂ によって多段階の発がんに必要な血管形成が誘導されることから、PGI₂/IP receptor システムも同様に腫瘍血管新生に関与する可能性が示唆されていた。また、LOX は、浸潤能や転移能の高いがん細胞において発現が高いこと、*in vitro* の系で LOX の抑制が、がん細胞の遊走能や浸潤能を抑制することなどが報告されている。しかしながら、腫瘍血管における IP receptor や LOX の発現、およびその機能に関しては全く報告がないため、この点を明らかにするため実験を行った。

【対象と方法】(1) がん細胞と培養条件: 高転移性ヒトメラノーマ細胞株(A375SM)は、37°C、5%CO₂-95%気相下において 10% 牛仔牛血清(FBS)を加えた Minimum Essential Medium(MEM)を用いて培養した。ヒト腎がん細胞株である OS-RC-2 は、10% FBS を加えた RPMI 1640 medium を用いて培養した。(2) 抗体と試薬: IP receptor に対する抗体として免疫染色用にウサギ抗ヒト IP receptor 抗体を使用した。LOX に対する抗体として免疫染色用、Western blotting(WB)用にウサギ抗 LOX 抗体を使用した。また血管内皮に対する抗体としてマウス抗ヒト CD31 抗体、ラット抗マウス CD31 抗体を使用した。A375SM のマウス皮下移植腫瘍から mouse TEC (mTEC) を、ならびに正常皮膚から mouse NEC (mNEC) を CD31 抗体と磁気ビーズにより分離した。血管内皮細胞は EGM-2 MV で培養した。(3) フローサイトメトリー解析: ラット抗 CD31 抗体、ラット抗 CD105 抗体、Alexa Fluor 488 抗ラット抗体を用いて FACS Aria II によりこれら細胞表面抗原の mTEC、mNEC における発現を解析した。さらに FITC-BS1-B4 レクチンの結合も解析した。(4) 免疫組織染色: マウスにおいては A375SM の皮下移植腫瘍ならびに正常腎組織からの凍結切片を用いた。医師主

導自主臨床研究(「腫瘍血管内皮細胞の特異的マーカーの同定」、自 009-0148、平成 22 年 1 月 5 日承認)のプロトコールに従い、同意書を頂いた患者の手術標本からヒト腎細胞がんならびに健常部の腎組織を摘出し凍結切片を作成し、IP receptor、LOX の血管における発現を抗 CD31 抗体、抗 IP receptor 抗体、抗 LOX 抗体による蛍光 2 重免疫染色により解析した。

(5)IP receptor アンタゴニストを用いた IP receptor 阻害実験：IP receptor アンタゴニスト RO1138452 を用いて、IP receptor の mTEC における機能を解析した。(6)siRNA を用いた LOX の抑制：Hiperfect を用いて LOX siRNA を導入し mTEC における LOX の抑制を行い、同分子の mTEC における機能を解析した。(7)細胞遊走試験：共焦点顕微鏡を用いた、生細胞イメージング、Boyden chamber によって細胞遊走能を評価した。(8)管腔形成能試験：Growth factor reduced matrigel 上での mNEC、mTEC の管腔形成能を評価した。(9)A375SM のヌードマウス皮下移植モデルにおいて LOX 阻害剤 BAPN を用いた治療実験：腫瘍増殖速度、腫瘍血管新生、循環腫瘍細胞数、肺転移数を評価した。(10)統計解析：各群間の統計解析には Unpaired-Student's-t-test を使用した。Mann-Whitney U 検定を用いた。

【結果】 mouse TEC (mTEC) において IP receptor の発現が亢進し(RT-PCR)、PGI₂ の産生が亢進していた(ELISA)。TEC の遊走能、管腔形成能は IP receptor アンタゴニストにより抑制された。また、LOX の発現も mTEC において高いレベルの発現を認めた(WB、RT-PCR、免疫組織染色)。LOX siRNA を用いた LOX の抑制により、mTEC の遊走能、管腔形成能は有意に抑制された。また、mTEC は接着斑の増加を伴いより広がった細胞へと形態変化した。更に、LOX の抑制によって FAK^{tyr397} のリン酸化が抑制されることが示された。LOX 阻害剤 BAPN を用いたヒト腫瘍のヌードマウス皮下移植モデルでは、腫瘍血管新生と肺転移が抑制された。ヒト腎がん組織から hTEC、ヒト正常腎組織より hNEC を分離、培養し RT-PCR により IP receptor、LOX の発現を比較した。hTEC においても IP receptor、LOX の高い mRNA 発現レベルが認められた。また、ヒト腎がん症例 6 例において、がん組織ならびに非がん部の切片を用いて in vivo 血管における IP receptor、LOX の発現を CD31 との蛍光二重免疫染色により解析した。in vivo においてもヒト TEC において IP receptor、LOX の発現が高いことが示唆された。

【考察】 IP receptor、LOX はマウスおよびヒト TEC において発現が亢進していることが示された。in vitro の実験において、IP receptor のアンタゴニストにより TEC の遊走能や管腔形成能が抑制されたことから、PGI₂/IP receptor システムは TEC の高い血管新生能の維持にオートクライン機構で寄与し、腫瘍血管新生に重要な役割を果たしていることが示唆された。また TEC は PGI₂ を自己分泌により腫瘍血管新生に利用していることが示唆された。さらに本研究では、LOX の抑制により接着斑の増加をともなって細胞骨格が変化すること、また FAK (tyr397) のリン酸化が抑制され、運動能が抑制されることが示された。LOX 阻害剤を用いた in vivo 実験モデルでは、治療群において腫瘍血管新生が抑制され、肺転移が抑制されていた。以上の結果より IP receptor や LOX が TEC の高い遊走能に関与していることが示唆され、これらの分子の阻害によりがんの進展・転移に重要な腫瘍血管新生を選択的に抑制できることが期待される。IP receptor、LOX が TEC に発現亢進しているという報告はこれまでになく、TEC の新規マーカーとして、TEC を選択的に標的とする新たながん治療法の開発につながることを期待される。

【結論】 本研究で機能解析を行った TEC マーカーは腫瘍血管に対する分子標的治療にも有用であると期待され、このような TEC に特異的に発現亢進する分子を標的とした治療は、現存する血管新生阻害薬よりもはるかに TEC に選択的が高いことが予測される。TEC に対するワクチン・中和抗体など新たな血管新生阻害薬の開発につながると期待される。