

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 山本 和幸

学位論文題名

Studies on the expression and function of biglycan in tumor endothelial cells.

(腫瘍血管内皮細胞における Biglycan の発現および機能に関する研究)

【背景と目的】

悪性腫瘍の増殖、進展、転移には酸素や栄養を供給する血管が重要な役割を果たしている。これまで腫瘍血管新生研究にはヒト臍帯静脈血管内皮細胞などの正常血管内皮細胞が利用されてきた。しかし最近、腫瘍血管は正常血管と比較し形態学的に異常があることがわかってきた。われわれは、これまで腫瘍血管内皮細胞 (tumor endothelial cell: TEC) は正常血管内皮細胞 (normal endothelial cell: NEC) と比較し、遊走能や生存能が高いなど様々な点で違いがあることを報告してきた。さらに DNA microarray によって TEC と NEC で網羅的遺伝子解析を行い、NEC と比較し TEC において発現が亢進している遺伝子群を TEC マーカーとして解析している。今回その一つ Biglycan に着目し TEC におけるこの分子の機能について解析した。Biglycan は small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) であり、細胞間基質 (ECM) に広く存在する糖タンパクである。最近、様々な疾患との関連についても報告され始めている。しかし、TEC における Biglycan の発現、および機能に関してはこれまで全く報告が無い。そこで本研究の目的は Biglycan の TEC における発現・機能を解析することとした。

【対象と方法】

ヒト高転移性メラノーマ細胞株 A375SM のマウス皮下移植腫瘍ならびに正常皮膚から分離した血管内皮細胞を使用した。TEC および NEC における Biglycan の発現を PCR、Western blotting、蛍光 2 重免疫染色により解析した。高転移性メラノーマ細胞のマウス皮下移植腫瘍ならびに正常腎、正常皮膚組織から凍結切片を作成した。医師主導自主臨床研究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癌ならびに健常部の腎組織を摘出し凍結切片を作成した。それぞれの動物種の CD31、Biglycan に対する抗体を用いて蛍光 2 重免疫染色を行い、血管における Biglycan の発現を解析した。Biglycan si RNA により TEC における Biglycan のノックダウンを行い、同分子の TEC における機能を解析した。Biglycan のレセプターである TLR2 および TLR4 の中和抗体を用いて、血管新生における各レセプターの重要性について検討した。ヒト癌患者および健常人より血清を採取し Glycoprotein Enrichment Resin を用いて血清中の糖蛋白を濃縮した。血清中の Biglycan の発現量を Western blotting により解析した。

【結果】

TEC は NEC に比較し *in vitro* の系で mRNA、タンパクともに Biglycan の発現が高いことが示された。さらに、*in vivo* 腫瘍血管における Biglycan の発現を解析した。マウス腫瘍組織における CD31 陽性の血管内皮は抗 Biglycan 抗体によっても染色されていたが、腎糸球体、皮膚における正常血管においては Biglycan の発現は殆どみられなかった。Biglycan si RNA による Biglycan のノックダウンにより TEC の遊走能および管腔形成能は低下した。また Biglycan ノックダウンされた TEC に Biglycan タンパクを処理すると遊走能、管腔形成能が回復した。このことから Biglycan

は TEC の高い遊走能および管腔形成能に関与していることが示唆された。また、F-actin 染色による細胞骨格の変化を解析すると、Biglycan のノックダウンにより細胞の長短比が小さくなり Biglycan が TEC の細胞骨格にも影響を及ぼす分子であることが示唆された。また、細胞遊走能を調節している接着斑についても検討した。接着斑の一つである vinculin は遊走シグナルに関与し、その発現上昇は細胞の遊走を低下させる。Biglycan ノックダウンによって vinculin 発現が増加した。この結果は Biglycan による遊走能亢進には vinculin 発現制御が関与していることが示唆された。また Biglycan の受容体である TLR2、TLR4、の TEC における発現もみとめられ、その中和抗体により Biglycan により誘導される遊走能および管腔形成能が抑制されたことから、TEC において Biglycan のオートクラインループの存在が示唆された。

さらに、ヒト TEC における Biglycan の発現を検討するために、6 症例のヒト腎腫瘍、腎健常部より血管内皮細胞を分離培養し Biglycan の発現を解析した。6 症例中 4 例において NEC に比較し TEC で Biglycan の発現レベルが高かった。さらにヒト腎癌、肺癌、大腸癌、転移性肝癌の摘出組織の凍結切片を用いて、Biglycan の *in vivo* 腫瘍血管における発現を解析した。CD31 陽性の TEC において Biglycan 染色が認められたが、NEC においては殆どみられなかった。この結果よりヒト腫瘍血管においても Biglycan の発現が高いことが示唆された。ヒト癌患者および健康人より血清を採取し糖蛋白を濃縮し、Biglycan の発現量を Western blotting により解析した。健康人と比較して癌患者の血清において Biglycan の発現が亢進していた。以上より Biglycan は癌患者における新たなバイオマーカーとなりえる可能性が示唆された。

【考察】

Biglycan は TEC において発現が亢進しており TEC の新規マーカーとして有用である可能性が示唆された。癌患者血清中の Biglycan の発現が健康人と比較して高いことが示されたことから、TEC より血管内へ分泌された Biglycan が様々な癌種の診断マーカーとなりえる可能性が示唆された。TEC において Biglycan のレセプターである TLR2 および TLR4 の発現を認めた。TLR2 および TLR4 の中和抗体は Biglycan により誘導された遊走能と管腔形成能を阻害した。TLR2 および TLR4 は VEGF 非依存的に血管新生に関与することが報告されている。Biglycan は TLR2 および TLR4 を介してオートクライン機構で血管新生を促進させる分子であることが示唆された。また、Biglycan は TEC の高い細胞遊走能および管腔形成能に関与していることが示されたことから血管新生阻害療法に応用可能な新規標的分子となることが期待される。

【結論】

Biglycan は TEC において発現が亢進しており、その高い血管新生能に関与していることが示された。血管新生阻害療法における標的分子として、またがんの診断マーカーとして応用可能であることが示唆された。