

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 山田 健司

学位論文題名

腫瘍血管内皮マーカーである CXCR7 の腫瘍血管内皮における機能解析に関する研究
(A functional analysis of CXCR7 expressed in tumor endothelial cells)

【背景と目的】近年、VEGF 中和抗体に代表される血管新生阻害療法は様々ながん治療に用いられており、生存率が向上している。しかし、VEGF は正常血管における血管新生にも重要な分子であり、その阻害による高血圧や創傷治癒遅延などの様々な副作用が報告されている。我々はこれまでに腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) を分離培養し、それらが正常血管内皮細胞 (Normal endothelial cell: NEC) と比較して染色体異常があること、抗がん剤などの薬剤に対する感受性が低いこと、様々な遺伝子の発現が亢進しており血管新生能が高いことなどを報告してきた。これら異常性を獲得した TEC のみを標的とする治療法の開発が、より腫瘍血管に選択的で副作用が少ない新規血管新生阻害薬の開発につながると考えた。TEC と NEC における遺伝子発現を DNA Microarray により比較し、TEC と NEC で発現量の差が大きかった C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) に着目した。CXCR7 は 7 回膜貫通型タンパクであり、胎生期の心・大血管形成に関与している。近年 CXCR7 は脳腫瘍や前立腺癌・肺癌など様々な癌細胞で発現が亢進していると報告されており肺癌や大腸癌においては CXCR7 高発現と予後との関係が報告されている。また、前立腺癌・腎細胞癌組織では腫瘍内の血管においても発現していることが報告されている。本研究室では過去に腎細胞癌より分離・培養した TEC において NEC よりも CXCR7 発現レベルが高い事を報告した。しかし、TEC における機能は不明のままであった。本研究では TEC における CXCR7 の発現と機能を解析し、CXCR7 を標的にした血管新生阻害療法の臨床応用への可能性を検討することを目的とした。

【材料と方法】腫瘍血管における CXCR7 の発現は、CD31 との蛍光二重免疫染色法により解析した。ヒト臨床検体は医師主導自主臨床研究のプロトコルに従い、同意書を事前に取得した患者の手術標本を用いた。機能解析にはヒト高転移性悪性黒色腫マウス皮下移植腫瘍から TEC を、コントロールとして正常皮膚から NEC を分離培養して用いた。動物の取り扱いは「北海道大学動物実験に関する規程」に従った。CXCR7 の機能解析は CXCR7 siRNA transfection 法もしくは CXCR7 阻害剤(CCX771: Chemocentryx から供与)を用いて CXCR7 阻害を行った。血管新生能の評価は boyden chamber を用いた遊走能試験・マトリゲル上における管腔形成能試験・無血清培地培養下における生存能試験・MTS 法を用いた増殖能試験を用いて解析した。シグナル解析は Western blotting 法により解析した。CXCR7 のリガンドである Stromal cell derived factor 1 (CXCL12) の発現解析には qRT-PCR 法と ELISA 法を用い、CXCL12 中和抗体を用いて CXCL12-CXCR7 オートクライン機構を解析した。*in vivo* における CXCR7 阻害実験は、ルシフェラーゼをトランスフェクションしたヒト高転移性悪性黒色腫をマウスに皮下移植し、CCX771 とコントロールとして 10% Captisol を毎日 1 回皮下注した。遺伝子組み換えに関しては「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従った。抗腫瘍効果は腫瘍体積、IVIS による肺転移の評価、腫瘍組織の微小血管密度 (Microvessel density: MVD) を計測し判定した。各群間の統計解析には Tukey-Kramer, Unpaired-Student's t test を使用した。解析の結果 $P < 0.05$ を有

意差ありと判定した。

【結果】 *in vivo*における腫瘍血管での CXCR7 発現をマウス皮下移植腫瘍ならびにヒト腫瘍（肝癌・肺癌・大腸癌）で解析したところいずれの腫瘍血管において、正常血管よりも CXCR7 発現が高頻度に認められた。分離培養した TEC と NEC が血管内皮の性質を保っていることを確認したのち、CXCR7 発現を比較したところ mRNA, タンパクともに TEC で発現が亢進していた。TEC において CXCR7 発現をノックダウンすると、遊走能、管腔形成能、無血清培養下における生存能が低下した。しかし、増殖能には影響を与えなかった。この事より、CXCR7 は TEC の高い血管新生能に関与している事が示唆された。TEC を CXCR7 のリガンドである CXCL12 で刺激する事により、ERK1/2 がリン酸化されたが、CXCR7 ノックダウン TEC ではリン酸化が阻害された。Akt のリン酸化についても検討したが、Akt のリン酸化阻害は認められなかった。この事より TEC において CXCR7 は CXCL12 と結合し、ERK シグナルを活性化させると考えられた。さらに、TEC では CCX771 により、CXCR7 ノックダウン実験と同様に遊走能、管腔形成能などの血管新生能が低下したが、CXCR7 の発現が低い NEC に対しては影響を与えなかった。CXCR7 のリガンドである CXCL12 は TEC では NEC に比べて高発現しており、培養上清中に高濃度に分泌していた。CXCL12 非存在下において CXCR7 ノックダウン TEC で運動能の低下を認め、CXCL12 中和抗体存在下においても TEC の運動能の低下が認められた。この事より、TEC における CXCL12-CXCR7 オートクライン機構がその高い運動能に関与していることが示唆された。CCX771 による *in vivo* 治療実験では、治療開始 26 日目の時点で有意差はないものの腫瘍増殖の抑制と肺転移の減少を認めた。腫瘍組織の MVD は CCX771 群で有意に低下しており CXCR7 阻害は *in vivo* 腫瘍の血管新生阻害とともに抗腫瘍効果をもたらすことが示唆された。また、NEC を VEGF で刺激すると、CXCR7 発現が亢進し VEGFR キナーゼ阻害剤にて発現亢進が阻害された。また、低酸素刺激によっても CXCR7 発現亢進を認め、TEC における CXCR7 の発現亢進のメカニズムとして腫瘍微小環境中の少なくとも VEGF や低酸素環境が関与している可能性が考えられた。

【考察】本研究により、CXCR7 は正常血管と比較して腫瘍血管内皮に発現亢進していることが示された。TEC は CXCL12-CXCR7 オートクライン機構を獲得し、ERK の活性化を介して遊走・管腔形成・生存といった血管新生能に強く関与していることが示唆された。CXCR7 阻害剤によって血管新生の抑制を伴って、腫瘍増殖の抑制される傾向と肺転移の抑制がみられた。今後さらなる検討が必要ではあるが、以上の結果は CXCR7 阻害によって血管新生阻害と抗腫瘍効果が期待できることが示唆された。

【結論】

本研究において CXCR7 は腫瘍血管新生に重要であり、CXCR7 を標的とした治療が腫瘍血管特異的な血管新生阻害療法になりえる事が示唆された。