

Integral role of TCF8 in the negative regulation of tumor angiogenesis

(TCF8の腫瘍血管新生における機能解析に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 癌は心血管系疾患と並び、人類の生命を脅かす疾患のひとつである。癌の形成には、その中核となる癌幹細胞を含む腫瘍細胞に加えて、癌周辺の微小環境が重要な役割を担っていることが知られている。中でも、腫瘍血管新生は、1-2mm以上の固形腫瘍の形成には必要であり、腫瘍形成の重要な因子のひとつである。このため、腫瘍血管を標的とした治療薬の開発が望まれている。現在使用されている抗血管新生治療薬である抗 VEGF (Vascular endothelial growth factor) 抗体、ベバシズマブは、抗癌剤と併用することにより、大腸癌や乳癌をはじめとした臨床試験において、延命という一定の効果をあげている。一方で、例えば、膵臓癌等においては、腫瘍形成の後期になると VEGF に加えて、bFGF (basic Fibroblast growth factor) などの他の血管新生促進因子が発現し、ベバシズマブ抵抗性を示すことから VEGF 非依存的な抗血管新生療法の開発が求められている。

本学位論文では、腫瘍血管新生に関与する新規遺伝子の同定とその機能解析を目的とした。中でも、転写因子 TCF8 (Transcription factor 8) に着目して、その腫瘍血管新生における機能解析を進めた。

【材料と手法】 生体内の血管新生部位における TCF8 の発現レベルを解析するために、抗 TCF8 抗体を使用して、ヒト病理組織を免疫組織学的手法により解析した。TCF8 の血管内皮細胞における役割を明らかにするために、siRNA 法により TCF8 の発現を抑制したヒト臍帯静脈内皮細胞を使用した。生体外血管新生モデルには、マトリゲルを用いた 3 次元培養系を使用した。細胞の浸潤能は、ポイデンチャンバーを使用したマトリゲルに対する浸潤アッセイにより検討した。TCF8 の標的遺伝子として MMP1 (Matrix metalloprotease 1) を同定するために、リアルタイム PCR 法による mRNA の発現解析と、クロマチン免疫沈降法による MMP1 のプロモーター領域に対する TCF8 の結合を解析した。細胞・細胞外基質間相互作用は、接着アッセイにより検討した。生体内の腫瘍血管新生における TCF8 の機能を明らかにするために、TCF8 ヘテロ欠損マウスに B16/F10 メラノーマ細胞株を移植する腫瘍血管新生モデル系を使用した。結果の解析は、HE と抗 CD31 抗体を使用した免疫組織学的手法により行った。

【結果】 まず、生体内の血管新生部位における TCF8 の発現を解析するために、乳癌や肝臓癌、脳腫瘍をはじめとした病的な血管新生部位をもつ腫瘍組織と肉芽組織をはじめとした比較的生理的条件下に近い血管新生部位をもつ組織に対する免疫組織学的解析を行った。その結果、腫瘍組織の血管内皮細胞で TCF8 が高発現しており、一方で、肉芽組織の血管内皮細胞には TCF8 の発現がほとんどみられなかった。これらの結果から、TCF8 は、腫瘍血管新生部位の血管内皮細胞に特異的に発現している遺伝子であると考えられた。

次に、TCF8 の血管内皮細胞における役割を明らかにするために、siRNA 法により TCF8 の発現を抑制したヒト臍帯静脈内皮細胞を使用して解析を進めた。まず、生体外血管新生モ

デルであるマトリゲルを使用した3次元培養系における血管様構造を解析した。その結果、TCF8発現抑制細胞は、コントロールと比較して血管様構造の形成が1.8倍程度亢進していたことから、TCF8は血管新生の負の制御因子であると考えられた。

血管新生には、血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞の浸潤能の亢進や細胞・細胞外基質間相互作用の変化が伴うことが知られていることから、これらの細胞生物学および分子生物学的知見を得ることを試みた。ポイデンチャンパーを使用してマトリゲルに対する浸潤能を解析したところ、TCF8の発現抑制細胞では、コントロールと比較して2.5倍程度細胞の浸潤能が亢進していた。細胞の浸潤には、MMPと呼ばれる細胞外基質分解酵素が関与していることから、これらに対して解析したところ、TCF8の発現抑制細胞では、コントロールと比較してコラゲナーゼMMP1の発現が3.5倍程度亢進していた。MMP1のプロモーター領域は、-427bpと-409bpにTCF8の特異的結合配列であるCACCTGを有していたことから、これらの領域に対するTCF8の結合をクロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、TCF8のMMP1プロモーターへの直接的に結合することが明らかとなった。これらは、TCF8が血管新生の負の制御因子として機能することを支持する結果である。細胞・細胞外基質間相互作用に関して、接着アッセイにより解析したところ、TCF8の発現抑制細胞では、コントロールと比較してI型コラーゲンゲルとマトリゲルに対する接着能が30%程度低下していた。

最後に、生体内の腫瘍血管新生におけるTCF8の機能を明らかにするために、野生型とTCF8ヘテロ欠損マウスにB16/F10メラノーマ細胞株を移植する腫瘍血管新生モデル実験を行った。その結果、TCF8ヘテロ欠損マウスでは、野生型マウスと比較して形成された腫瘍が2.5倍程度大きかった。さらに、TCF8ヘテロ欠損マウスでは、腫瘍血管新生の亢進と野生型マウスではみられなかった腫瘍の横紋筋組織への浸潤や肺転移がみられた。これらの結果から、TCF8は腫瘍血管新生の負の制御因子であると考えられた。

【考察】 腫瘍血管新生に対する治療法としては、抗VEGF抗体による治療法などが検討されているが、その効果は限定的であることも多く、新しい分子標的治療薬の開発が望まれている。本学位論文で明らかにしたTCF8が血管新生を負に制御するという機能は、TCF8を腫瘍血管に特異的に発現させる手法等により、腫瘍血管新生を制御できる可能性を示唆しており、癌の新しい治療法を確立する上で有用な知見であると考えられた。

【結論】 近年の研究により、腫瘍血管をはじめとした腫瘍間質の作用が腫瘍形成に深く関与していることが明らかとなってきている。本学位論文では、腫瘍血管新生に関与する新規遺伝子として転写因子TCF8を同定し、その機能解析を行った。その結果、TCF8は、腫瘍血管新生の負の制御因子であり、血管新生に関与している細胞の浸潤能をはじめとした多様な細胞の機能制御に関与している遺伝子であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 准教授 濱 田 淳 一

学位論文題名

Integral role of TCF8 in the negative regulation of tumor angiogenesis

(TCF8の腫瘍血管新生における機能解析に関する研究)

学位論文は、Transcription factor 8 (TCF8)と腫瘍血管新生の関連についてまとめられていた。TCF8は腫瘍血管内皮細胞に発現しており、*in vivo*、*ex vivo*、ならびに*in vitro*において血管新生を抑制していることが示されていた。

質疑応答は、まず、濱田淳一准教授より TCF8 の発現レベルと機能の矛盾点に関する質問があった。申請者は、本質問に対して、TCF8 は腫瘍血管新生を抑制するために発現するが、腫瘍の著しい増殖のために腫瘍血管新生を抑制しきれていないという点を学位申請論文の遺伝子改変マウスの結果を引用することにより説明した。濱田淳一准教授からは他に、VE-cadherin の発現レベルと TCF8 の発現を調節する分子基盤に対する質問があり、申請者は、前者に関しては、TCF8 は VE-cadherin の発現レベルを転写レベルでは制御しておらず、VE-cadherin の膜への移行因子等の発現を制御することにより VE-cadherin の細胞内局在を変化させている可能性がある」と回答し、後者に関しては、TCF8 の発現を調節遺伝子としては、過去に腫瘍細胞で TGF- β により TCF8 が誘導されるという報告があると回答した。ついで、瀬谷司教授より、Matrigel の主成分に関する質問があった。申請者は、Matrigel に含まれる主成分として、細胞外基質であるラミニンとIV型コラーゲンを挙げた。瀬谷司教授はさらに、Matrigel に含まれる他の成分であるプラズミノゲンやアンジオスタチン、VEGF と TCF8 の関連に関して質問を行い、申請者はプラズミノゲンやアンジオスタチンと TCF8 の関連に関する実験結果や報告はないが、VEGF に関しては、TCF8 の誘導には関与していない点を説明した。さらに B16/F10 メラノーマ細胞株以外の実験系における TCF8 と腫瘍血管新生の関連と、本研究の臨床分野への具体的な応用に関する質問が

あった。申請者は、前者に対しては、他の系として、マウス肺癌細胞株である Lewis lung carcinoma に関する系があり、将来的に実験を計画している旨を回答し、後者に関しては、TCF8 をウィルスベクター等を使用することにより、腫瘍血管内皮細胞に特異的に過剰発現させ、腫瘍血管新生を抑制して腫瘍を退縮されうることを説明したが、瀬谷司教授からそのための技術は十分に確立されておらず、現段階では困難であるという指摘がなされた。次に川口秀明教授から、VEGF と大腸癌をはじめとした腫瘍血管新生の関連について質問があり、申請者は両者には関連があり、実際に臨床分野では抗 VEGF 抗体であるアバスタチンが使用されていることを説明した。さらに *in vitro* 血管新生モデルにおける実験結果の解釈に関しての質問に対して、申請者は既報により血管様構造の形成数と血管新生能に関しては相関関係があるという点を説明し、TCF8 の発現抑制細胞では、コントロールと比較して血管様構造の形態が脆弱であることから、TCF8 は血管内皮細胞の分化にも関与している可能性を説明した。

最後に、畠山鎮次教授より腫瘍の悪性化と TCF8 発現レベルとの相関関係に対する質問があり、申請者は、脳腫瘍、乳癌、肝癌及び大腸癌において TCF8 の発現レベルを解析し、これらの腫瘍血管内皮細胞には TCF8 は発現しているが、腫瘍の悪性度との関連に対しては明確な結果を示すことができない点を説明した。また、R-Ras の下流では Focal adhesion kinase (FAK) や paxillin などが活性化されることが予想されるため、それらの細胞内局在に関する質問があり、申請者は、学位論文を引用して TCF8 は paxillin の細胞内局在を変化させる点を説明した。さらに、TCF8 の細胞質内における機能に関する質問と T 細胞の分化に関する質問があり、申請者は、前者に関しては、自身の別の論文を引用することにより R-Ras の活性化因子である CalDAGIII との関連を説明し、後者に関しては、既報を引用することにより、TCF8 のホモ欠損マウスの胸腺において、CD8⁺ T 細胞の分化異常があることを報告した。

この論文は、Cancer Research 誌で高く評価され、今後の腫瘍血管を標的とした腫瘍の治療法を開発する上で大きく役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。