

腫瘍血管内皮細胞は長期培養下においても

その特性を維持する

学位論文内容の要旨

血管新生は個体の発生や発育にとって必須であるが、癌の増殖や浸潤、転移にも重要な役割を担っていることから、現在、固形腫瘍において血管新生の抑制を目的とした抗癌治療の研究が盛んに行われている。これまで腫瘍血管新生分野での *in vitro* における研究のほとんどに HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) や HMVEC (ヒト微小血管内皮細胞) などの正常血管内皮細胞が用いられてきた。しかし近年、腫瘍血管の形態が病理組織学的に正常血管と異なることなどから血管内皮細胞そのものに違いのあることが示唆されている。腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の性質の相違を明らかにするためには、腫瘍血管内皮細胞を分離培養して解析していくことが重要である。しかし腫瘍組織から腫瘍血管内皮細胞を確実に分離し、培養するには様々な困難があることから、腫瘍血管内皮細胞を用いた研究報告は極めて少ない。その理由のいくつかは、腫瘍血管内皮細胞は、腫瘍細胞や炎症性細胞、線維芽細胞など多くの細胞を含む腫瘍組織中にごく少量しか含まれず、分離が技術的に困難であったこと、腫瘍から分離された腫瘍血管内皮細胞が直ちに正常に戻るものが危惧され、腫瘍血管内皮の分離培養の意義に対する疑問があったことなどがあげられる。2000年、St. Croix らが初めてヒト腫瘍血管内皮細胞を分離し、その遺伝子発現を正常血管内皮細胞と比較して報告し、その後もいくつか腫瘍血管内皮細胞の遺伝子解析に関する研究が報告された。しかし遺伝子解析に用いられたのは未培養の腫瘍血管内皮細胞であり、その後培養は行っておらず、生物学的な性質は未だ不明な点が多い。

そこで今回、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3)、腎淡明細胞癌細胞株 (OS-RC-2) のヌードマウス皮下移植腫瘍モデルから分離した 2 種の腫瘍血管内皮細胞 (oral carcinoma EC, renal carcinoma EC) と、非担癌ヌードマウスの皮膚から分離した正常血管内皮細胞 (skin EC) を用い、分離後、長期間にお

いて同一培養条件のもとで腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の性質を比較検討した。

血管内皮細胞の分離、培養は樋田らが報告した方法に準拠して行った。HSC-3 および OS-RC-2 をヌードマウス皮下に移植し、成長した腫瘍組織から磁気細胞分離法により CD31 陽性細胞を分離した。その後継代培養を続け、分離後 2 か月から 3 か月長期培養を行った、継代数が 15 から 25 の細胞を用いて以下の実験を行った。

分離した血管内皮細胞の純度を確認するため、FACS 解析を行ったところ、BS1-B4 レクチンと強く結合しており高い純度であることが分かった。また血管内皮細胞マーカーである CD105, CD144 も陽性であり、長期培養後でもその発現を維持していることが分かった。さらに純度を確認するために血管平滑筋細胞マーカーである α SMA の発現を、マウス線維芽細胞 (NIH3T3) を陽性対照として定量的リアルタイム RT-PCR および細胞免疫染色により解析した。その結果、定量的リアルタイム RT-PCR では分離した血管内皮細胞はほとんど発現しておらず、細胞免疫染色では発現を認めなかったことから、分離した細胞は他の細胞の混入がほとんどないことが示された。

分離培養した腫瘍血管内皮細胞を用いて、すでに腫瘍血管内皮細胞マーカーとして 2000 年に報告された tumor endothelial marker 8 (TEM8) の発現を解析した。tumor endothelial markers (TEMs) は、ヒト大腸癌と正常大腸粘膜から分離した未培養の血管内皮細胞を用いて、腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現する遺伝子として同定された。最近 TEMs の中で TEM8 がより腫瘍血管に特異的であるという報告あったため、その発現を定量的リアルタイム RT-PCR および細胞免疫染色により解析した。その結果、腫瘍血管内皮細胞は、TEM8 の発現を亢進していた。もう一つの既知の腫瘍血管内皮細胞マーカーである、amino peptidase N (APN, CD13) の発現も確認した。APN はフェージディスプレイテクニックにより、ヒトやマウスの腫瘍血管系の NGR (asparagine-glycine-arginine) ペプチドのレセプターとして同定された。APN の発現を、定量的リアルタイム RT-PCR および FACS により解析した。その結果、腫瘍血管内皮細胞は APN の発現を亢進していた。さらに、腫瘍血管内皮細胞を分離する前の、各種ヒト腫瘍細胞移植後のヌードマウス腫瘍組織の連続切片を用いた免疫組織染色で確認したところ、腫瘍組織中の CD31 陽性血管内皮細胞の分布に一致して APN の発現が確認された。一方、正常組織では APN の発現は認められなかった。ヒト腫瘍血管内皮細胞マーカーとして既に報告されている TEM8 が、本研究で分離したマウス腫瘍血管内皮細胞でも発現を確認さ

れたことは、大変意義深いと考える。さらに、APNに関しては *vivo* での発現を、長期培養後でも維持していることが確認された。

腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の増殖能、および運動能を比較検討するため、細胞増殖アッセイ、wound-healing アッセイを行った。その結果、腫瘍血管内皮細胞は、増殖能、運動能ともに高い傾向であった。また、血管内皮細胞の増殖因子および遊走因子である VEGF-A に対する腫瘍血管内皮細胞の遊走能を、Boyden chamber を用いた細胞遊走アッセイにより確認した。その結果、腫瘍血管内皮細胞は VEGF-A に対する遊走能が高い傾向であった。また腫瘍血管内皮細胞は、定量的リアルタイム RT-PCR により、VEGF-A のレセプターである VEGF receptor 1, VEGF receptor 2 の発現を亢進しており、腫瘍血管内皮細胞は血管内皮細胞マーカーだけでなく血管新生因子の発現も維持していることが分かった。腫瘍血管新生の機序において、癌細胞は既存の正常血管から発芽を促すことの他に、近年、骨髄由来の血管内皮前駆細胞を腫瘍局所に動員して血管内皮に分化させ血管新生を誘導するという報告がある。分離した腫瘍血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞との関連を検索するため、マウス幹細胞マーカーの一つである stem cell antigen-1 (Sca-1) の発現を確認した。定量的リアルタイム RT-PCR, FACS 解析により、2 種の腫瘍血管内皮細胞はいずれも Sca-1 の発現を亢進していた。これらのことから、分離した腫瘍血管内皮細胞の一部は骨髄由来血管内皮前駆細胞である可能性が示唆された。

以上より、腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の生物学的な性質の一部が明らかとなった。さらに、腫瘍血管内皮細胞は長期培養後も、その特性の少なくとも一部を維持することがわかり、これらの細胞が腫瘍血管新生研究への応用、さらにそれらを用いての血管新生阻害剤の開発、スクリーニングに有用であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

腫瘍血管内皮細胞は長期培養下においても その特性を維持する

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

腫瘍組織から腫瘍血管内皮細胞を確実に分離し、培養するには様々な困難があることから、腫瘍血管内皮細胞の生物学的な性質は未だ不明な点が多い。本研究は、継代培養が腫瘍血管内皮細胞の性質に及ぼす影響を明らかにする目的で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、腎淡明細胞癌細胞株のヌードマウス皮下移植腫瘍モデルから分離した2種の腫瘍血管内皮細胞と、非担癌ヌードマウスの皮膚から分離した正常血管内皮細胞を、分離後、同一培養条件下で長期間にわたって継代培養し、内皮細胞における性質の変化について比較検討したものである。血管内皮細胞の分離、培養は、樋田らが報告した方法に準拠し、磁気細胞分離法により CD31 陽性細胞を分離した。その後継代培養を続け、分離後2か月から3か月間長期培養を行った。継代数が15から25の細胞を用いて以下の実験を行った。

まず、FACS解析を行ない、細胞とBS1-B4レクチンとの強い結合から、分離した細胞は高純度の血管内皮細胞であることを確認した。血管内皮細胞マーカーであるCD105、CD144も陽性であり、さらに長期培養後にもその発現を維持していることが確認された。また、マウス線維芽細胞を陽性対照として血管平滑筋細胞マーカーである α SMAの発現をリアルタイムRT-PCRおよび細胞免疫染色により解析し、分離細胞中に他の細胞はほとんど混入していないことを確認した。

分離培養した腫瘍血管内皮細胞を用いて、すでに腫瘍血管内皮細胞マーカーとして報告されている tumor endothelial marker 8 (TEM8) の発現をリアルタイムRT-PCRと細胞免疫染色により解析し、正常血管内皮細胞に比べてTEM8の発現が亢進していることを明らかにした。もう一つの既知の腫瘍血管内皮細胞マーカーである amino peptidase N (APN, CD13) についても、リアルタイムRT-PCRとFACS解析とにより検討し、APN発現が亢進していることを明らかにした。なお、腫瘍血管内皮細胞分離前の、各種ヒト腫瘍細胞

移植後のヌードマウス腫瘍組織に対する免疫組織染色において、腫瘍組織中の CD31 陽性血管内皮細胞の分布に一致して APN の発現が確認されたが、正常組織では APN の発現は全く認められなかった。

長期培養後の腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の増殖能および運動能を、細胞増殖アッセイと wound-healing アッセイとで検討し、腫瘍血管内皮細胞は増殖能、運動能ともに高い傾向を示すことを明らかにした。また、血管内皮細胞の増殖因子および遊走因子である VEGF-A に対する腫瘍血管内皮細胞の遊走能を Boyden chamber を用いた細胞遊走アッセイにより検討し、腫瘍血管内皮細胞は VEGF-A に対して遊走能が高い傾向を示すことを明らかにした。さらに、リアルタイム RT-PCR 解析により、腫瘍血管内皮細胞は VEGF-A のレセプターである VEGF receptor 1, VEGF receptor 2 の発現を亢進していることを明らかにし、腫瘍血管内皮細胞は血管内皮細胞マーカーだけでなく血管新生因子の発現も維持していることを示した。

最後に、リアルタイム RT-PCR, FACS 解析により、マウス幹細胞マーカーの一つである stem cell antigen-1 (Sca-1) の発現を検索し、全ての腫瘍血管内皮細胞において Sca-1 の発現が亢進していることを確認した。この結果は、少なくとも分離した腫瘍血管内皮細胞の一部は骨髄由来血管内皮前駆細胞 (EPC) である可能性を示唆している。

本研究の結果、分離した腫瘍血管内皮細胞は長期培養後もその特性を維持していることが明らかとなった。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) 正常な血管が秩序だっているとはどういうことか、
 - 2) 細胞を継代培養すると、一般にどのような変化が見られるか、
 - 3) FACS 解析の原理は、
 - 4) TEMs は現在までに幾つ報告されているのか、いずれも腫瘍特異的か、
 - 5) 腫瘍血管細胞が高い増殖能と運動能を持っていることは、臨床的にどのような意味を持つと考えられるか、
 - 6) 冷凍保存後も特性は保持されるのか、
 - 7) EPC は TEM8 を発現しているのか、
- 等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、分離した腫瘍血管内皮細胞は長期培養後もその特性を維持していることを明らかにし、腫瘍血管新生分野の研究に極めて有用性の高い細胞であることを示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。