

## 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)

## 学位論文内容の要旨

【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 (PGI<sub>2</sub>) をリガンドとする。PGI<sub>2</sub> 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 TXA<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> および PGI<sub>2</sub> 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、PGI<sub>2</sub>/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%CO<sub>2</sub>-95%気相下において 10% 牛血清白蛋白(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、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)、PGI<sub>2</sub> 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 も mTEC において高い発現レベルを認めた(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 FAKtyr397 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、PGI<sub>2</sub>/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と示唆された。また TEC は PGI<sub>2</sub> を自己分泌により腫瘍血管新生に利用していることと示唆された。さらに本研究では、TEC における 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。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	近藤	亨
副査	准教授	篠原	信雄
副査	教授	清野	研一郎
副査	教授	野口	昌幸

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)

本研究は、腫瘍血管内皮細胞 (TEC) に発現亢進している **Prostacyclin receptor** (IP receptor) と **Lysyl oxidase (LOX)** に着目し、TEC におけるこれらの分子の発現及び機能について解析されたものである。副査の野口昌幸教授が体調不良により欠席されたため、学位審査は 3 名の審査員により非公開で行われ、申請者の発表後、質疑応答が行われた。後日、野口教授から学位論文に対する評価を頂いた。

審査会では、まず清野教授より正常血管内皮細胞(NEC)と TEC の違いについて質問があった。申請者は、腫瘍微小環境内で NEC が **Epigenetic** な変化を受け TEC に変化する可能性や TEC が癌幹細胞由来である報告などを説明した。加えて、TEC が染色体異常を有すること、増殖能・遊走能が亢進していること、NEC に見られない複数の遺伝子発現が誘導されている回答も得られた。また、清野教授より研究に用いた初代培養血管内皮細胞は継代に伴い、遺伝子発現が変化しないのか質問があった。申請者は、本研究に用いた細胞は 16-24 代継代を続けているが血管内皮細胞マーカーを含めた遺伝子発現に変化が見られなかったと回答した。

次に、篠原准教授より LOX の実験モデルについて、がん細胞が LOX を発現しない状況下での TEC が LOX を発現するメカニズムについての質問があった。申請者は、TEC が低酸素下に存在する事や腫瘍細胞から分泌される VEGF 刺激が LOX の発現誘導に働いていると回答した。

最後に、近藤は数ある候補因子の中で申請者が IP receptor と LOX に着目した理由について質問した。申請者は、TEC における両因子の発現が NEC の数百倍であることや TEC における両因子の機能解析が未報告であることが着目した理由であ

ると回答した。また、近藤は *in vivo* 実験において肺転移部位での血管新生と LOX の関係について確認したかどうか質問した。申請者は、本研究では行っていないが、今後の検討課題としたいと回答した。腫瘍形成以外での LOX の発現の有無について、申請者は LOX が一部正常臓器や LOX 誘導シグナルにより NEC でも発現誘導されると回答した。

この論文は、IP receptor と LOX が TEC の血管新生能を促進する分子であることを様々な研究手法により明らかにしたものであり、これら分子の機能阻害が正常血管への影響を最小限にとどめ、がんの進展・転移を抑制できると期待される。

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。