

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）

学位論文内容の要旨

【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 発現制御に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常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。健常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 の発現が健常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。

学位論文審査の要旨

主査	教授	近藤	亨
副査	教授	佐邊	壽孝
副査	教授	畠山	鎮次
副査	教授	平野	聡

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)

本研究は、腫瘍血管内皮細胞における Biglycan の発現および機能を明らかにしたものである。副査の佐邊壽孝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、佐邊教授から学位論文に対する評価を頂いた。

審査会では、まず畠山教授より腫瘍血管内皮細胞において Biglycan 抑制により細胞遊走能と管腔形成能が低下するのは“細胞分化”という観点からは相反する結果ではないかとの質問があった。申請者は、血管新生においては細胞遊走能、管腔形成能、細胞増殖能の3因子の協調が重要であり、相反する結果ではないことを説明した。次に、Western blotting 法を用いた Biglycan タンパクの解析で見られる高分子量 (200kDa) のバンドについて質問があった。申請者は、細胞抽出物には分子量 42kDa のコアタンパク質のみが検出されるが、癌患者血清中にはコアタンパク質と糖鎖修飾された高分子量タンパク質が検出されることを説明した。また、Western blotting 法を用いた細胞上清や癌患者血清中の Biglycan タンパクの解析におけるコントロールについての質問があった。申請者は、内在コントロールはないものの、同量のタンパク質を実験に用いたこと、サンプルを泳動・転写後に PVDF 膜とゲルに残っているタンパク質を染色し、サンプル間で量的違いがないことを確認したと回答した。他に Biglycan の発現や機能の assay に関するいくつかの質問があったが、申請者は適切に回答した。

次に、平野教授より管腔形成能試験の評価法について質問があった。申請者は、管腔形成能が一般的に管腔長の和および血管内皮細胞間の接合数で評価することを説明し、本研究においては管腔長の和を用いたと回答した。次に、TLR中和抗体を用いた Biglycan のオートクライン機構の評価の適正について質問があった。申請者は、厳密な検討を行うためには無血清培地での血管内皮細胞培養法の確立や培養上清中に存在する Biglycan 以外のリガンドの除去等解決すべき多くの問題があり今後の課題としたいと回答した。ヒト腎癌お

よび健常部より分離培養された血管内皮細胞のBiglycanの発現解析において、健常部から採取した正常血管内皮細胞のBiglycanの発現が高い症例があるがその要因についての質問があった。申請者は、Biglycanは炎症により発現亢進することが報告されており、指摘されたサンプルが透析腎症例であったことが有力な理由であると回答した。また、癌微小環境に分泌されたBiglycanが、腫瘍血管内皮細胞の遊走能・管腔形成能の亢進以外に別の機能を有するか質問があった。申請者が現在進めている腫瘍血管内皮細胞と癌細胞との相互作用の解析から、腫瘍血管内皮細胞が分泌したBiglycanが腫瘍細胞の遊走因子として機能している可能性を示唆した。また、癌関連線維芽細胞やその他の細胞との相互作用についても研究を行う予定であると回答した。

最後に、近藤は癌患者の血清中のBiglycanの腫瘍生物学的意義について質問した。申請者は、Biglycanが転移先臓器においてpremetastatic nicheを形成し、癌細胞の転移を促進している可能性を考慮し、今後、in vivo実験を行う予定であることを回答した。また、Biglycan K/Oマウスへの腫瘍細胞移植実験により、血管新生への影響を検討するかとの質問については、Biglycan K/Oマウスは胎生致死ではないが、大動脈解離、骨粗鬆層などで長期生存が難しいものの、指摘された実験を今後行う予定であると回答した。

この論文は、Biglycanが腫瘍血管内皮細胞において発現が亢進し、TLR2 および TLR4 を介したオートクライン機構で腫瘍血管内皮細胞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を明らかにした。Biglycan は、腫瘍血管内皮細胞の新規マーカーとして、正常血管に対する傷害をもたらすことのない、腫瘍血管により選択的な新たな血管新生阻害療法の標的として期待される。

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）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。