

主論文

STROMAL VERSICAN REGULATES TUMOR GROWTH BY PROMOTING ANGIOGENESIS

(間質由来バーシカンが血管新生を促進することで腫瘍成長を制御する)

【緒言】

血管新生はがんの進展を制御する不可欠な現象である。腫瘍に浸潤した血管はがん細胞に酸素や栄養素を供給することで腫瘍成長を促進するほか、遠隔臓器への経路を準備することで転移を助ける。血管新生はがん細胞と、血管内皮細胞や免疫細胞などを含む間質との対話によって生じるがん微小環境の支配の下で進展する。がん微小環境には豊富な細胞外マトリックスが存在しており、血管新生に関与するとされる。しかしながら、がん微小環境による血管新生の制御機構については多くが不明である。

細胞外マトリックス・プロテオグリカンの一つであるバーシカンは、いくつかのがん患者の予後不良と関連するとされるが、バーシカンの腫瘍血管新生における意義の多くが不明である。バーシカンは新規のマトリックス分解酵素 (MMP) ファミリーである ADAMTS プロテアーゼによって切断されることが知られており、その分解産物は肢芽の発生および骨髄腫において生理活性を有する産物 (versikine) としてはたらく。さらにバーシカンの切断が血管のリモデリングにおいて生じることが報告されているが、腫瘍血管新生におけるバーシカンの分解の関与は明らかとなっていない。

本研究では、腫瘍血管新生における間質由来バーシカンの寄与と ADAMTS プロテアーゼによるバーシカン分解の関連について検証を行った。

【材料と方法】

細胞培養および担がんマウスモデルの作製

B16F10 マウスメラノーマ細胞、Lewis マウス肺がん細胞 (LLC 細胞)、MDA-MB231

ヒト乳がん細胞をそれぞれ 10%FBS 含有 DMEM 培地にて培養した。同種移植モデルとして 1.0×10^6 の B16F10 細胞、LLC 細胞を C57BL/6 野生型マウスおよびバーシカンハプロ不全マウス (*Vcan*^{hdf/+} マウス) の皮下に移植した。また異種移植モデルとして 1.0×10^6 の MDA-MB231 細胞を BALB/c ノードマウスの皮下に移植した。ノギスを用いて腫瘍径を測定し、回収した腫瘍組織は PCR、ウエスタンブロットおよび組織学的解析に用いた。

RNA 抽出・逆転写反応・PCR

がん細胞および腫瘍組織より RNA を抽出し、逆転写反応を行った。バーシカンに対するプライマーを用いて半定量 PCR、定量 PCR を行い、バーシカンの遺伝子発現を検証した。

ウエスタンブロット

がん細胞および腫瘍組織からタンパク質を抽出した。抗バーシカン GAG β 抗体および ADAMTS プロテアーゼによる切断を受けたバーシカンの断端に対する抗体 (抗 DPEAAE 抗体) を用いてウエスタンブロットを行い、バーシカンおよびバーシカンの分解産物の検証を行った。

免疫染色

回収した腫瘍組織を 4% PFA にて固定し、凍結切片を作製した。抗バーシカン GAG β 抗体、抗 CD31 抗体、抗 CD105 抗体、抗 F4/80 抗体を用いて免疫染色を行い、バーシカンと血管内皮細胞およびマクロファージとの局在を検証した。また抗 DPEAAE 抗体を用いて腫瘍組織におけるバーシカン分解産物の局在を検証した。

RNA *in situ* ハイブリダイゼーション

回収した腫瘍組織を 4% PFA にて固定し、パラフィン切片を作製した。バーシカンに対するプローブを用いて RNA *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、腫瘍組織におけるバーシカン遺伝子の局在を検証した。

統計解析

各データは平均値±標準偏差 (SD) にて表した。各結果は *t* 検定および

Bonferroni テストにより検定し、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

【結果】

がん微小環境はバーシカンの発現に寄与する。

まず我々は各がん細胞におけるバーシカンの発現を検証した。半定量 PCR、定量 PCR およびウエスタンブロットの結果、B16F10 細胞および MDA-MB231 細胞はバーシカンの発現量が低く、一方 LLC 細胞は高い発現量を示した。ところが、各がん細胞をそれぞれ移植して得られた腫瘍内におけるバーシカンの発現量を検証した結果、いずれの腫瘍においても細胞培養時よりも高いバーシカンの発現量を認めた。そこで免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションによりバーシカンおよびバーシカン mRNA の局在を検証した結果、バーシカンは腫瘍辺縁部に顕著に発現していることが明らかとなった。そこで、ヒト乳がん細胞である MDA-MB231 細胞をヌードマウスに異種移植して得られた腫瘍組織に対して、ヒトバーシカンおよびマウスバーシカン特異的なプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、マウスバーシカン、すなわち間質由来バーシカンが顕著に検出された。以上の結果より、がん微小環境がバーシカンの発現に寄与することが示唆された。

バーシカンは腫瘍血管部およびマクロファージ近傍に局在した。

続いて辺縁部におけるバーシカンのさらなる組織学的な検証を行った。免疫染色の結果、CD31・CD105 陽性の血管内皮細胞および F4/80 陽性のマクロファージの近傍における顕著なバーシカンの分布を認めた。すなわち、バーシカンは腫瘍血管部およびマクロファージ近傍に局在することが明らかとなった。

バーシカン分解産物は腫瘍血管部に分布した。

そこで我々は、ADAMTS プロテアーゼによって切断されたバーシカンの分解産物に着目した。切断されたバーシカンの断端に対する抗体（抗 DPEAAE 抗体）を用いてウエスタンブロットおよび免疫染色を行った結果、腫瘍血管部におけるバーシカンの断端のシグナルを認めた。さらにその断端のシグナルの一部は、切断されていないバーシカンよりも顕著に血管内皮細胞と共局在した。すなわ

ち、バーシカン分解産物の血管内皮細胞への再配置 (relocation) が生じていることが示唆された。

間質由来バーシカンの減少は、腫瘍成長の低下および腫瘍内部への血管浸潤の低下を呈した。

最後に、我々は間質由来のバーシカンの腫瘍血管新生における意義を検証するため、バーシカンハプロ不全マウスである *Vcan*^{hdf/+} マウスを用いた担がんマウスモデルの解析を行った。得られた腫瘍におけるバーシカン発現量は明らかに減少し、腫瘍成長の低下および腫瘍内部への血管浸潤の低下を認めた。以上の結果より、間質由来バーシカン、あるいはその分解産物が腫瘍血管新生および腫瘍成長を促進していることが示唆された。

【考察】

本研究結果よりがんの進展におけるバーシカンの意義についていくつかの知見が得られた。多くの先行研究ががん細胞由来バーシカンに焦点を当ててきた、あるいはがん細胞由来および間質由来バーシカンの区別を試みていなかった。それらに対し、我々は今回間質より供給されるバーシカンの腫瘍進展における関連を見出した。多くの間質由来バーシカンは腫瘍辺縁部に分布しており、さらに腫瘍血管と関連した。また ADAMTS プロテアーゼによるバーシカンの分解を認め、その分解産物の局在は切断されていないバーシカンの局在と異なった。先行研究において胚芽の発生時にバーシカンの分解産物が切断されていないバーシカンと異なる分布を示し、versikine としてはたらくことでアポトーシスと関連することが報告されている。今回の結果は、そのような先行研究の結果と一致しており、腫瘍内におけるバーシカン分解産物が versikine として独立した役割を担っている可能性が示唆された。さらにバーシカンのハプロ不全マウスは腫瘍成長の低下および腫瘍内部への血管浸潤の低下を示し、間質由来バーシカンの腫瘍進展における意義が明らかとなった。

特筆すべき点は、多くの先行研究より見出されている、高いバーシカンの発現ががん患者の予後不良と関連する点である。本研究結果では、バーシカンの

ハプロ不全マウスにおける腫瘍内バーシカンの減少に伴い、腫瘍内部への血管浸潤の低下を示し、さらに腫瘍成長の低下を呈した。この結果は、間質由来バーシカンが腫瘍内部への血管浸潤、すなわち血管新生に寄与することで腫瘍成長を制御している可能性を示唆していると我々は考える。

ADAMTS プロテアーゼは胎生期におけるバーシカンの分解に重要な役割をもつ。我々は腫瘍血管内皮細胞におけるバーシカン分解産物の局在を認めた。さらにバーシカンのハプロ不全マウスにおける血管浸潤の低下を認めた。これらの知見は、いくつかの ADAMTS プロテアーゼが血管周囲部においてバーシカンを分解し、結果生じた分解産物が血管内皮細胞へと再配置 (relocation) され、腫瘍血管新生に何らかの影響を与えている可能性を示唆する結果である。

ADAMTS プロテアーゼは現在 19 種類のメンバーより成り、いくつかの ADAMTS プロテアーゼメンバーが複雑に代償し合いバーシカンの切断に関与すると考えられている。今後は ADAMTS による切断耐性を有するバーシカンのマウスモデルやバーシカン分解産物のリコンビナントタンパク質などを用い、腫瘍血管新生における切断されていないバーシカンとその分解産物のはたらきの差別化を図る検証が期待される。

【結論】

本研究によって、間質由来バーシカンが血管新生を促進することで腫瘍成長を制御することが示唆された。