2005 年 9 月修了

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻　修士課程

伊藤　孝

学生証番号 **36506**

論文題目

The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is triggered by cancer cells

(線維芽細胞由来 VEGF による腫瘍選択的血管新生機構の解明)

キーワード

血管新生、がん、線維芽細胞、**VEGF**、**CTGF**、**MMP-7**

指導教官：落合　淳志　（東京大学　客員教授）

線維芽細胞由来 VEGF による腫瘍選択的血管新生機構の解明

学生証番号 36506 がん先端生命科学分野　伊藤　孝

【序論】

成体において血管新生は非常に厳密に制御されており、女性の性周期に関わる器官を除き通常血管新生は起こっていない。一方腫瘍では血管新生は継続的に亢進されており、増殖、転移などの腫瘍悪性化の一因となっている。腫瘍化により血管新生が起こるメカニズムに関しては 30 年以上に渡り非常に多くの研究が行われてきたが、いまだ解明が不十分である。現在の所広く受け入れられている概念は、腫瘍化により VEGF（vascular endothelial growth factor）を始めとする血管新生を正に制御する因子の発現が亢進し、血管新生を負に制御する因子群とのバランスが崩れる事で血管新生が起こるというものである。しかし、生理的な条件においてこれらの正の制御因子と負の制御因子が直接作用し合う事を報告する研究は無く、この概念は個々の血管新生制御因子の報告からの推測にすぎない。また VEGF などの正の制御因子は臓器によっては正常でも発現が高い事が知られているが、それにも関わらず正常組織では血管新生が厳密に制御されている事を説明する具体的な分子メカニズムもまだ報告されていない。

本研究は、正常、腫瘍組織内ともに広く存在している細胞種である線維芽細胞を用いてその血管新生能を正常、腫瘍環境内において解析し、両者における血管新生制御の差を生む分子メカニズムを解析するものである。

【結果】

1.腫瘍内および非腫瘍内における線維芽細胞の血管新生能の解析

腫瘍内における線維芽細胞の血管新生能を解析する為に、種々のヒト線維芽細胞株をそれぞれヒト膵がん細胞株 Capan-1 とともにヌードマウス皮下に植え、形成された腫瘍を 2 週間後に解析した。その結果、ヒト線維芽細胞 VA-13 を加える事で腫瘍体積、腫瘍血管密度が有意に増加した。その原因分子の候補として、線維芽細胞 VA-13 において最も発現が高かった事から、主要な血管新生因子として知られる VEGF に注目した。siRNA を用いて線維芽細胞 VA-13 における VEGF 発現を抑制する事で、線維芽細胞 VA-13 が示していた腫瘍増殖効果、血管新生亢進効果が抑制された。VEGF の受容体は血管内皮細胞特異的に発現している事、*In vitro* における共培養実験において線維芽細胞 VA-13 によるがん細胞 Capan-1 の増殖に対する影響がなく直接がん細胞自身の増殖を亢進する作用が無かった事を合わせて考えると、線維芽細胞 VA-13 は腫瘍内において血管新生因子 VEGF を産生する事により血管新生を亢進している事、そしてそれに伴い腫瘍体積が増加している事が示された。

次に非腫瘍内における線維芽細胞の血管新生能を解析する為に、線維芽細胞 VA-13 を単独でヌードマウス皮下に植え、皮下における血管組織を観察した。その結果、線維芽細胞 VA-13 単独投与による血管組織の変化は確認されなかった。加えてニワトリ漿尿膜法を用いて線維芽細胞 VA-13 の血管新生能を評価したが、マウス内と同様に線維芽細胞 VA-13 単独では血管新生を亢進しなかった。さらに *In vitro* においてヒト血管内皮細胞を用いた管腔形成法を用いて線維芽細胞 VA-13 の培養上清の血管新生能を評価したが、培養上清により血管新生は亢進されなかった。以上の結果より、線維芽細胞 VA-13 は非腫瘍内、すなわち正常組織では血管新生を亢進しない事が示された。また ELISA の結果、線維芽細胞 VA-13 培養上清中に VEGF が産生されていた事から、線維芽細胞 VA-13 由来の VEGF は不活性化した状態で細胞外に産生されている可能性が考えられた。

2.線維芽細胞由来 VEGF による腫瘍選択的な血管新生機構の解析

上記のように線維芽細細胞 VA-13 が腫瘍内においてのみ血管新生能を示すメカニズムとして、我々は、*in vitro* において CTGF(connective tissue growth factor)が VEGF に結合し VEGF の機能を抑制するという報告、また別の報告で CTGF が細胞外タンパク分解酵素ファミリーである MMPs(matrix metallo-proteinases)によって分解される事、VEGF は MMPs によって分解されない事に注目した。定量性 PCR の結果線維芽細胞 VA-13 を含め全ての線維芽細胞において CTGF が発現していた事、そしてがん細胞 Capan-1 において MMP ファミリーの一つである MMP-7 が選択的に発現していた事から、線維芽細胞 VA-13 由来の VEGF は CTGF が結合する事により不活性化した状態で細胞外に産生されており、それががん細胞 Capan-1 が発現する MMP-7 により活性化される事で腫瘍選択的な血管新生が起こる可能性を考えた。

この仮説を検討する為に、これらのタンパクで処理した線維芽細胞 VA-13 の培養上清の血管新生能を管腔形成法により評価した。その結果、MMP-7 で処理する事により培養上清の血管新生能が誘発され、その効果は抗 VEGF 中和抗体により抑制された。この事から MMP-7 は線維芽細胞由来の不活性化した VEGF を活性化する事が示された。また MMP-7 により誘発された血管新生能は CTGF によっても抑制された事から、CTGF が線維芽細胞由来の VEGF を不活性化する事が示された。これらの分子メカニズムが腫瘍内において働いているか検討する為に、siRNA を用いてがん細胞 Capan-1 の MMP-7、線維芽細胞 VA-13 の CTGF の発現を抑制した状態でヌードマウスに植え、形成された腫瘍を解析した。その結果、がん細胞 Capan-1 の MMP-7 発現を抑制する事で線維芽細胞 VA-13 由来の VEGF による腫瘍に対する効果が失われた。さらに線維芽細胞 VA-13 の CTGF 発現を抑制する事で、MMP-7 抑制によって失われた効果が再び現れた。

以上より、線維芽細胞由来の VEGF は CTGF により不活性化された状態で産生されており、それががん細胞に由来する MMP-7 により活性化される事が、正常組織では起こらないが、腫瘍内で選択的に血管新生が亢進されているメカニズムである可能性が示された。

【考察】

本研究の意義としてがん組織と正常組織における血管新生の違いを説明する新たなメカニズムをヒトの細胞と動物を用いた実験で示した事が挙げられる。その違いががん細胞と正常細胞それぞれに由来する細胞外タンパクの相互作用によって起こるという概念も非常に新しい考え方である。また今まであまり研究が進んでいない腫瘍、正常組織を構成する線維芽細胞の生理的意義に関して新たな概念を言及できる点においても価値があると考えている。また VEGF はがん治療の分子標的薬として大きな効果を挙げ注目されている分子であり、本研究が提示する生体における VEGF の活性に関する新しい知見は、非常に近い将来にがん治療、診断へと応用される可能性が十分に考えられる。　　以下に本研究の概略図を示す。

