

腫瘍血管内皮細胞の特異性

1. 腫瘍血管新生

血管新生：Angiogenesis とは既存の血管から新たに血管分岐が発芽して伸長することをいい、脈管形成：vasculogenesis は血管前駆細胞からの分化によって血管内皮細胞が発生し管腔を形成する過程である¹⁾。これらは成体でも起こるが、主に発生期にみられる現象である²⁾。内皮細胞だけで形成された血管は不安定で周囲に壁細胞とよばれる血管平滑筋やペリサイトの裏打ちができて成熟化し、大中小の径が異なる血管によって階層ができる。発生期のみならず成体においても酸素や栄養の需要に応じて血管の階層性変化や退縮といった血管リモデリングはおこっている。これも広義の血管新生であるが、一般的には既存の血管から発芽して新たな血管ができることを血管新生という。成体でおこる血管新生は、がんや創傷治癒の際など虚血に陥った組織において低酸素や増殖因子の影響などでがん細胞が血管新生因子を放出することで誘導される。

がんにとって腫瘍血管は酸素や栄養を供給するばかりで

はなく、遠隔臓器への転移のする際の関門になっている(図1)。

血管新生因子には vascular endothelial growth factor (VEGF) のほか、basic fibroblast growth factor (bFGF)、angiopoietins、hepatocyte growth factor (HGF)、EGF、placental-derived growth factor (PlGF) など存在する³⁾。がんではこのような血管新生因子が過剰になっている。

2. 血管新生阻害療法

血管新生阻害療法は、がん組織を養う血管を標的にし、がんを兵糧攻めにする治療法で、Dr. Judah Folkman によって1971年に提唱された。実際には、ヒト VEGF 中和抗体、ベバシズマブの認可により、さらに広く知られるようになった。この治療法の根底には、「血管内皮は正常細胞で遺伝学的に安定である。したがって、がん細胞のように薬剤抵抗性を獲得することはない。」という概念が存在していた。血管新生阻害療法は、全てのがんに共通する血管新生を標的としているため、多くの癌腫で抗癌剤との併用上乗せ効果が認められている。しかし、ベバシズマブを代表とした既存の血管新生阻害剤は正常血管にも必須の VEGF シグナルを遮断するため、高血圧や出血などの副作用の問題も明らかになっている。これらの血管新生阻害剤の多くは分離培養の比較的平易な正常血管内皮細胞 (Nor-

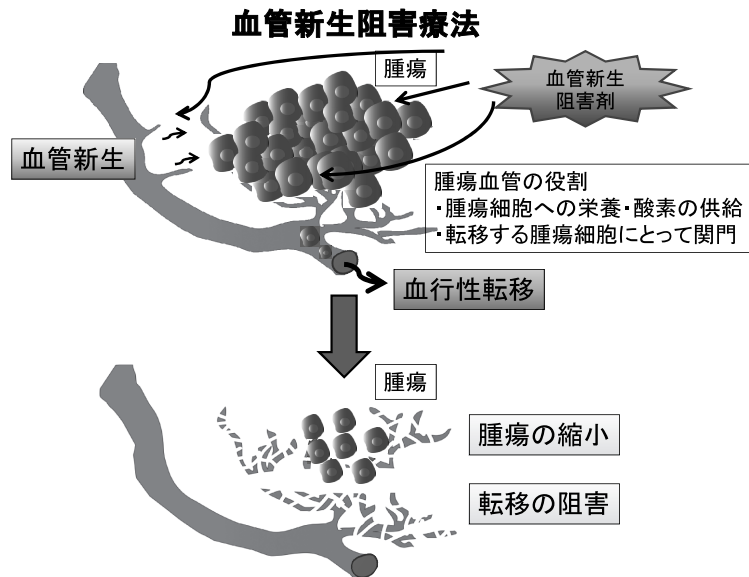


図1 腫瘍血管新生阻害療法
腫瘍血管の役割として、腫瘍細胞への栄養・酸素の供給と転移する腫瘍細胞にとっての関門の役割がある。腫瘍血管新生阻害療法は新生してくる血管を標的として、腫瘍の縮小と転移の阻害をもたらす。

mal endothelial cell: NEC) を用いて開発されたものであるが、実際の腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) は正常部位の血管とはかなり異なる環境に存在する。そこは低酸素、低栄養、さらにはがん細胞やがん間質細胞から分泌されるサイトカインに暴露された環境にある。がん細胞に薬剤抵抗性をもたらすような腫瘍微小環境が TEC にも遺伝学的な変化をもたらすことも考えられ、TEC の性質はこれまでの概念よりもはるかに複雑なものであることが最近の研究で示唆され始めている。一方、腫瘍血管は、がん組織を養うばかりではなく、がん幹細胞のニッチ (住みか) を形成していることや、がんの転移にも重要な役割を担っていることがわかってきた。以上より腫瘍血管を標的とした新しい治療法の開発の重要性は依然高いと考えられる (図 1)。

3. 腫瘍血管の異常性

腫瘍血管は正常血管と比較して病理組織学的に異なり、未熟である。TEC 同士の接着が正常に比べて疎であり、血管の壁細胞は存在するが血管内皮細胞との接着は疎であるため血管の透過性が亢進している。

また、血管基底膜も異常であることが知られている。IV 型コラーゲンの厚みが血管の部位によって異なり不規則である。このようなことから腫瘍の組織間圧は高くなり、血管の屈曲や湾曲などがあちこちにみられ、血流のよどみが生じている。その結果、正常血管が動脈、静脈、毛細血管が秩序をもった階層構造をとっているのに対し、腫瘍血管は不均等な径をもつ血管が乱雑に走行している⁴⁾。そのため血管が豊富であるにもかかわらず血流が少なく、がん組織は低酸素状態になっている。そして、放射線療法が効きにくい原因のひとつがこの低酸素状態であることが知られている。

4. 腫瘍血管内皮細胞を用いた研究

腫瘍血管内皮細胞の分離と培養が技術的に平易ではないため、腫瘍血管新生の *in vitro* 研究の多くは正常組織由来の細胞であるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) やヒト皮膚毛細血管内皮細胞 (HMVEC) が主に用いられてきた。しかし、上述のようにがん組織の中では血管も正常組織と異なる形態を持つことが知られるようになり、近年、腫瘍組織中のわずかな割合を占める (約 2% 前後) TEC を分離し、それらを用いた研究もなされるようになってきた。そのことにより腫瘍血管の構成要素である内皮細胞そのものが正常と異なることが知られてきた⁵⁾。

われわれもこれまで TEC の特性を解析するために、これまで TEC を分離し、それらを培養して様々な特異性を見出してきた⁶⁾。

5. 腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現解析

TEC 特異遺伝子に関する報告はこれまでいくつかある。Tumor endothelial marker (TEMs) は前述の St. Croix らによって同定され⁵⁾、そのうちもっとも腫瘍血管に特異的とした TEM8 がメラノーマの増殖に関与していることが最近報告されている。Dickkopf-homolog 3 (Dkk-3)、CD13、Collagen 2a、integrin $\alpha V\beta 3$ などが腫瘍血管で発現が亢進していることや、卵巣がんや大腸癌の TEC マーカーに関して複数の報告があることから⁷⁾、腫瘍血管が形態だけではなく遺伝子発現レベルでも正常血管とは異なることが示されている。また、これまで腫瘍組織内ではがん細胞に高く発現していると知られていた遺伝子が最近、TEC においてもその発現が亢進していることが報告されている。例えば、われわれは上皮細胞増殖因子 (EGFR: epidermal growth factor receptor)⁸⁾ やシクロオキシゲナーゼ (COX-2)⁹⁾、VEGF¹⁰⁾ などが TEC で発現が高いことを報告している。

6. 腫瘍血管の生物学的な特性

われわれは、TEC の遺伝子発現解析に加え、それらを培養して NEC と生物学的性質を比較する研究も行ってきた。分離後数ヶ月を経たあとにおいても、培養腫瘍血管内皮は汎血管内皮マーカーの他に腫瘍血管に特異的と報告されている Tumor endothelial marker (TEM8)、CD13 などの分子の発現が確認できた¹¹⁾。このことにより少なくとも一部の TEC 特異性は培養条件下でも保たれるということが示唆された。また、TEC は NEC と比較して増殖能と遊走能が高く、VEGF、bFGF などの血管新生因子に対する感受性が高いことがわかった¹¹⁾。また、EGFR 阻害剤や polyphenol epigallocatechin-3 gallate (EGCG) に対する感受性も高いことがわかった¹²⁾。さらに、TEC における COX-2 や VEGF の発現亢進は Hu antigen R (HuR) によってこれらの mRNA が細胞質内で安定化していることがわかり、低酸素・低栄養に陥ったがん細胞においてみられる同じ機構を TEC も使ってそれらの高い生存性を保っていることが示唆された¹⁰⁾。さらに、TEC には幹細胞のマーカー Sca-1、CD90 が発現しており、このことは TEC の一部は血管内皮前駆細胞であるというこれまでの見解を裏付けるものと思われる。また 2008 年には TEC が骨や軟骨への分化能をもっており、幹細胞様の性質をもっているという報告も

なされている¹³⁾。

7. 腫瘍血管内皮細胞の染色体異常

TECの特異性として、我々はそれらには染色体異常(核型異常)があることを見出した⁶⁾(図2A, B)。分離直後の未培養の血管内皮細胞に抗CD31の免疫染色とFISHを行った検討では、TECには16-54%の異数体(anuploidy)が認められ、これらのanuploidyは継代後のTECではさらに増悪することもわかった。核異型については肝細胞や筋細胞などの正常細胞においても4倍体(tetraploidy)が見られることはある。しかしTECには単なる染色体の数が多い(polyploidy)だけではなく、由来の不明なmarker chromosome, translocation, double minute, missing chromosomeなどの染色体の構造異常があることがmulti-color fluorescent in situ hybridization FISH(M-FISH)によって認められたことから、単なるtetraploidyを超えてTECには染色体不安定生:chromosomal instability(CIN)があることが示唆された。

正常な細胞周期チェック機構が働いている細胞に染色体数異常が起こるとそれ以降の細胞分裂はおこらない。すなわち、TECにおいては、それらがaneuploidのまま増殖を続けていることから細胞周期チェック機構がもはや正常に

働いていないことが示唆される。

ちなみに、核異型のあるTECの所見は混入した腫瘍細胞によるものではないということは、われわれのマウスTECでは既に証明済みである^{6,14)}。またFISHやM-FISHのプロープはマウス細胞に特異的でありヒト細胞にはハイブリダイズしないことも確認した。よってマウスTECにおける染色体異常を示した細胞は混入した腫瘍細胞ではない。

われわれは、ヒト悪性腫瘍の切除検体の切片と分離したヒトTECのFISHを行い、ヒトTECにおいても染色体異常があることを見出した(図2C, D)¹⁵⁾。なお、TECがaneuploidyを獲得する機序については未だ不明である。文献的には、このような染色体異常をもつTECはマウスのヒト腫瘍移植モデルにおいてのみならず、ヒトの悪性腫瘍、例えば、腎がん、神経膠芽種、悪性リンパ腫においても報告されている。特にリンパ腫¹⁶⁾などの造血系腫瘍においてはがん細胞と同じ染色体異常がTECにも認められていることから、がん細胞または前駆細胞が脱分化して腫瘍血管を構成した可能性が示唆されている¹⁷⁾。

8. 腫瘍血管内皮細胞と薬剤抵抗性

TECは長年にわたり腫瘍細胞と異なって遺伝学的に正常だと考えられてきた。しかし、これらがchromosomal instabilityを獲得しているとすると、もはや腫瘍の間質に属する細胞も遺伝子の不安定性を持ちうるということが示唆され、TECが腫瘍細胞のように薬剤耐性を獲得する可能性を考慮しなければならない。

実際にわれわれのTECは5-FUやpaclitaxelなどいくつかの抗癌剤に対する感受性がNECより低かった(Akiyama in press)。

血管新生阻害療法が提唱されたときには想像されなかったが、近年、VEGF阻害などによる腫瘍血管新生阻害療法に対しても薬剤耐性獲得が生じるということが報告されている¹⁾。その機序としては、抗VEGF療法でVEGFを遮断し続けると腫瘍細胞がVEGF以外の血管新生因子を多く代償性に分泌するようになるという、主に腫瘍側に生じる抵抗性が考えられている¹⁾。しかし、TECががん微小環境において薬剤耐性を獲得する可能性も考慮しなければならない。以上、がんの治療には腫瘍細胞のみならず間質細胞も含めて視野に入れることで治療のターゲットを考慮する必要があることを裏付けるものである。

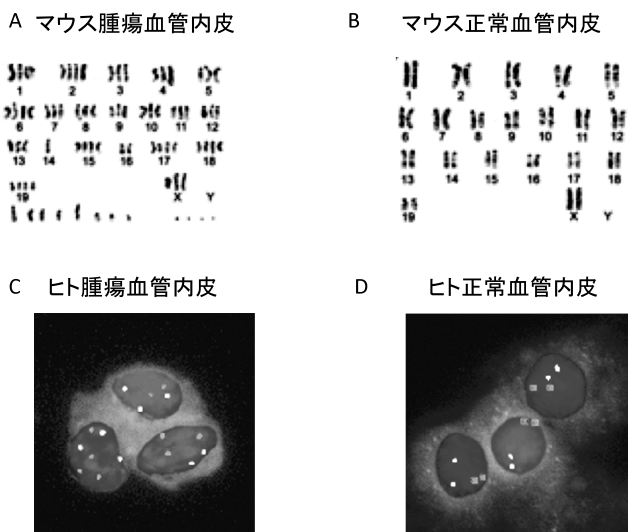


図2 腫瘍血管内皮細胞の染色体異常
マウスTEC(A)とマウスNEC(B)の核型。TECにはpolyploidyのみだけではなく、染色体転座や由来の不明なマーカー染色体などが見られた。さらにヒトがん組織から分離された未培養のTECにおいてchromosome 7(灰色)およびchromosome 8(白)の数異常(3個以上のシグナル)がみられ、aneuploidな細胞がみられた。

おわりに

TECを分離培養することにより、特異的遺伝子の発現とその意義、染色体の異常、抗癌剤への耐性などを明らかにすることができた。TECを含めた間質の細胞の多様なバイオロジーに対する理解が進み、それらも治療のターゲットとして視野に入れた新たな腫瘍治療戦略の開発が今後期待される。

- 1) Folkman, J. (2007) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 273–286.
- 2) Tepper, O.M., Capla, J.M., Galiano, R.D., *et al.* (2005) *Blood*, **105**, 1068–1077.
- 3) Bergers, G. & Benjamin, L.E. (2003) *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 401–410.
- 4) McDonald, D.M. & Choyke, P.L. (2003) *Nat. Med.*, **9**, 713–725.
- 5) St. Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., *et al.* (2000) *Science*, **289**, 1197–1202.
- 6) Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., *et al.* (2004) *Cancer Res.*, **64**, 8249–8255.
- 7) Hida, K., Hida, Y., & Shindoh, M. (2008) *Cancer Sci.*, **99**, 459–466.
- 8) Amin, D.N., Hida, K., Bielenberg, D.R., & Klagsbrun, M. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 2173–2180.
- 9) Muraki, C., Ohga, N., Hida, Y., *et al.* (2011) *Int. J. Cancer*,

130, 59–72.

- 10) Kurosu, T., Ohga, N., Hida, Y., *et al.* (2011) *Br. J. Cancer*, **104**, 819–829.
- 11) Matsuda, K., Ohga, N., Hida, Y., *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 947–954.
- 12) Ohga, N., Hida, K., Hida, Y., *et al.* (2009) *Cancer Sci.*, **100**, 1963–1970.
- 13) Dudley, A.C., Khan, Z.A., Shih, S.C., *et al.* (2008) *Cancer Cell*, **14**, 201–211.
- 14) Hida, K. & Klagsbrun, M. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 2507–2510.
- 15) Akino, T., Hida, K., Hida, Y., *et al.* (2009) *Am. J. Pathol.*, **175**, 2657–2667.
- 16) Streubel, B., Chott, A., Huber, D., *et al.* (2004) *N. Engl. J. Med.*, **351**, 250–259.
- 17) Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., *et al.* (2011) *Nature*, **468**, 824–828.

樋田 京子

(北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座
血管生物学教室)

Characteristics of tumor endothelial cells

Kyoko Hida (Vascular Biology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, N13 W7, Kita-ku, Sapporo 060–8586, Japan)