



Title	幹細胞マーカー陽性腫瘍血管内皮細胞の特性解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	角谷, 瞳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11245号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55309
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hitomi_Kakutani_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 角谷 瞳

学位論文題名

幹細胞マーカー陽性腫瘍血管内皮細胞の特性解析

腫瘍血管はがんの栄養や酸素を供給することで、その進展や転移に重要な役割を果たしており、腫瘍血管を標的とする血管新生阻害療法は多くのがん治療に用いられている。しかし、本療法には副作用の出現や十分な効果が得られない症例があることも報告されている (Jain RK et al, Nat Clin Pract Oncol. 2006)。近年、腫瘍血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cells : TECs) は正常血管内皮細胞 (Normal Endothelial Cells : NECs) と比べ、特異遺伝子の発現亢進 (St Croix B et al, Science 2000, Yamamoto K et al, Br J Cancer. 2012, Maishi N et al, Pathol Int. 2012, Osawa T et al, Cancer Sci. 2012, Osawa T et al, Br J Cancer. 2013) や染色体異常 (Hida K et al, Cancer Res. 2004, Akino T et al, Am J Pathol. 2009) など、分子生物学的に様々な特性を持つことが報告されており、先に述べた血管新生阻害療法の問題点を克服するためには TECs の生物像を解明することが必要であると認識されている。

われわれはこれまで、TECs は高い増殖能、生存能、血管新生能を有することを報告してきた (Matsuda et al, BBRC. 2010)。TECs は Sca-1, CD90 などの幹細胞マーカー、さらに幹細胞における高発現が報告されている Multidrug resistance 1 (MDR1) などの幹細胞マーカーを発現し、骨分化能やスフェロイド形成能といった幹細胞様の性質をもつことを見出している (Ohga N et al, Am J Pathol. 2012)。

最近、発生期に起きる生理的血管新生、あるいは虚血部位などで起きる病的血管新生において骨髄由来の Stem / Progenitor cell (造血幹細胞) や既存の血管内に存在する Residual な Stem / Progenitor cell が重要な役割を果たすことが報告されている (Naito H et al, EMBO. 2012)。しかしながら、腫瘍血管における Stem / Progenitor cell の役割に関しては未だ不明な点が多い。

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) は、アルコールの代謝により生成されるアセトアルデヒドを酢酸に分解する酵素として知られているが、近年では、造血幹細胞や神経幹細胞においてその活性が高いことが報告されており (Kastan MB et al, Blood 1990)、幹細胞マーカーとして広く用いられている。しかしながら、幹細胞における ALDH の機能や発現の意義はわかっておらず、腫瘍血管における発現についてもこれまで報告がない。そこで本研究は、腫瘍血管における幹細胞様 TECs が血管新生に果たす役割を明らかにすることを目的とし、ALDH 陽性 TECs の血管新生能について解析を行った。

TECs の性質を解析するために、A375SM (高転移性ヒト悪性黒色腫細胞株) のヌードマ

ウス腫瘍皮下移植片から TECs を、また対照としての NECs をヌードマウスの皮膚から分離した。分離培養された血管内皮細胞は、PCR 法で血管内皮特異マーカーを発現し、白血球マーカーを発現していないことから、純度が高いことが確認された。さらにヒト腫瘍細胞特異的に発現している hHB-EGF の mRNA は TEC において検出されず、ヒト腫瘍細胞の混入は否定された。

分離した TECs, NECs における血管新生能を評価するために、増殖能および細胞遊走能を解析した。TECs は NECs に比べ、増殖能が有意に亢進しており、走化性因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) に対する遊走能も有意に高かった。さらに TECs では NECs に比べ、血管内皮増殖因子 VEGF の mRNA 発現が約 2.3 倍高く、その受容体である VEGFR2 の mRNA 発現が約 32 倍高かった。これらのことから、過去の知見に一致して、TECs が高い血管新生能を有することが示された。

次に、TECs における幹細胞性について解析した。NECs にくらべ TECs では Sca-1, CD90, MDR1 などの幹細胞マーカーの発現が亢進していた。さらに TECs では、幹細胞マーカー ALDH の mRNA レベルが NECs に比べ約 4 倍高かった。また ALDEFLUOR を用いた解析により、ALDH 酵素活性の高い集団の割合が NECs では 4.1% だったが、TECs では 12.6% であった。これらのことから、TECs のなかにより多くの幹細胞の性質をもつ集団が存在する可能性が考えられた。

そこで、幹細胞性をもつ TECs の性質を解明するために、TECs のなかの ALDH 酵素活性の高い細胞集団 (ALDH (+) TEC) と、ALDH 酵素活性の低い細胞集団 (ALDH (-) TEC) をそれぞれフローサイトメーターにより分離した。

ALDH (+) TEC と ALDH (-) TEC における血管新生能を評価するため、管腔形成アッセイをおこなった。管腔形成開始 10 時間後において、ALDH (+) TEC は ALDH (-) TEC に比べ管腔を形成する内皮細胞同士のジャンクションの数が約 1.6 倍に増加しており、これらが管腔をより多く形成していたことが示された。また ALDH (-) TEC によって形成された管腔の多くが 24 時間後には崩壊したが、ALDH (+) TEC はマトリゲル上で管腔構造を維持していた。このことから、ALDH (+) TEC は ALDH (-) TEC に比べ高い管腔形成能ならびに管腔維持能をもつ可能性が考えられた。

また ALDH (+) TEC では ALDH (-) TEC に比べ、血管内皮増殖因子 VEGF の受容体である VEGFR 2 の発現が約 2.6 倍高かった。このことから、ALDH (+) TEC は VEGF に対する感受性が高いことが示唆された。VEGF / VEGFR2 経路の活性化が、ALDH (+) TEC における高い血管新生能の少なくとも一部のメカニズムになっている可能性が考えられた。

さらにヒトメラノーマおよび口腔がん皮下移植腫瘍の組織切片を用いた蛍光二重免疫染色により、ALDH 陽性細胞が *in vivo* 腫瘍血管の一部を構成していることが示された。

今回われわれは、腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞に比べ、幹細胞マーカー ALDH の遺伝子発現・活性が亢進していることを世界で初めて見出した。また、がんの血管には幹細胞マーカー陽性の内皮細胞が存在し、これらが高い血管新生能を有し、がんの進展・

転移に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。本研究により、腫瘍血管における幹細胞様集団を標的とした新たな血管新生阻害療法の有用性が示唆された。