



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	活性酸素種によるBiglycan発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進 [全文の要約]
Author(s)	北條, 敬之
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11731号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59256
Type	doctoral thesis
File Information	Takayuki_Hojo_summary.pdf



学位論文内容の要約

学位論文題目

活性酸素種による Biglycan 発現誘導を介した
腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 北條 敬之

腫瘍が増大するためには、血管からの酸素・栄養の供給が必須であり、血管新生が不可欠である。がん細胞は様々な増殖因子を分泌して血管新生を誘導しており、腫瘍内では血管新生が盛んである。しかし、腫瘍組織内には低酸素・低栄養状態に陥っている部位が多く存在している。その理由の一つとして、腫瘍血管が正常血管と比較して未熟な構造をとっていることが挙げられる。組織が低酸素・低栄養状態に陥ると細胞に活性酸素種（Reactive Oxygen Species : ROS）が蓄積する。ROS は酸化ストレスの原因としてよく知られており、細胞死を引き起こすことが広く知られている。一方、細胞の遊走、増殖などに関わるシグナル伝達を活性化し、ROS はがんの悪性化にも深く関与していることが近年報告されている。

Hida らはこれまで腫瘍血管内皮細胞（Tumor Endothelial Cell : TEC）が正常血管内皮細胞（Normal Endothelial Cell : NEC）と比較して、特異遺伝子（TEC マーカー）の発現が亢進していること、高い増殖能、遊走能を示すこと、染色体異常や薬剤抵抗性があることなど、様々な特異性をもつことを明らかにしてきた。また最近、腫瘍内の血管が低酸素に曝されると ROS が蓄積し、血管内皮細胞の染色体異常の原因となりうることを明らかにした。しかし、TEC 特異性の分子機構は未だ不明な点が多く、ROS の関与についても未だ不明な点が多い。

上述のように、ROS はがんの悪性化を引き起こすことから、本研究では、ROS が TEC の特異性獲得に関与しているのではないかと仮説を立て、TEC マーカーのひとつである Biglycan に着目してその関係を検討した。

まず、*in vivo* 腫瘍血管に ROS が蓄積しているかを Dihydroethidium 染色により解析した。正常血管に比べて、腫瘍血管では ROS が蓄積していた。次に、分離培養した NEC, TEC の ROS 蓄積量を解析した。NEC と TEC で ROS の蓄積量に差は認められなかった。これらのことから、*in vivo* 腫瘍血管の ROS 蓄積は微小環境による影響が関与していることが示唆された。

in vitro で ROS が血管内皮細胞（Endothelial Cell: EC）に与える影響を解析するために、NEC, TEC において Pyocyanin（ROS 誘導剤）、DPI（ROS 阻害剤）を用いた。NEC, TEC において、それらの薬剤に対する感受性に違いはなかった。まず、ROS が NEC, TEC の運動能に与える影響について解析した。NEC と TEC のどちらにおいても ROS を誘導すると運動能は亢進し、DPI により、ROS によって誘導される運動能の亢進は抑制された。次に、ROS が EC における血管新生関連遺伝子や TEC マーカーの発現に与える影響を解析した。その中で唯一 Biglycan mRNA 発現量は、NEC では変化が認められなかったのに対し、TEC でのみ約 1.5 倍増加した。Hida らは以前に Biglycan が TEC の高い運動能に関与していることを見出している。しかし、ROS と Biglycan の発現に関する報告は未だないことか

ら、ROS が引き起こす運動能亢進には Biglycan の発現亢進が関与しているのではと考え、ROS と Biglycan の関係に注目して解析を行った。Hida らは Biglycan の受容体として知られている Toll-like receptor 2 (TLR2) , Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して血管内皮細胞においても Biglycan が運動能を亢進させることを報告してきた。そのため、ROS によって誘導される Biglycan の EC の運動能への関与を TLR2, TLR4 の阻害を行って解析した。NEC では ROS で誘導された運動能亢進は TLR2, TLR4 を阻害しても抑制されなかったが、TEC では TLR2, TLR4 の阻害により抑制された。また、TEC の Biglycan をノックダウンすると、ROS を誘導しても運動能亢進はみられなかった。これらのことから、TEC において、ROS が誘導する運動能亢進には Biglycan の発現亢進が関与していることが示唆された。

TLR2, TLR4 の下流シグナルとして ERK1/2, NF- κ B のリン酸化が知られており、それらは細胞の運動に関与していることが知られている。そこで、NF- κ B 阻害剤、ERK1/2 の阻害剤を用いて TEC の運動能に与える影響を解析した。どちらの阻害剤によっても TEC の運動能は抑制された。また、TEC の Biglycan をノックダウンするとリン酸化 NF- κ B, リン酸化 ERK1/2 のレベルは低下した。これらのことから、TEC において、Biglycan が誘導する運動能亢進には TLR2, 4 を介した NF- κ B, ERK1/2 のリン酸化が関与していることが示唆された。

Biglycan の転写には Smad2/3 が関与し、また、Smad2/3 は線維芽細胞において ROS によりリン酸化され、活性化した Smad2/3 は細胞質から核に移行することが知られている。これらのことから、EC においても ROS が Smad2/3 をリン酸化するのかを解析した。Pyocyanin、DPI 処理によって NEC での Smad2/3 の活性化は見られなかったが、TEC では pyocyanin 処理により活性化 Smad2/3 が増加し、DPI 処理により活性化 Smad2/3 が減少した。このことから、TEC において、ROS は Smad2/3 の活性化に関与していることが示唆された。

Smad2/3 の活性化は Nrf2 により抑制されることが知られている。このことから、ROS による NEC と TEC における Smad2/3 リン酸化の有無の違いに Nrf2 が関係しているのかをみるため、まず、Nrf2 量を比較した。NEC では ROS により Nrf2 量が増加したが、TEC では Nrf2 量が減少した。さらに、TEC の Nrf2 をノックダウンすると、Smad2/3 が活性化した。このことから、TEC の ROS による Smad2/3 の活性化には、Nrf2 による負の制御が関与していることが示唆された。

今回、われわれは世界で初めて TEC マーカーの一つである Biglycan の発現が ROS による Smad2/3 の活性化により亢進すること、さらに TEC においては Smad2/3 の亢進には Nrf2 の減少が関与していることを示し、ROS による TEC の血管新生能亢進のメカニズムの一部を見出した。本研究により、腫瘍血管内皮の ROS を

制御することや、それによる Biglycan の阻害は血管新生阻害療法の新たな戦略になることが示唆された。