HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酸化LDL受容体LOX-1シグナルを介した腫瘍血管内皮細胞による好中球遊走促進とがん転移誘導
Author(s)	積田, 卓也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15023号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15023
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89304
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Tsumita.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

酸化 LDL 受容体 LOX-1 シグナルを介した腫瘍血管内皮細胞による好中球遊走促進とがん転移誘導

令和４年３月申請

北海道大学

大学院歯学院口腔医学専攻

積　田　卓　也

目次

要旨 ..... - 3 -

緒言 ..... - 4 -

材料と方法 ..... - 6 -

結果 ..... - 18 -

考察 ..... - 26 -

結論 ..... - 31 -

謝辞 ..... - 32 -

参考文献 ..... - 33 -

図の説明 ..... - 41 -

要旨

先進国の２大死因である「がん」と「循環器疾患」が相互に関連していることが疫学調査を中心に報告されているが、その分子基盤の多くは不明である。両疾患の病変部で共通して豊富に存在することが報告されている分子のひとつに Biglycan がある。Biglycan は低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein: LDL) に対する強い結合能を有するプロテオグリカンの１種であり、アテローム性動脈硬化巣と高転移性腫瘍組織の血管に豊富に存在することが報告されている。血管壁への LDL の蓄積はアテローム性動脈硬化症の発症過程の最重要事項のひとつであるが、その一方でがん悪性化との関連に関する報告はほとんど存在しない。そこで我々は、がんの転移過程における腫瘍組織への LDL 蓄積の重要性を検証することを目的に研究を行った。

まず、免疫組織学的解析を実施したところ高転移性の腫瘍組織には豊富な LDL が含まれていた。加えて、高転移性腫瘍移植マウスでは血中の酸化 LDL が高値を示していたことから、高転移性腫瘍組織で LDL の酸化が亢進していると考えられた。興味深いことに、酸化 LDL の受容体のひとつであり、循環器疾患発症の重要分子として知られている Lectin-like oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) が高転移性の腫瘍血管内皮細胞で高発現していることがわかった。このことは、高転移性腫瘍血管内皮細胞は LOX-1 を介して周囲に豊富に存在する酸化 LDL をがん転移の促進に利用している可能性を示唆していると考えられる。

酸化 LDL 形成における好中球の重要性が知られていたことから、次に高転移性腫瘍組織中の好中球の蓄積と活性化の程度を観察した。すると、高転移性

腫瘍組織において顕著な好中球蓄積と活性化が認められた。そこで、好中球の遊走と活性化における LOX-1 の関与を評価したところ、 LOX-1 の発現は血管内皮細胞からの CCL2 分泌を介して好中球の遊走を促進することが明らかとなった。CCL2 の分泌は酸化 LDL 添加によって増強された。

最後に、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍間質における LOX-1 発現が実際にがんの転移を促進するかどうかを検証するために in vivo での LOX-1 抑制実験を行ったところ、LOX-1 の抑制が肺転移を減少させる傾向があることが示された。

以上の結果から、腫瘍血管内皮細胞における酸化 LDL /LOX-1 シグナルが好中球の誘引を介して高転移性の腫瘍微小環境形成につながっている可能性が示唆された。

緒言

「がん」と「循環器疾患」は現代日本人の 2 大死因であり(1)、その克服は超高齢化社会を迎えた現代社会における喫緊の課題である。近年、がんの既往が循環器疾患発症の強力なリスク因子となる一方で、動脈硬化症のような循環器疾患のリスク因子ががん発症や悪性化につながることが報告されている (2–4)。例えば、乳がんの既往をもつ患者は循環器疾患が原因で死に至る可能性が高くなるということが報告されている (5)。また、膵癌をはじめとする一部のがんでは腫瘍随伴症候群としての血栓症発症のリスクが高いことは良く知られている (6)。その一方で、心不全の既往ががんの発症するリスクに関与するということも報告されている (7)。

近年、欧米を中心に「がん」と「循環器疾患」との関連性を扱う分野として「腫瘍循環器学 (Oncocardiology)」と呼ばれる学際領域が急速に認知され始めている。日本国内においても 2018 年に「日本腫瘍循環器学会」が設立されたところである。「腫瘍循環器学」では現状、臨床医が中心となって「化学療法や放射線治療に伴う副作用としての心血管イベントの発生とその予防／治療法」に主眼を置いた臨床研究や疫学研究がなされている。しかしながら、最近ではその元々の意味を超えて、「がん」と「循環器疾患」で共通する分子病態の存在を念頭においた学問領域としても注目を集め始めている (8)。

循環器疾患の代表的な基礎病態として動脈硬化があるが、その病態形成の重要な仕組みとして「Response-to-retention hypothesis」が提唱されている (9)。この仮説の中では、動脈硬化進展は３つのステップに分けて説明されている。第１のステップとしては、血管壁へのプロテオグリカンの蓄積が挙げられる。中でも、低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein: LDL) との強い結合能力を有するプロテオグリカンの１種である Biglycan の重要性が知られている。第２のステップとして、血管内皮細胞での炎症性変化が生じ、白血球の遊走や接着・血管外への浸潤が生じる。そして第３のステップとして、LDL の酸化が生じ、単球やマクロファージが酸化 LDL を取り込むことで泡沫化し、粥状動脈硬化巣が形成される (10)。

我々はこれまでに、高転移性の腫瘍血管内皮細胞では動脈硬化巣の血管内皮細胞のように Biglycan が高発現しており (11,12)、炎症性変化が生じていることを報告している (13–16)。このことから、理論的には Biglycan を高発現している高転移性腫瘍組織において LDL の蓄積が生じており、炎症性微小環境を

形成している可能性が考えられる。ところで、動脈硬化とがんの両疾患において、好中球の重要性が注目され始めている。腫瘍組織に浸潤した好中球は腫瘍浸潤好中球 (Tumor associated neutrophils: TANs) と呼ばれ、様々な種類のがんにおいて予後不良因子となっていることが知られている（17)。腫瘍関連好中球の機能としては様々なことが報告されているが、その機能のひとつとして好中球が自身の DNA を細胞外に放出する現象である好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) の形成が注目されている (18–21)。血管内皮細胞の形質変化が NETs 形成には重要な役割を担っていることが報告され始めているが、そのメカニズムの詳細は不明な点が多い (22)。

我々の研究では、Biglycan を豊富に含む高転移性腫瘍組織には LDL の蓄積が生じていた。LDL は酸化されて酸化 LDL を形成した後、腫瘍組織中で利用されると考えられるが、高転移性腫瘍血管内皮細胞では酸化 LDL 受容体のひとつである Lectin-like oxidized-LDL receptor 1 (LOX-1) が高発現していた。LOX-1 は動脈硬化をはじめとする様々な循環器疾患の重要なリスク因子であることが知られているが、腫瘍微小環境におけるその発現や役割はほとんど明らかとなっていない。そこで、本研究では、腫瘍血管における LOX-1 の発現ががんの転移に及ぼす影響について、特に好中球との相互作用を念頭に解析を行った。

材料と方法

1) 細胞培養

ヒト悪性黒色腫由来細胞株 A375 細胞 (低転移性腫瘍) は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。A375SM 細胞 (高転

移性腫瘍) は Fidler 博士 (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA)より供与頂いた。A375SM は A375 細胞を皮下移植後に肺転移したがん細胞を選抜することで樹立された高い転移能を有する細胞である (23)。A375 ならびに A375SM 細胞は熱処理により非動化された牛胎児血清 (FBS; Gibco, NY, USA) を終濃度 10%で添加した Minimum Essential Medium (GIBCO, NY, USA) で培養した。RAW264.7 細胞は DS ファーマバイオメディカル (Osaka, Japan) より購入した。RAW264.7 細胞は熱処理により非動化された牛胎児血清を終濃度 10%で添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で培養した。ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Human dermis microvascular endothelial cell: HMVEC) は Lonza (Basel, Switzerland) から購入し、SV40 large T 抗原と hTERT をレンチウイルスにより導入することで不死化した (Immortalized human microvascular endothelial cells: iHMVECs) (24)。iHMVEC 細胞は EGM-2MV (Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2; Lonza, Basel, Switzerland) で培養した。実験に使用した全ての細胞は 37℃、5%CO_2大気下にて培養した。また、実験に用いた細胞がマイコプラズマに感染していないことは Mycoplasma detection kit (MycoAlert, Lonza, Basel, Switzerland) を用いて確認した。

2) マウス

腫瘍移植実験には 6 週齢の雌ヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu, Clea, Japan) を使用した。マウスは Specific pathogen free (SPF) 条件下で飼育された。

3) マウス血管内皮細胞の分離

マウス皮膚正常血管内皮細胞ならびに腫瘍血管内皮細胞は以前の研究で単離されたものを使用した (25,26)。要約すると、約 10 匹のがん細胞皮下移植ヌードマウスから採取したがん組織もしくはがん細胞を移植していない通常のヌードマウスから皮膚を採取してハサミで細断した後、Collagenase Ⅱ (Gibco, Thermo Fisher scientific, USA) ならびに DNase Ⅰ (Roche, スイス) で処理し、混入した赤血球は Lysis buffer (BD Pharm Lyse, USA) で破壊した。用意した細胞懸濁液は磁気細胞分離法 (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) により CD31 ビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を用いて CD31 陽性細胞を分離した。単離した細胞は 15%牛胎児血清を含む EGM-2 MV (Lonza, Basel, Switzerland) 培地で培養した。その後、ヒト細胞を特異的に殺すジフテリア毒素 (500 ng/mL, Calbiochem, San Diego, CA, USA) を利用し、がん細胞の混入の可能性を否定した。これは、ジフテリアトキシン受容体である Heparin-binding EGF-like growth factor がヒト細胞にのみ発現しているという性質を使用した手法である (27)。このようにして分離した血管内皮細胞を継代培養したのち、再度 MACS を用いて BS1-B4 レクチン陽性細胞を分離することで血管内皮細胞の純度を上げた。得られた細胞集団については、フローサイトメトリーにより血管内皮細胞としての純度が高いことを確認している。本実験には継代数 18 – 30 程度の細胞を用いており、分離後も血管内皮細胞の特性を維持していることを確認した後に解析に使用した。

4) マウス好中球の分離

マウス好中球は過去に報告されている方法に従い (28,29)、Percoll (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いた密度勾配法により大腿骨骨髄細胞より単離した。単離した好中球は Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 培地に回収し、実験に使用した。

5) RNA 抽出、逆転写反応、ならびに PCR／定量 PCR

腫瘍組織に関しては、腫瘍組織の凍結切片をメスの刃でスライドガラスから剥がし、TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) に回収した後、RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Limburg, Nederland) を用いて RNA を抽出した。培養細胞に関しては、ReliaPrep™ RNA Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて抽出した。抽出した total RNA からの cDNA 合成には ReverTraAce (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。PCR 法に関しては、GoTaq® Master Mixes (Promega, Madison, WI, USA) を使用して合成した cDNA を鋳型に対象となる塩基配列を増幅した後、MidoriGreen (Toyobo, Osaka, Japan) を添加したアガロースゲルにて電気泳動を実施し、増幅産物を検出した。定量 PCR 法に関しては、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を使用し、delta-delta-Ct 法により定量解析を実施した。内部標準には 18S rRNA、GAPDH、もしくは Hprt1 を使用した。使用したプライマー配列の一覧は下記のとおりである。

1. mouse Bgn (5’ – AACTCACTGCCCCACCACAGCTTC – 3’ and 5’ – GCGGTGGCAGTGTGCTCTATCCATC – 3’)
2. mouse LOX-1 (5’ – TGGACACAATTACGCCAGGT – 3’ and 5’ – TCTGCCCTTCCAGGATACGA – 3’)
3. mouse Msr1 (5’ – AGTTGTCTGCCGGAGTCTAGGA – 3’ and 5’ – ACAAGTGACCCCAGCATCTTCT – 3’)

4. mouse Cd36 (5’ – GCTCCTTGGCATGGTAGAGATGG – 3’ and 5’ – CGGCTTTACCAAAGATGTAGCCAGT – 3’)
5. mouse Il-8 (5’ – CTTGGAGCCAAGGCAAGAACAC – 3’ and 5’ – AAATGGAGAGGCATCCGGTTCA – 3’)
6. mouse Cxcl5 (5’ – GTGCCCTACGGTGGAAGTCATAG – 3’ and 5’ – TTAGCTTTCTTTTTGTCACTGCCCA – 3’)
7. mouse Ccl2 (5’ – CCCACTCACCTGCTGCTACT – 3’ and 5’ – GGGTCAGCACAGACCTCTCTC – 3’)
8. mouse Il-6 (5’ – CTGATGCTGGTGACAACCAC – 3’ and 5’ – TCCACGATTTCCCAGAGAAC – 3’)
9. mouse Ccr2 (5’ – CCTGCAAAGACCAGAAGAGGGCA – 3’ and 5’ – GGTGTGGTGGCCCCTTCATCA – 3’)
10. mouse Hprt1 (5’ – TGGGCTTACCTCACTGCTTTCC – 3’ and 5’ – ATCATCGCTAATCACGACGCTG – 3’)
11. mouse Gapdh (5’ – GGGTGGTGGACCTCATGGCCTACAT – 3’ and 5’ – CGAGTTGGGATAGGGCCTCTCTTGC – 3’)
12. mouse 18S (5’ – CGAAAGCATTTGCCAAGAAT – 3’ and 5’ – AGTCGGCATCGTTTATGGTC – 3’)
13. human LOX-1 (5’ – TTGCCTGGGATTAGTAGTGACC – 3’ and 5’ – GCTTGCTCTTGTGTTAGGAGGT – 3’)
14. human CCL2 (5’ – GAATCACCAGCAGCAAGTGTCC – 3’ and 5’ – TTTGGGTTTGCTTGTCCAGGTG – 3’)
15. human CCR2 (5’ – TGCAAAAAGCTGAAGTGCTTG – 3’ and 5’ – CAGCAGAGTGAGCCCACAAT – 3’)
16. human GAPDH (5’ – ACAGTCAGCCGCATCTTCTT – 3’ and 5’ – GCCCAATACGACCAAATCC – 3’)

6) レンチウイルスの作製と細胞への導入

ルシフェラーゼ遺伝子安定発現ベクターについては、まず Y. Ohmiya 博士 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) より分与頂いた Rluc 遺伝子の

cDNA を PCR 法により増幅し、pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Waltham, MA, USA) にクローニングした。その後、XhoI と NotI 制限酵素サイトを用いて pCAGGS-Venus48 にサブクローニングした。次に、Venus と Rluc をコードする配列を有する DNA 断片を EcoRI と NotI 制限酵素サイトを用いて H. Miyoshi 博士 (理化学研究所) より分与頂いた pCS II-CMV-MCS にサブクローニングした。tdTomato 発現ベクターについては、ptdTomato-C1 (Takara, Shiga, Japan) を AgeI と EcoRI で処理した後、AgeI-EcoRI 制限酵素サイトを用いて pCSII-CMV-MCS にサブクローニングした。LOX-1 (OLR1) 遺伝子発現ベクターに関しては、pENTR221-homo OLR1 ORF (Clone ID: 100009045) を DNAFORM (Kanagawa, Japan) より購入し、OLR1 の ORF 配列を In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara, Shiga, Japan) を用いて CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd の Xho-EcoRI 制限酵素サイトにサブクローニングした。LOX-1 発現抑制用の shRNA ベクターに関しては、Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) より下記２つのレンチウイルス用 shLOX-1 ベクター (TRCN0000416760 および TRCN0000413308) を購入した。また、コントロールとしては非哺乳類 shRNA コントロールベクター (SHC002) を使用した。

上記で準備したベクターを用い、レンチウイルスのパッケージング用ベクターである pCAG-HIVgp ならびに pCMV-VSV-G-RSV-REV (いずれも H. Miyoshi 博士より分与） を HEK293T 細胞に FuGene HD (Promega, Madison, WI, USA) もしくは Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を用いてトランスフェクションした。2 日もしくは 3 日間程度培養した後に培

養上清を回収し、Lenti-X™ レンチウイルス濃縮試薬 (Takara, Shiga, JapanTAKARA) を用いて濃縮した後、ポリブレン (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を最終濃度 10 μg/mL 添加した培地を用いて目的の細胞に遺伝子導入を行った。トランスダクション実施後 24 時間程度経過した後、FACS または抗生物質による遺伝子導入細胞のセレクションを実施した。

7) 腫瘍移植実験

がん細胞単独の移植実験の場合、ルシフェラーゼ遺伝子導入済み A375 または A375SM (各 1×10^6) をマウス右側腹部皮下に移植した。血管内皮細胞との共移植の場合、ルシフェラーゼ遺伝子導入済み A375 (1×10^6) と血管内皮細胞 (2×10^4) を混合したものを同様にマウス右側腹部皮下に移植した。約 4 週間後、ルシフェリンを腹腔内投与後、イソフルランによる麻酔下にて開胸し、心臓より採血を行った。加えて、肺を摘出した後、IVIS Spectrum (Caliper Life Science, Waltham, MA, USA) を用いて肺全体におけるがん細胞由来の発光シグナルを検出した。最後に、腫瘍組織を摘出して半割した後、凍結組織切片作製用包埋剤 O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で埋入し液体窒素にて迅速凍結させ、凍結切片作製用の凍結ブロックを作製した。

8) 免疫組織学的解析

マウス腫瘍組織の凍結サンプルはクリオスタット (Leica CM3050S, Leica Biosystems, Wetxlar, Germany) を用いて厚さ 10 μm の切片を作製した後、氷冷メタノールによる固定後、5% BSA もしくは 5 % ヤギ血清を用いたブロッキングを行った。使用した 1 次抗体は次のとおりである。Biglycan の

染色には抗 Biglycan 抗体 (1:200, Kerafast, LF-159, Boston, MA, USA) を用いた。ApoB の染色には抗 Apolipoprotein B 抗体 (1:200, Abcam, ab20737, Cambridge, UK) を用いた。LOX-1 の染色には抗 LOX-1 抗体 (1:200, Abcam, ab60178, Cambridge, UK) を用いた。MPO の染色には抗 Myeloperoxidase 抗体 (1:50, Abcam, ab9535, Cambridge, UK) を用いた。CitH3 の染色には抗 Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) 抗体 (1:1000, Abcam, ab5103, Cambridge, UK) を用いた。上記 1 次抗体に対して、２次抗体としては Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:500, Invitrogen, 21244, Waltham, MA, USA) もしくは Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:500, Invitrogen, A-11008, Waltham, MA, USA) を用いた。CD31 の染色には APC 標識抗 CD31 抗体 (1:500, Biolegend, 102409, San Diego, CA, USA) もしくは FITC 標識抗 CD31 抗体 (1:500, Biolegend, 102405, San Diego, CA, USA) を用いた。CD11b の染色には APC 標識抗 CD11b 抗体 (1:500, Biolegend, 101212, San Diego, CA, USA) を用いた。Gr-1 の染色には FITC 標識抗 Gr-1 抗体 (1:500, Biolegend, 108408, San Diego, CA, USA) を用いた。核染色には 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; DOJINDO, Kumamoto, Japan) を用いた。画像取得は BZ-X810 (Keyence Corporation, Itasca, IL, USA) により実施し、取得した画像については BZ-X800 Analyzer software (Keyence Corporation, Itasca, IL, USA) を用いて全腫瘍組織領域中のターゲットシグナル領域を定量解析した。

ヒト悪性黒色腫組織については、ホルマリン固定組織のパラフィン包埋ブロックから厚さ 4 μm で連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン

染色、ならびに 3,3′ -Diaminobenzidine (Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako, Tokyo, Japan) による免疫組織学的染色 (S100, CD31, LOX-1) を実施した。S-100 の染色には抗 S-100 抗体 (1:1000, Dako, Z0311, Tokyo, Japan) を用いた。使用した 1 次抗体は次のとおりである。CD31 の染色には抗 CD31 抗体 (1:200, Abcam, ab28364, Cambridge, UK) を用いた。LOX-1 の染色には抗 LOX-1 抗体 (1:500, Proteintech, 11837-1-AP, Rosemont, IL, USA) を用いた。上記 1 次抗体に対して、２次抗体としては HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:100, Dako, P0448, Tokyo, Japan)。なお、核染色には Mayer Hematoxlin (Wako, Osaka, Japan) を用いた。染色画像は Nanozoomer slide scanner (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) でデジタル画像として取得した。

9) ELISA

マウス血漿中の可溶型 LOX-1 濃度は ELISA Kit for Lectin Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1 (LOX1) (Cloud-Clone, #SEB859Mu, Wuhan, China) を用いて測定した。血漿中の酸化 LDL 濃度は Mouse Oxidized Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) ELISA Kit (MyBioSource, #MBS263208, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

10) 細胞免疫染色

カバーガラスを入れた 12 well plate 上で培養した LOX-1 過剰発現 iHMVEC 細胞を氷冷した 100%メタノールで固定した後、5%BSA 含有 PBS でブロッキング後、抗 LOX-1 抗体 (1:500, Proteintech, 11837-1-AP, Rosemont, IL, USA) で処理した。その後、2 次抗体として Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:500, Invitrogen, 21244, Waltham, MA, USA) で処理した

後、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; DOJINDO, Kumamoto, Japan) で核染色を実施した。画像取得には BZ-X810 (Keyence Corporation, Itasca, IL, USA) を用いた。

11) 細胞遊走アッセイ

好中球の血管内皮細胞への遊走能の評価には、従来法 (30,31) に従い Transwell chambers (Corning, Corning, NY, USA) を使用した。具体的には、マウス由来もしくはヒト由来血管内皮細胞をチャンバーの下層に播種してから 6 時間程度通常の培地中で培養した後、無血清培地に置換してから更に 24 時間培養した。その後、マウス骨髄より採取した好中球 (3×10^5) をチャンバーの上層に添加し、4 時間後に下層の培地を回収し、TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて下層に遊走した好中球数を測定した。がん細胞についても同様に Transwell chambers (Corning, Corning, NY, USA) を使用し、下層に血管内皮細胞を準備した後、上層に A375 (3×10^5) を添加して 4 時間後、上層のチャンバーのメンブレンの裏側に移動したがん細胞の数を計測した。この際、予め 100 nM の CCR2 Antagonist (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で処理したがん細胞と未処理のがん細胞をそれぞれ用意して実験に用いた。メンブレンの表側を綿棒でよく拭った後、メタノールで固定し、Mayer's hematoxylin (Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) でがん細胞の染色を行った。その後、BZ-X810 顕微鏡で画像を取得した後、BZ-X800 Analyzer software (Keyence Corporation, Itasca, IL, USA) にて遊走したがん細胞数の計測を行った。

12) LOX-1 発現抑制用アデノ随伴ウイルスの作製

LOX-1 に対する shRNA を発現するアデノ随伴ウイルスの作製のため、下記に記したオリゴヌクレオチドをユーロフィンジェノミクス (Tokyo, Japan) に委託して人工合成したものをアニーリングした後、pAAV-U6-ZsGreen1 vector (Takara, Shiga, Japan) の Spe1-Xba1 制限酵素サイトにクローニングし、AAVpro® Helper Free System (AAV2) (Takara, Shiga, Japan) を使用してアデノ随伴ウイルスの作製を行った。shLOX-1 発現ベクターの作製にはセンス鎖として 5’ – GAGAAAAGCCTCTAGGCCAGAAGCTGAACGAGAAATCCTCGAGGATTTCTCGTTCAGCTTCTGGTTTTTTTCTAGTGATATCGATA – 3’、アンチセンス鎖として 5’ – TATCGATATCACTAGAAAAAAACCAGAAGCTGAACGAGAAATCCTCGAGGATTTCTCGTTCAGCTTCTGGCCTAGAGGCTTTTCTC – 3’を使用した。コントロールベクターの作製にはセンス鎖として 5’ – GAGAAAAGCCTCTAGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTTTTCTAGTGATATCGATA – 3’、アンチセンス鎖として 5’ – TATCGATATCACTAGAAAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGCCTAGAGGCTTTTCTC – 3’を使用した。

13) データベースを用いた解析

健常者、ヒト悪性黒色腫、膵癌、ならびに頭頸部癌における遺伝子発現データと臨床病理学的情報は、The Genotype-Tissue Expression (GTEx) ならびに The Cancer Genome Atlas (TCGA) より入手した。データの取得には UCSC Xena (https://xena.ucsc.edu/) (32) を用いた。生存時間分析の際の各腫

瘍組織における LOX-1 遺伝子発現の高低を決めるカットオフ値に関しては、正常組織における LOX-1 の遺伝子発現と腫瘍組織における LOX-1 の遺伝子発現を統計学的に最も有意に区別することができる値を ROC 解析により決定した。

14) 統計解析

得られた定量データは平均 ± 標準偏差または平均 ± 標準誤差で表記した。グラフの作製ならびに統計解析には GraphPad Prism 9 (San Diego, CA, USA) を使用した。3 群以上の比較の際には、一元配置分散分析を実施した後、Tukey 法による検定を行った。2 群間の比較には、two-sided Student's t-test を用いた。2 因子の相関解析には JMP PRO 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、前者ではピアソンの積率相関係数を算出した。生存時間解析にも JMP PRO 14 を使用し、Log-rank test により 2 群間の統計解析を行った。

15) 研究の実施に関する承認事項

腫瘍組織サンプルの研究への利用に関しては、悪性黒色腫患者から同意書を得ている。本研究は北海道大学自主臨床研究審査委員会の承認を受けている (学内承認番号: 012-0446、自：015-042)。また、動物実験に関する全ての手順は、全ての動物実験において、動物の愛護および管理に関する法律、ならびに実験動物の飼育および保管等に関する基準に従い、実験者や環境等に対する安全対策に加えて実験動物への苦痛を最小限にとどめる処置を講じる。特に、代替 (Replacement)、削減 (Reduction)、改善 (Refinement)、いわゆる 3R の原理に、さらに責任 (Responsibility) を加え

た 4R の原理に基づき、動物実験の重さを生命倫理の文脈で捉えた上での研究を実施する。研究は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に基づいて実施された (学内承認番号：18-0050)。

結果

低転移腫瘍と高転移腫瘍における LDL の蓄積と酸化 LDL 形成の比較

我々は異なる転移能を持ち、同一のヒト腫瘍に由来する 2 種類のメラノーマ細胞株である A375 と A375SM のヌードマウスへの皮下移植モデルを実験に使用した。前者はほとんど転移を生じないが、後者は高頻度に肺転移を引き起こす (23)。まず、LDL に対する強い結合能を有する Biglycan (33,34) の低転移性／高転移性の各腫瘍組織における発現量を定量 PCR 法で評価した。これまでの我々の報告と同様に (11)、高転移性腫瘍組織における Biglycan の遺伝子発現量は低転移性腫瘍組織と比較して約 10 倍高値を示していた (Figure 1A)。加えて、免疫組織学的解析により腫瘍間質における Biglycan の発現量を評価したところ、低転移性腫瘍組織では Biglycan のシグナルがほとんど検出されなかったのに対し、高転移性腫瘍組織では強いシグナルが認められた (Figure 1, B and C)。Biglycan は LDL との強い結合能を有することから、次に我々は各腫瘍組織における LDL の蓄積を免疫組織学的解析により評価した。Apolipoprotein B (ApoB) は LDL の主要な構成成分のひとつであり、LDL マーカーとして使用することができる。解析の結果、ApoB 陽性領域は低転移性腫瘍組織と比べて高転移性腫瘍組織で高値を示していた (Figure 1, D and E)。一般的に、LDL が局

所に蓄積すると、酸化されることが知られている。そこで次に、非担癌マウスと低転移性／高転移性腫瘍の各担癌マウスの血液中の酸化 LDL 濃度を ELISA 法により評価した。血漿中の酸化 LDL 濃度は高転移性腫瘍移植マウスのものが、非担癌マウスや低転移性腫瘍移植マウスと比べて高値を示していた (Figure 1F)。

酸化 LDL 受容体 LOX-1 は高転移性腫瘍血管内皮細胞で高発現している

次に我々は、各マウス腫瘍組織における主要な酸化 LDL 受容体の発現量を解析した。代表的な酸化 LDL 受容体としては、LOX-1 や Macrophage scavenger receptor 1 (Msr1)、Cd36 などが知られている。LOX-1 や Msr1 の遺伝子発現量は高転移性腫瘍組織において高値を示していた一方で、CD36 の発現量には各グループ間で有意な差は認められなかった (Figure 2A)。次に、マウスとヒトでの共通性を確認するため、GTEx-the Cancer Genome Atlas (TCGA) データベース内の RNA シークエンスデータを用いてヒトメラノーマ患者の腫瘍組織と健常者の皮膚組織におけるこれら酸化 LDL 受容体遺伝子群の発現量を評価した。マウスモデルのデータを支持するように、ヒト腫瘍組織においても LOX-1 と Msr1 の発現は亢進しており、逆に CD36 は発現が抑制されていることが明らかとなった (Figure 2B)。さらに、腫瘍組織から単離してきた血管内皮細胞における LOX-1 や Msr1 の発現を解析したところ、高転移性腫瘍血管内皮細胞においてのみ LOX-1 の遺伝子発現が認められ、Msr1 については血管内皮細胞での発現は認められなかった (Figure 2C)。LOX-1 の発現量は正常血管内皮細胞や低転移性腫瘍血管内皮細胞と比べて高転移性腫瘍血管内皮細胞において顕著に亢進

していた (Figure 2D and 2E)。加えて、免疫組織学的解析により LOX-1 の腫瘍組織における発現パターンを評価したところ、LOX-1 のシグナルは高転移性腫瘍組織内部の血管内皮細胞ならびにその周囲に強く認められ、低転移性腫瘍組織では弱いシグナルが血管内皮細胞で認められた (Figure 2F)。

LOX-1 は ADAM10 のようなプロテアーゼにより細胞外ドメインが切断され、可溶型 LOX-1 を形成することが知られており、血中の可溶型 LOX-1 は LOX-index という名称で循環器疾患発症リスク評価のためのバイオマーカーとして実際に臨床の現場で使用され始めている (35)。非担癌マウスと比較して、高転移性腫瘍移植群の血漿中の可溶型 LOX-1 濃度は有意に高値を示していたが、低転移性腫瘍移植群では有意な差は認められなかった (Figure 2G)。また、血中の可溶型 LOX-1 濃度と酸化 LDL 濃度を掛けた値として算出される LOX-index 値に関しては、高転移性腫瘍移植群で非担癌マウスや低転移性腫瘍移植群と比較して有意に高値を示していた (Figure 2H)。

最後に、ヒトメラノーマ組織における LOX-1 の発現を免疫組織学的解析により評価した。LOX-1 のシグナルはヒトメラノーマ組織内部においてはがん細胞においても認められていたものの、腫瘍血管内皮細胞でも検出されており、マウスとヒトで腫瘍血管内皮細胞での LOX-1 の発現は共通して認められた (Figure 2I)。

がん転移における LOX-1 の重要性

がんの転移における LOX-1 の重要性を検証するため、肺転移の程度と LOX-1 関連諸因子との相関を解析した。in vivo イメージングにより肺転移を定量的

に評価できる実験系を構築するために，A375 と A375SM の各がん細胞にルシフェラーゼを安定的に発現するベクターを導入し、ルシフェリンを用いて化学発光する細胞を作成した。高転移性腫瘍移植マウスの肺においては予想通り強い発光強度が得られたのに対し、低転移性腫瘍移植マウス肺では発光シグナルはほとんど検出されなかった (Figure 3A)。発光強度を定量評価すると、２群間には発光強度の明確な相違が認められ、２種類のがん細胞株が異なる肺転移能力を有することが改めて確認された (Figure 3B)。次に、肺における発光強度と、① 腫瘍組織における LOX-1 の遺伝子発現量、② 血中の可溶型 LOX-1 濃度、③ 血中の酸化 LDL 濃度、④ LOX-index との間の各相関関係をピアソンの相関係数を算出することで評価した。すると、これら 4 因子はいずれも肺転移の程度を示す発光強度と強い正の相関を示していたが、なかでも酸化 LDL 濃度が転移能力と特に強い正の相関を示していた (Figure 3C)。

次に、様々な種類のがんにおいて、正常組織と腫瘍組織における LOX-1 の発現量を GTEx-TCGA データベースから得られた遺伝子発現データを用いて解析した。メラノーマや膵癌、頭頸部癌では各正常組織と比較して LOX-1 遺伝子発現量の亢進が認められた (Figure 3D)。加えて、メラノーマにおいては、LOX-1 の発現は原発巣よりも転移巣においても有意に高値を示していた (Figure 3D)。我々は次に、腫瘍組織における LOX-1 の発現量と臨床的な予後との関連性について、TCGA データベースを用いた解析を行った。膵癌や頭頸部癌では全生存期間（Overall survival: OS）や 無増悪生存率（Progression-free interval: PFI）に関して LOX-1 高値群で予後不良傾向にあったが、メラノーマに関しては LOX-1 の発現量と予後との関連性は認められなかった (Figure 3E).

腫瘍組織における好中球の浸潤と活性化

アテローム性動脈硬化巣における LDL の酸化は好中球が放出するミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase: MPO） のような強力な酸化酵素によって触媒されることが知られている (10,36)。そこで我々は、高転移性腫瘍移植マウスにおいて高いレベルで検出された血中酸化 LDL に腫瘍組織への好中球の浸潤が関与しているのではないかと推測した。好中球マーカーとして腫瘍組織における MPO の染色を実施したところ、高転移性腫瘍組織において、低転移性腫瘍組織よりも MPO シグナルが多量に認められた (Figure 4A)。腫瘍組織全体に占める MPO シグナル陽性領域の割合を定量評価したところ、高転移性腫瘍組織で有意に高値を示していた (Figure 4B)。更に、別の好中球を含む骨髄系細胞のマーカーとして汎用される細胞表面マーカーCD11b と Gr-1 の二重染色を実施したところ、CD11b/Gr-1 二重陽性領域は高転移性腫瘍において有意に高値を示していた (Figure 4, C and D)。我々はさらに、NETs 形成を伴う好中球の活性化状態を評価するため、NETs 形成の指標として用いられているシトルリン化ヒストン H３（Citrullinated histone H3: CitH3）の染色を実施した。Gr-1/CitH3 二重陽性領域の面積は高転移性腫瘍において有意に高値を示しており、Gr-1 陽性領域に占める CitH3 陽性領域の割合に関しても高転移性腫瘍において有意に高値となっていた (Figure 4, E, F, and G)。

腫瘍組織における好中球遊走因子

次に、高転移性腫瘍組織における好中球多量浸潤の原因について考察するため、好中球に対する遊走因子の発現量を評価した。IL-8 や CXCL5 は最も強力

な好中球遊走因子の一つとして知られている (37,38)。また、CCL2 や IL-6 も好中球の遊走や活性化を促す因子の一つであることが報告されている。まず、マウス腫瘍組織における Cxcl5 や Ccl2、Il-6、Il-8 の遺伝子発現を評価したところ、Il-8 については有意な差は認められなかったものの、それ以外の 3 種類の遺伝子に関しては高転移性腫瘍移植群で有意に高値を示していた (Figure 5A)。また、マウス腫瘍組織における LOX-1 の遺伝子発現量と有意差の認められた 3 遺伝子の発現量の相関をピアソンの積率相関係数により評価したところ、いずれの因子も LOX-1 発現量と強い正の相関を示した (Figure 5B)。さらに、TCGA データベースを用いてヒトメラノーマにおいても同様の検証を行ったところ、CCL2 が LOX-1 発現と最も強い正の相関を示し、IL-6 や CXCL5 は LOX-1 と相関していなかった ($r = 0.447$, $p < 0.0001$) (Figure 5C)。

血管内皮細胞における LOX-1 の発現は血管内皮細胞に対する好中球やがん細胞の遊走に関与する

In vitro の実験により血管内皮細胞と好中球やがん細胞との相互作用における LOX-1 の機能についてより詳細な解析を行うため、LOX-1 を過剰発現させた血管内皮細胞を作製した (Figure 6, A and B)。LOX-1 を過剰発現させた血管内皮細胞において、コントロールの血管内皮細胞と比べて CCL2 遺伝子発現量の有意な亢進が認められ、この作用は酸化 LDL 処理によって増強された (Figure 6C)。また、逆に LOX-1 の機能喪失による影響を評価するため、もともと LOX-1 の発現量が高い高転移性腫瘍血管内皮において shRNA を用いて LOX-1

の発現を抑制した高転移性血管内皮細胞を作製した (Figure 6D)。LOX-1 の発現抑制に伴って CCl2 の遺伝子発現も低下した (Figure 6E)。

次に、作製した LOX-1 過剰発現血管内皮細胞または LOX-1 発現抑制腫瘍血管内皮細胞を用いて、好中球の遊走能への影響を評価した。遊走能の評価には Boyden chamber を用い、チャンバーの上層から下層に移動した好中球の数を計測した (Figure 6F)。まず、CCL2 の受容体である CCR2 の好中球における発現に関して PCR 法により評価したところ、CCR2 の発現が認められた (Figure 6G)。好中球の遊走に関しては、コントロール内皮細胞と比べて LOX-1 過剰発現血管内皮細胞に対する遊走数の方が有意に高値を示していた (Figure 6H)。その一方で、LOX-1 の発現を抑制した高転移性腫瘍血管内皮細胞に対する遊走数はコントロール細胞と比べて減弱した (Figure 6I)。

CCR2 はがん細胞にも発現していたことから (Figure 6J)、がん細胞の血管内皮細胞への遊走能についても同様に評価した (Figure 6K)。LOX-1 過剰発現は血管内皮細胞へのがん細胞の遊走を促し、この効果は CCR2 アンタゴニストによってキャンセルされた (Figure 6L)。このことから、CCL2 の血管内皮細胞からの分泌ががん細胞の遊走にも重要であることが示唆された。

腫瘍血管内皮細胞もしくは腫瘍間質における LOX-1 抑制はがんの転移を抑制する

がんの転移における腫瘍血管内皮細胞由来 LOX-1 の重要性を評価するため、shRNA を用いて LOX-1 の発現を抑制した高転移性腫瘍血管内皮細胞と低転移性のがん細胞をそれぞれ 2%と 98%の割合で混合し、マウス皮下に共移植した

(Figure 7A)。過去の研究で、がん細胞と腫瘍血管内皮細胞を共移植するとがんの転移が促進されることが報告されている（11)。LOX-1 の発現を抑制した腫瘍血管内皮細胞とがん細胞との共移植は腫瘍体積には影響を及ぼさなかったが (Figure 7B)、肺転移の頻度に減弱傾向が認められた (Figure 7C)。加えて、LOX-1 発現抑制腫瘍血管内皮細胞との共移植では、統計学的な有意差は認められなかったものの腫瘍組織に浸潤した好中球の数が減弱した傾向が認められた (Figure 7, D and E)。

さらに、腫瘍間質の LOX-1 阻害によるがん転移への影響をより直接的に評価するため、LOX-1 発現抑制 shRNA を発現するアデノ随伴ウイルスを作製し、腫瘍内投与を行った。腫瘍が触知できる大きさになった後、アデノ随伴ウイルスを合計 3 回反復投与した結果、腫瘍体積には影響を及ぼさなかったものの、コントロールと比べて腫瘍の色調に関して赤みが減弱しており、血管新生が抑制されたことが示唆される (Figure 7, F and G)。なお、shRNA による LOX-1 の発現抑制効果は腫瘍組織における LOX-1 の免疫組織学的解析および血中可溶型 LOX-1 の ELISA による定量評価で確認した (Figure 7, H and I)。がんの肺転移に関して、肺全体におけるがん細胞由来の発光シグナル強度を用いて評価したところ、LOX-1 発現抑制により転移が減弱する傾向が認められた。加えて、血中の可溶型 LOX-1 濃度と肺転移の程度には強い正の相関が認められた ($r = 0.665$, $p = 0.0361$) (Figure 7, J and K)。以上の結果から、LOX-1 ががんの転移に対して促進的に働くことが示唆された。

考察

本研究により，我々は Biglycan を高発現している高転移性腫瘍組織には LDL が豊富に存在しており、LDL 酸化が亢進していることを示した。加えて、高転移性腫瘍血管内皮細胞では酸化 LDL 受容体である LOX-1 が高発現していることを示した。本研究結果から、腫瘍血管内皮細胞における酸化 LDL／LOX-1 軸の活性化が CCL2 分泌を介した好中球の遊走を促し、がん転移促進性の腫瘍微小環境形成に繋がる可能性が考えられる (Figure 8)。

LDL は動脈硬化のような循環器疾患発症の主要なリスク因子として古くから知られており、ここ数十年間、スタチンのような高脂血症治療薬がその予防／治療のために使用されてきた。血管壁の細胞外マトリックスに存在するプロテオグリカンが LDL を保持することが動脈硬化形成の起点となることが知られており、これは「Response-to-retention hypothesis」として知られている (9)。Biglycan は LDL に対する強力な結合能力を有するプロテオグリカンであり (33,39)、血管壁における Biglycan の高発現は循環器疾患の病態生理に深く関与している。

一方，癌に関しては，我々はこれまで腫瘍血管内皮細胞が Biglycan を高発現し血管新生能を促進すること (12)、さらに Biglycan が癌細胞の遊走を刺激しがんの転移を誘導することを過去に報告している（11)。しかし、腫瘍微小環境中の LDL と Biglycan との相互作用がもたらすがんの性質に対する影響については全く報告がない。本研究では Biglycan を高発現している高転移性の腫瘍組織において LDL が豊富に存在することが観察されたことから、腫瘍血管内皮

細胞が分泌する Biglycan と腫瘍微小環境中 LDL との相互作用ががんの転移に関わっていることが想定される。

血管内皮細胞が発現する代表的な酸化 LDL 受容体のひとつに LOX-1 がある (40)。LOX-1 は一回膜貫通型タンパク質であり、酸化 LDL をはじめとする様々な分子との結合能を有するスカベンジャー受容体として知られている。その細胞外ドメインが ADAM-17 のようなプロテアーゼによって切断され、血中で検出できる可溶型 LOX-1 を生成する (41)。LOX-1 は正常な血管内皮細胞ではほとんど発現が認められないが、動脈硬化のような病的な状態になると発現が亢進する。心血管イベントの病態生理における LOX-1 の重要性はよく研究されており、可溶型 LOX-1 は心筋梗塞や脳梗塞のバイオマーカーとして既に臨床で使用され始めている (35,42,43)。近年がん研究領域でも LOX-1 の重要性は徐々に注目を集め始めている。例えば、がん細胞における LOX-1 の阻害ががんの増殖を抑制することが報告されており (44)、LOX-1 発現とがん悪性化との関連に関しても報告され始めている (45–49)。しかしながら、腫瘍血管における LOX-1 の発現や機能に関して注目した研究は全くなされておらず、がん病態における LOX-1 の発現の重要性についても未だ不明な点が多い。我々のマウスを用いた研究では、酸化 LDL や LOX-1 のレベルと肺転移との間に明確な正の相関が認められている。したがって、血中の可溶型 LOX-1 や酸化 LDL はがん転移マーカーとして活用できる可能性があるといえる。更に、腫瘍血管もしくは腫瘍間質における LOX-1 の発現抑制は肺転移を抑制する傾向が認められた。このことから、LOX-1 は有望な創薬標的分子となり得ると考えられる。今後、臨床検体を用いた検証が望まれる。

近年、がん生物学において好中球の重要性が脚光を浴びている。腫瘍関連好中球 (Tumor associated neutrophils: TANs) と呼ばれる腫瘍組織に浸潤した好中球は疫学的にがん患者の予後不良因子であることが多数報告されている(17)。TANs ががん悪性化を促す具体的な分子メカニズムに関しては近年盛んに研究されている。例えば、TANs の代表的な機能のひとつには免疫細胞の機能抑制効果が報告されている (17,50)。他には、VEGF の産生亢進による腫瘍血管新生の亢進 (51–53)、強力な酸化酵素の放出による血管内皮細胞の機能障害と内皮間接着の破壊による透過性の亢進 (20)、MMP-9 のようなプロテアーゼの放出による細胞外マトリックスの分解に起因する転移亢進（54)などが報告されている。したがって、腫瘍血管内皮細胞による腫瘍組織への好中球誘引はがんの転移促進につながると考えられる。しかしながら、好中球と腫瘍血管内皮細胞との相互作用に関する研究はほとんどなされておらず、その詳細は不明な点が多い (55)。それらの機能に加えて、炎症刺激などによって活性化された好中球は自身の DNA を細胞外に放出し、好中球細胞外トラップ (Neutrophils extracellular traps: NETs) という構造物を形成し (56–60)、これが転移促進的に働くことも報告されている (18,19,21,61)。好中球が炎症刺激などを受けると、ヒストンのシトルリン化を触媒する酵素である PAD4 が活性化する (62,63)。すると、クロマチンの脱凝縮が引き起こされ、好中球は自身の DNA を細胞外に放出する。NETs にはミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase: MPO) のような強力な酸化酵素が多量に含まれ、活性化好中球は LDL のように周囲に存在する分子の酸化に重要な役割を担っている (36)。したがって、好中球の腫瘍内浸潤は酸化 LDL の形成を促し、LOX-1 を高発現する腫瘍血管内皮細胞を活性

化することが考えられる。また、NETs の本来の機能は病原体の補足と除去であると考えられているが、動脈硬化やがんのような非感染性疾患の病態形成にも関与していると考えられ始めている (18,19,21,61,64–70)。実際に、動脈硬化巣における NETs の存在が報告されている(71)。動脈硬化における NETs の役割に関する最近の研究では、NETs により血管内皮障害や炎症促進性の自然免疫応答が生じ、血栓形成のような合併症を引き起こすことが報告されている (66,68,72)。加えて、がん悪性化、特に転移における NETs の関与も近年報告が増えている (19,21,70)。しかしながら、その機能的役割や臨床上の重要性に関しては依然として不明な点が多く残されている。

我々の実験では、活性化好中球の顕著な腫瘍組織への蓄積が認められており、このことが高転移性腫瘍微小環境中の LDL の酸化に結びついている可能性が考えられる。我々は酸化 LDL が LOX-1 を介して好中球遊走に関与するケモカインの一種である CCL2 の発現亢進を促すことを示した (73,74)。実際に、LOX-1 を発現している血管内皮細胞は好中球の血管内皮細胞への遊走能を高めたが、この反応は腫瘍血管による好中球の誘引と腫瘍組織への浸潤の過程に関わっていると考えられる。また、LOX-1 が直接的に血管内皮細胞への好中球の接着を促すという報告 (75) もあり、ここにも LOX-1 発現腫瘍血管内皮細胞が関与している可能性が考えられる。

最近まで動脈硬化とがんは、互いに関連のない疾患として理解されてきたが、これら 2 疾患は共通の病理学的特徴を有している。例えば、組織の線維化と持続的な炎症病態は両疾患で共通している。我々はこれまでに見出してきた腫瘍血管内皮細胞の炎症性病態について注目し、動脈硬化とがんにおける血管

に共通病態が存在する可能性を着想した。例えば、腫瘍血管内皮細胞では NF-kB が活性化しており、COX-2 (13)や PGI2 (14)、IL-8 (15)、VEGF (16)のような遺伝子の発現が亢進している。すなわち、腫瘍血管内皮細胞では炎症性の腫瘍微小環境に存在するが故に動脈硬化巣の血管内皮細胞と同様に炎症性変化を伴っているといえる (76)。加えて、我々のグループは腫瘍血管内皮細胞が PTX3 や Biglycan のような Damage-associated molecular patterns (DAMPs) を産生しており、TLR2/4 への結合を介した NF-kB シグナルの活性化を生じ、自然免疫応答を惹起していることを報告している (77,78)。特に、高転移性腫瘍血管内皮細胞では正常血管内皮細胞や低転移性腫瘍血管内皮細胞と比較して顕著に Biglycan の発現が亢進しており (11,12)、パラクラインによってがん細胞の遊走能を高め、がん転移を亢進する (11)。また、Biglycan はオートクラインによって血管新生も促すことを報告している (12,79)。腫瘍血管内皮細胞と循環器疾患における血管内皮細胞の共通した病態については今後さらなる研究が望まれる。

なお，本研究の限界として、腫瘍血管内皮細胞における LOX-1 遺伝子発現の制御機構に関しては明らかにできていない点がある。我々の予備的な実験結果では、薬剤誘発性の擬似的低酸素処理や DNA 脱メチル化試薬 (5-aza-2-deoxycytidine) 処理により LOX-1 の遺伝子発現が亢進するという結果を得ているが、より詳細な遺伝子発現制御メカニズムの解明が望まれる。また、一般的には腫瘍関連好中球の蓄積は転移促進的に働くことが知られているが、本実験モデルにおいて実際に腫瘍に蓄積した好中球がどのようなメカニズムで肺転移を促進したのかについても明らかにできておらず、今後の詳細な検討が必要で

ある。また、実験モデルの限界としては、本実験で用いたマウスは免疫不全マウスであったため、T リンパ球を含めた免疫細胞との相互作用に関しては検討できていない。加えて、用いたがん細胞の種類が 1 種類のみであり、今後はメラノーマ以外の癌細胞を用いた実験を行い、本実験で認められた現象の普遍性を検証する必要がある。

結論

本研究では、「がん」と「動脈硬化」を分子レベルでつなぎうる候補因子として血管内皮細胞が発現する LOX-1 の重要性に注目した研究を行った。本研究の重要なポイントの一つは、心血管イベントの重要なリスク因子である LOX-1 の腫瘍血管における発現増加や酸化 LDL 形成促進により、がん患者で認められる腫瘍随伴血栓症のような腫瘍関連心血管イベントを直接的に引き起こしうることを示した点である。古典的には、抗がん剤が心血管イベントの発生を促すことが知られており (8)、多くの基礎研究者や臨床医の関心を集め、腫瘍循環器学という学際領域を形成している。近年では、抗がん剤治療に伴う副作用としての側面を超えて、より深い次元での両疾患の共通分子基盤を模索する流れができ始めている。がん治療法の目覚ましい発展に伴い、近年では循環器疾患などがん以外の疾患で死に至るがん患者の数が増えている。酸化 LDL／LOX-1 シグナルをターゲットにした治療戦略は、がん治療と同時に循環器リスクを軽減させうるという意味で有望な治療戦略となる可能性がある。今後の研究において、臨床検体を用いたトランスレーショナル研究の推進が望まれる。

謝辞

本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院　口腔病態学講座血管生物分子病理学教室　樋田京子教授、東野史裕准教授、間石奈湖助教、松田彩助教、血管生物分子病理学教室　教室員各位、ならびに北海道大学病院循環器・呼吸器外科の樋田泰浩准教授に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. 厚生労働省. 平成 30 年（2018）人口動態統計

2. Suzuki M., Tomoike H., Sumiyoshi T., et al. Incidence of cancers in patients with atherosclerotic cardiovascular diseases. Ijc Hear Vasc 2017;17:11–6. Doi: 10.1016/j.ijcha.2017.08.004.

3. Tapia-Vieyra JV., Delgado-Coello B., Mas-Oliva J. Atherosclerosis and Cancer; A Resemblance with Far-reaching Implications. Arch Med Res 2017;48(1):12–26. Doi: 10.1016/j.arcmed.2017.03.005.

4. ROSS JS., STAGLIANO NE., DONOVAN MJ., BREITBART RE., GINSBURG GS. Atherosclerosis and Cancer. Ann Ny Acad Sci 2001;947(1):271–93. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03949.x.

5. Patnaik JL., Byers T., DiGuiseppi C., Dabelea D., Denberg TD. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. Breast Cancer Res 2011;13(3):R64. Doi: 10.1186/bcr2901.

6. Campello E., Ilich A., Simioni P., Key NS. The relationship between pancreatic cancer and hypercoagulability: a comprehensive review on epidemiological and biological issues. Brit J Cancer 2019;121(5):359–71. Doi: 10.1038/s41416-019-0510-x.

7. Hasin T., Gerber Y., McNallan SM., et al. Patients with heart failure have an increased risk of incident cancer. J Am Coll Cardiol 2013;62(10):881–6. Doi: 10.1016/j.jacc.2013.04.088.

8. Albini A., Pennesi G., Donatelli F., Cammarota R., Flora SD., Noonan DM. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention. Jnci J National Cancer Inst 2010;102(1):14–25. Doi: 10.1093/jnci/djp440.

9. Williams KJ., Tabas I. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis, 1995.

10. Itabe H., Obama T., Kato R. The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis. J Lipids 2011;2011:418313. Doi: 10.1155/2011/418313.

11. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., et al. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. Sci Rep-Uk 2016;6(1):28039. Doi: 10.1038/srep28039.

12. Yamamoto K., Ohga N., Hida Y., et al. Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. Brit J Cancer 2012;106(6):1214–23. Doi: 10.1038/bjc.2012.59.

13. Muraki C., Ohga N., Hida Y., et al. Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. Int J Cancer 2012;130(1):59–70. Doi: 10.1002/ijc.25976.

14. Osawa T., Ohga N., Hida Y., et al. Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner. Cancer Sci 2012;103(6):1038–44. Doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02261.x.

15. Kikuchi H., Maishi N., Annan DA., et al. Chemotherapy-Induced IL8 Upregulates MDR1/ABCB1 in Tumor Blood Vessels and Results in Unfavorable Outcome. Cancer Res 2020;80(14):2996–3008. Doi: 10.1158/0008-5472.can-19-3791.

16. Kurosu T., Ohga N., Hida Y., et al. HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. Brit J Cancer 2011;104(5):819–29. Doi: 10.1038/bjc.2011.20.

17. Shaul ME., Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. Nat Rev Clin Oncol 2019;16(10):601–20. Doi: 10.1038/s41571-019-0222-4.

18. Yang L., Liu Q., Zhang X., et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. Nature 2020;583(7814):133–8. Doi: 10.1038/s41586-020-2394-6.

19. Tohme S., Yazdani HO., Al-Khafaji AB., et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. Cancer Res 2016;76(6):1367–80. Doi: 10.1158/0008-5472.can-15-1591.

20. McDowell SAC., Luo RBE., Arabzadeh A., et al. Neutrophil oxidative stress mediates obesity-associated vascular dysfunction and metastatic transmigration. Nat Cancer 2021;2(5):545–62. Doi: 10.1038/s43018-021-00194-9.

21. Cedervall J., Zhang Y., Olsson A-K. Tumor-Induced NETosis as a Risk Factor for Metastasis and Organ Failure. Cancer Res 2016;76(15):4311–5. Doi: 10.1158/0008-5472.can-15-3051.

22. Binet F., Cagnone G., Crespo-Garcia S., et al. Neutrophil extracellular traps target senescent vasculature for tissue remodeling in retinopathy. Science 2020;369(6506):eaay5356. Doi: 10.1126/science.aay5356.

23. Kozlowski JM., Hart IR., Fidler IJ., Hanna N. A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. J Natl Cancer I 1984;72(4):913–7.

24. Maishi N., Kikuchi H., Sato M., et al. Development of Immortalized Human Tumor Endothelial Cells from Renal Cancer. Int J Mol Sci 2019;20(18):4595. Doi: 10.3390/ijms20184595.

25. Ohga N., Ishikawa S., Maishi N., et al. Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells Comparison between Tumor Endothelial Cells Isolated from High- and Low-Metastatic Tumors. Am J Pathology 2012;180(3):1294–307. Doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.035.

26. Maishi N., Ohga N., Hida Y., et al. CXCR7: A novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. Pathol Int 2012;62(5):309–17. Doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02792.x.

27. Hida K. Tumor-Associated Endothelial Cells with Cytogenetic Abnormalities. CANCER RESEARCH 2004.

28. Luo Y., Dorf ME. Isolation of Mouse Neutrophils. Curr Protoc Immunol 1997;22(1):3.20.1-3.20.6. Doi: 10.1002/0471142735.im0320s22.

29. Swamydas M., Luo Y., Dorf ME., Lionakis MS. Isolation of Mouse Neutrophils. Curr Protoc Immunol 2015;110(1):3.20.1-3.20.15. Doi: 10.1002/0471142735.im0320s110.

30. Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. Invas Metast 1989;9(3):192–208.

31. Hamada J., Cavanaugh P., Lotan O., Nicolson G. Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. Brit J Cancer 1992;66(2):349–54. Doi: 10.1038/bjc.1992.269.

32. Goldman MJ., Craft B., Hastie M., et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. Nat Biotechnol 2020;38(6):675–8. Doi: 10.1038/s41587-020-0546-8.

33. O'Brien KD., Olin KL., Alpers CE., et al. Comparison of Apolipoprotein and Proteoglycan Deposits in Human Coronary Atherosclerotic Plaques. Circulation 1998;98(6):519–27. Doi: 10.1161/01.cir.98.6.519.

34. Nakashima Y., Fujii H., Sumiyoshi S., Wight TN., Sueishi K. Early Human Atherosclerosis. Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology 2007;27(5):1159–65. Doi: 10.1161/atvbaha.106.134080.

35. Sawamura T., Wakabayashi I., Okamura T. LOX-1 in atherosclerotic disease. Clin Chim Acta 2015;440:157–63. Doi: 10.1016/j.cca.2014.11.016.

36. Podrez EA., Schmitt D., Hoff HF., Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. J Clin Invest 1999;103(11):1547–60. Doi: 10.1172/jci5549.

37. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. Front Biosci 2008;13(13):2400. Doi: 10.2741/2853.

38. Capucetti A., Albano F., Bonecchi R. Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. Front Immunol 2020;11:1259. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01259.

39. Neufeld EB., Zadrozny LM., Phillips D., Aponte A., Yu Z-X., Balaban RS. Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. Atherosclerosis 2014;233(1):113–21. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.038.

40. Sawamura T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. Nature 1997.

41. Mentrup T., Theodorou K., Cabrera-Cabrera F., et al. Atherogenic LOX-1 signaling is controlled by SPPL2-mediated intramembrane proteolysisSPPL2 proteases control LOX-1 signaling. J Exp Medicine 2019;216(4):807–30. Doi: 10.1084/jem.20171438.

42. Siqueira JD., Zani IA., Russell DA., Wheatcroft SB., Ponnambalam S., Homer-Vanniasinkam S. Clinical and Preclinical Use of LOX-1-Specific Antibodies in Diagnostics and Therapeutics. J Cardiovasc Transl 2015;8(8):458–65. Doi: 10.1007/s12265-015-9655-z.

43. Zhao Z., Xu Y., Li S., Guo J., Yi T., Chen L. Higher serum lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in patients with stable coronary artery disease is associated with major adverse cardiovascular events: A multicentre pilot study. Biochem Medica 2019;29(1):0–0. Doi: 10.11613/bm.2019.010705.

44. Hirsch HA., Iliopoulos D., Joshi A., et al. A Transcriptional Signature and Common Gene Networks Link Cancer with Lipid Metabolism and Diverse Human Diseases. Cancer Cell 2010;17(4):348–61. Doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.022.

45. Murdocca M., Masi CD., Pucci S., et al. LOX-1 and cancer: an indissoluble liaison. Cancer Gene Ther 2021:1–11. Doi: 10.1038/s41417-020-00279-0.

46. Zhang J., Zhang L., Li C., et al. LOX-1 is a poor prognostic indicator and induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis in pancreatic cancer patients. Cell Oncol 2018;41(1):73–84. Doi: 10.1007/s13402-017-0360-6.

47. Balzan S., Lubrano V. LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. Life Sci 2018;198(Herz 28 2003):79–86. Doi: 10.1016/j.lfs.2018.02.024.

48. Murdocca M., Capuano R., Pucci S., et al. Targeting LOX-1 Inhibits Colorectal Cancer Metastasis in an Animal Model. Frontiers Oncol 2019;9:927. Doi: 10.3389/fonc.2019.00927.

49. Murdocca M., Mango R., Pucci S., et al. The lectin-like oxidized LDL receptor-1: a new potential molecular target in colorectal cancer. Oncotarget 2016;7(12):14765–80. Doi: 10.18632/oncotarget.7430.

50. Lecot P., Sarabi M., Abrantes MP., et al. Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. Front Immunol 2019;10:2155. Doi: 10.3389/fimmu.2019.02155.

51. Jablonska J., Leschner S., Westphal K., Lienenklaus S., Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. J Clin Invest 2010;120(4):1151–64. Doi: 10.1172/jci37223.

52. Kuang D-M., Zhao Q., Wu Y., et al. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2011;54(5):948–55. Doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.041.

53. Dumitru CA., Fechner MK., Hoffmann TK., Lang S., Brandau S. A novel p38-MAPK signaling axis modulates neutrophil biology in head and neck cancer. J Leukocyte Biol 2012;91(4):591–8. Doi: 10.1189/jlb.0411193.

54. Bekes EM., Schweighofer B., Kupriyanova TA., et al. Tumor-Recruited Neutrophils and Neutrophil TIMP-Free MMP-9 Regulate Coordinately the Levels of Tumor Angiogenesis and Efficiency of Malignant Cell Intravasation. Am J Pathology 2011;179(3):1455–70. Doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.031.

55. SenGupta S., Subramanian BC., Parent CA. Getting TANned: How the tumor microenvironment drives neutrophil recruitment. J Leukocyte Biol 2019;105(3):449–62. Doi: 10.1002/jlb.3ri0718-282r.

56. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science 2004;303(5663):1532–5. Doi: 10.1126/science.1092385.

57. Fuchs TA., Abed U., Goosmann C., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biology 2007;176(2):231–41. Doi: 10.1083/jcb.200606027.

58. Clark SR., Ma AC., Tavener SA., et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med 2007;13(4):463–9. Doi: 10.1038/nm1565.

59. Pilsczek FH., Salina D., Poon KKH., et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to Staphylococcus aureus. J Immunol 2010;185(12):7413–25. Doi: 10.4049/jimmunol.1000675.

60. Metzler KD., Fuchs TA., Nauseef WM., et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. Blood 2011;117(3):953–9. Doi: 10.1182/blood-2010-06-290171.

61. Milette S., Quail DF., Spicer JD. Neutrophil DNA Webs Untangled. Cancer Cell 2020;38(2):164–6. Doi: 10.1016/j.ccell.2020.07.002.

62. Li P., Li M., Lindberg MR., Kennett MJ., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J Exp Medicine 2010;207(9):1853–62. Doi: 10.1084/jem.20100239.

63. Leshner M., Wang S., Lewis C., et al. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. Front Immunol 2012;3:307. Doi: 10.3389/fimmu.2012.00307.

64. Thålin C., Lundström S., Seignez C., et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. Plos One 2018;13(1):e0191231. Doi: 10.1371/journal.pone.0191231.

65. Wong SL., Demers M., Martinod K., et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. Nat Med 2015;21(7):815–9. Doi: 10.1038/nm.3887.

66. Sorvillo N., Cherpokova D., Martinod K., Wagner DD. Extracellular DNA NET-Works With Dire Consequences for Health. Circ Res 2019;125(4):470–88. Doi: 10.1161/circresaha.119.314581.

67. Carmona-Rivera C., Carlucci PM., Goel RR., et al. Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. Jci Insight 2020;5(13). Doi: 10.1172/jci.insight.139388.

68. Döring Y., Libby P., Soehnlein O. Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases. Circ Res 2020;126(9):1228–41. Doi: 10.1161/circresaha.120.315931.

69. Kang L., Yu H., Yang X., et al. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke. Nat Commun 2020;11(1):2488. Doi: 10.1038/s41467-020-16191-y.

70. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. J Clin Invest 2013;123(8):3446–58. Doi: 10.1172/jci67484.

71. Megens RTA., Vijayan S., Lievens D., et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. Thromb Haemostasis 2012;107(03):597–8. Doi: 10.1160/th11-09-0650.

72. Osaka M., Deushi M., Aoyama J., Funakoshi T., Ishigami A., Yoshida M. High-Fat Diet Enhances Neutrophil Adhesion in LDLR-Null Mice Via Hypercitrullination of Histone H3. Jacc Basic Transl Sci 2021;6(6):507–23. Doi: 10.1016/j.jacbts.2021.04.002.

73. Iida S., Kohro T., Kodama T., Nagata S., Fukunaga R. Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation. J Leukocyte Biol 2005;78(2):481–90. Doi: 10.1189/jlb.0904515.

74. Reichel CA., Rehberg M., Lerchenberger M., et al. Ccl2 and Ccl3 Mediate Neutrophil Recruitment via Induction of Protein Synthesis and Generation of Lipid Mediators. Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology 2009;29(11):1787–93. Doi: 10.1161/atvbaha.109.193268.

75. Honjo M., Nakamura K., Yamashiro K., et al. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. Proc National Acad Sci 2003;100(3):1274–9. Doi: 10.1073/pnas.0337528100.

76. Gimbrone MA., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circ Res 2016;118(4):620–36. Doi: 10.1161/circresaha.115.306301.

77. Schaefer L., Babelova A., Kiss E., et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. J Clin Invest 2005;115(8):2223–33. Doi: 10.1172/jci23755.

78. Basile A., Sica A., d'Aniello E., et al. Characterization of the Promoter for the Human Long Pentraxin PTX3 ROLE OF NF-κB IN TUMOR NECROSIS FACTOR-α AND INTERLEUKIN-1β REGULATION*. J Biol Chem 1997;272(13):8172–8. Doi: 10.1074/jbc.272.13.8172.

79. Cong L., Maishi N., Annan DA., et al. Inhibition of Stromal Biglycan Promotes Normalization of the Tumor Microenvironment and Enhances Chemotherapeutic Efficacy 2021. Doi: 10.21203/rs.3.rs-142861/v1.

図の説明

Figure 1. 腫瘍組織における LDL 蓄積と血中酸化 LDL 濃度

(A) 低転移性腫瘍組織と高転移性腫瘍組織における Biglycan mRNA 発現量を定量 PCR 法により評価した (n = 6 または 7)。(B) 腫瘍組織における Biglycan (赤) と DAPI (青) の染色像。 Scale bar = 100 μm。 (C) Biglycan 陽性領域面積の定量解析結果 (n = 6 または 7)。 (D) 腫瘍組織における CD31 (赤) と ApoB (緑) 、DAPI (青) の染色像。 Scale bar = 100 μm。 (E) 腫瘍組織における ApoB 陽性領域面積の定量結果 (n = 6 または 7)。 (F) 非担癌マウス、低転移性腫瘍移植マウス、および高転移性腫瘍移植マウスの血中酸化 LDL 濃度の ELISA による定量結果 (n = 8)。 $*p < 0.05$、 $**p < 0.01$、 $***p < 0.001$。 (A)、 (C)、および (E) については two-tailed Student's t-test を、 (F) に関しては Ordinary one-way ANOVA の後、Tukey 法による検定を行った。

Figure 2. 酸化 LDL 受容体 LOX-1 の腫瘍間質および腫瘍血管における発現

(A) 腫瘍組織における LOX-1、Msr1、ならびに Cd36 の遺伝子発現量を定量 PCR 法により評価した (n = 6 or 7) 。 (B) GTEx-TCGA データベース内の RNAseq データを用い、健常者由来の正常皮膚 (n = 556) と悪性黒色腫 (n = 468) における LOX-1、MSR1、ならびに CD36 の遺伝子発現量のパターンをヒートマップで示した。 (C) RAW264.7 (マクロファージ)、正常血管内皮細胞、低転移性腫瘍血管内細胞、ならびに高転移性腫瘍血管内皮細胞における LOX-1、Msr1 の遺伝子発現の有無を RT-PCR により評価した。 (D) 正常血管内皮細胞、低転移性腫瘍血

管内皮細胞、ならびに低転移性腫瘍血管内皮細胞における LOX-1 の遺伝子発現量を定量 PCR 法により評価した (n = 3)。 (E) 正常血管内皮細胞、低転移性主要血管内皮細胞、ならびに高転移性腫瘍血管内皮細胞における LOX-1 (赤) と DAPI (青) の免疫染色像。Scale bar = 50 μm。 (F) 腫瘍組織における LOX-1 (赤)、CD31 (緑)、および DAPI (青) の染色像。Scale bar = 100 μm。 (G) 非担癌マウス、低転移性腫瘍移植マウス、および高転移性腫瘍移植マウスの血中可溶型 LOX-1 濃度の ELISA による定量結果 (n = 8)。 (H) 血中酸化 LDL 濃度と可溶型 LOX-1 濃度の積として計算された LOX-index 値 (n = 8)。 (I) ヒト悪性黒色腫における HE 染色像、および S-100、CD31、ならびに LOX-1 の面積染色像。 矢印は血管内皮細胞近傍に認められた LOX-1 シグナルを示す。 四角で囲まれた領域は拡大イメージの抽出箇所を示す。 Scale bar = 100 μm。 $*p < 0.05$、 $**p < 0.01$、 $***p < 0.001$。 (A) に関しては two-tailed Student's t-test、 (D) 、(G)、および (H) に関しては Ordinary one-way ANOVA の後、Tukey 法による検定を行った。

Figure 3. LOX-1 遺伝子発現、血中可溶型 LOX-1 濃度、血中酸化、LDL 濃度、および LOX-index 値とがん転移との相関

(A) 各担癌マウスから摘出した肺における腫瘍細胞由来発光シグナルの in vivo イメージング装置 IVIS による検出画像。(B) 肺における腫瘍細胞由来発光シグナル強度の定量結果 (Total flux: photons/sec) (n = 8)。 (C) 腫瘍組織における LOX-1 の遺伝子発現量 (n = 13)、血中可溶型 LOX-1 濃度 (n= 16)、血中酸化 LDL 濃度 (n = 16)、ならびに LOX-index 値 (n = 16) と肺における発光強度との相関

解析。相関係数は Pearson's correlation coefficient を用いて算出した。 (D) 左： 健常者由来皮膚組織 (n＝410) 、悪性黒色腫の原発腫瘍 (n＝101)、および悪性黒色腫の転移巣 (n = 364) における LOX-1 遺伝子発現量の比較結果。中央：健常者の膵臓 (n = 165) と膵癌組織 (n = 179) における LOX-1 の遺伝子発現量の比較結果。右：健常者の皮膚組織 (n = 179) と頭頸部がん組織 (n = 517) における LOX-1 の遺伝子発現量の比較結果。(E) 腫瘍組織における LOX-1 の発現量と各がんにおける予後との関連について Kaplan-Meier 解析を実施した結果。悪性黒色腫患者は 467 例、膵癌患者は 179 例、頭頸部がん患者は 699 例のデータを用いた。OS：全生存期間、PFI：無増悪生存期間。

Figure 4. 腫瘍組織における好中球浸潤と活性化

(A) 腫瘍組織における MPO (赤)、と DAPI (青) の染色像。 Scale bar = 100 μm。(B) 腫瘍組織における MPO 陽性領域面積の定量解析結果 (n＝6 または 7)。(C) 腫瘍組織における CD11b (赤)、Gr-1 (緑)、ならびに DAPI (青) の染色画像。Scale bar = 100 μm。 (D) CD11b と Gr-1 の二重陽性領域面積の定量解析結果 (n = 6 or 7)。 (E) 腫瘍組織における Gr-1 (緑)、CitH3 (赤)、および DAPI (青) の染色画像。Scale bar = 100 μm。(F) 腫瘍組織における Gr-1 と CitH3 の二重陽性領域面積の定量結果 (n = 6 or 7)。 (G) Gr-1 陽性領域における CitH3 陽性領域の占める割合 (n = 6 or 7)。 $*p < 0.05$、 $**p < 0.01$、 $***p < 0.001$。(B)、 (D)、 (F)、ならびに (G) に関しては two-tailed Student's t-test による検定を行った。

Figure 5 腫瘍組織における好中球遊走因子の発現

(A) 腫瘍組織における Il-8、Cxcl5、Ccl2、ならびに Il-6 の遺伝子発現量を定量 PCR 法により評価した (n = 6 or 7)。 (B) 腫瘍組織における LOX-1 遺伝子発現量と Ccl2、Cxcl5、ならびに Il-6 の遺伝子発現量との相関解析。相関係数は Pearson's correlation coefficient を用いて算出した (n = 13)。 (C) ヒト悪性黒色腫組織における LOX-1 の遺伝子発現量と CCL2、CXCL5、ならびに IL-6 の遺伝子発現量との相関解析 (n = 473) 。相関係数は Pearson's correlation coefficient を用いて算出した。

Figure 6 血管内皮細胞における LOX-1 の発現が好中球／がん細胞の遊走能に及ぼす影響

(A) Mock ベクターまたは hLOX-1 発現ベクターを遺伝子導入された iHMVEC 細胞における LOX-1 遺伝子発現量を定量 PCR 法により評価した。 (n = 3)。 (B) LOX-1 過剰発現 iHMVEC 細胞における LOX-1 (赤) と DAPI (青) の染色画像。Scale bar for low magnification = 100 μm. Scale bar for high magnification = 10 μm。(C) LOX-1 過剰発現 iHMVEC 細胞を用い、酸化 LDL 存在化または非存在下での CCL2 遺伝子発現量を定量 PCR 法により評価した。 (n = 3)。 (D) 高転移性腫瘍血管内皮細胞における shRNA による LOX-1 発現抑制効果を定量 PCR 法により評価した (n = 3)。 (E) LOX-1 の発現抑制をした高転移性腫瘍血管内皮細胞における CCL2 の遺伝子発現量を定量 PCR 法により評価した (n = 3)。 (F) 好中球の血管内皮細胞に対する遊走能の評価方法の概略図。 (G) マウス骨髄から単離し

た好中球における Ccr2 の遺伝子発現を RT-PCR 法で評価した。 (H および I) チャンバーの下層に LOX-1 過剰発現 iHMVEC 細胞を播種した場合 (H) と LOX-1 発現抑制腫瘍血管内皮細胞を播種した場合 (I) における、下層に遊走した好中球数の計測結果 (n = 3)。 N.D. はセルカウンターの計測限界以下であったことを示す。 (J) がん細胞における CCR2 遺伝子発現を RT-PCR 法により評価した。 (K) がん細胞の血管内皮細胞に対する遊走能の評価方法の概略図。 (L) CCR2 阻害剤の存在下もしくは非存在下で LOX-1 過剰発現血管内皮細胞に対して遊走したがん細胞の画像と遊走したがん細胞数の定量結果。 (n = 3)。 $*p < 0.05$、 $**p < 0.01$、 $***p < 0.001$。 (C) と (I) に関しては two-tailed Student's t-test、 (D)、(E)、ならびに (J) に関しては Ordinary one-way ANOVA の後、Tukey 法による検定を行った。

Figure 7. 腫瘍血管内皮細胞／腫瘍間質における LOX-1 の発現抑制による転移抑制効果

(A) LOX-1 発現抑制腫瘍血管内皮細胞とがん細胞との共移植実験の概略図。 (B) 共移植実験における腫瘍体積の経時的測定結果 (n = 5)。 (C) 共移植マウス肺における腫瘍細胞由来発光シグナルの in vivo イメージング装置 IVIS による検出画像。 (D) 共移植後の腫瘍組織における Gr-1 (緑) と DAPI (青) の染色画像。 Scale bar = 1mm。 (E) 共移植後の腫瘍組織における Gr-1 陽性領域面積の定量解析結果 (n = 5)。 (F) shLOX-1 発現アデノ随伴ウイルスの腫瘍内投与後、摘出した腫瘍組織の写真。 (G) shLOX-1 発現アデノ随伴ウイルスの腫瘍内投与後の腫

瘍体積の経時的測定結果 (n = 5)。 (H) shLOX-1 発現アデノ随伴ウイルスの腫瘍内投与後の腫瘍組織における LOX-1 (赤)と DAPI (青) の染色画像。 Scale bar = 100 μm。 (I) shLOX-1 発現アデノ随伴ウイルスの腫瘍内投与後の血中可溶型 LOX-1 濃度の ELISA による定量結果 (n = 5)。 (J) shLOX-1 発現アデノ随伴ウイルスの腫瘍内投与後のマウス肺における腫瘍細胞由来発光シグナルの in vivo イメージング装置 IVIS による検出画像。 (K) shLOX-1 発現アデノ随伴ウイルスの腫瘍内投与後のマウス血中可溶型 LOX-1 濃度と肺における発光強度との相関解析。相関係数は Pearson's correlation coefficient を用いて算出した(n = 10) 。 ***p < 0.001。 (B) と (G) に関しては two-way ANOVA の後、Bonferroni 補正を行って多重比較検定を行った。

Figure 8. 腫瘍血管内皮細胞は酸化 LDL 受容体 LOX-1 シグナルを介して転移促進生癌微小環境を形成する

本研究結果の概要を示す。炎症性の腫瘍血管内皮細胞では Biglycan や LOX-1 の発現が亢進している。腫瘍血管内皮細胞が産生する Biglycan は腫瘍微小環境中に沈着し、LDL の蓄積を促すと考えられる。蓄積した LDL の一部は酸化され、LOX-1 を介して腫瘍血管内皮細胞を刺激し、CCL2 のような好中球遊走促進性のケモカインを産生する。その結果、好中球の腫瘍組織への浸潤が促され、腫瘍関連好中球となる。腫瘍微小環境中のサイトカインなどにより刺激を受けた腫瘍関連好中球は活性化し、NETs 形成と共にミエロペルオキシダーゼを代表とする酸化酵素を周囲に多量に放出すると考えられる。放出された強力な酸化酵素に

より LDL の酸化がさらに進み、腫瘍血管内皮細胞を刺激するというスパイラルが生じ、転移促進性がん微小環境の形成が進むことが示唆された。

Figure 1

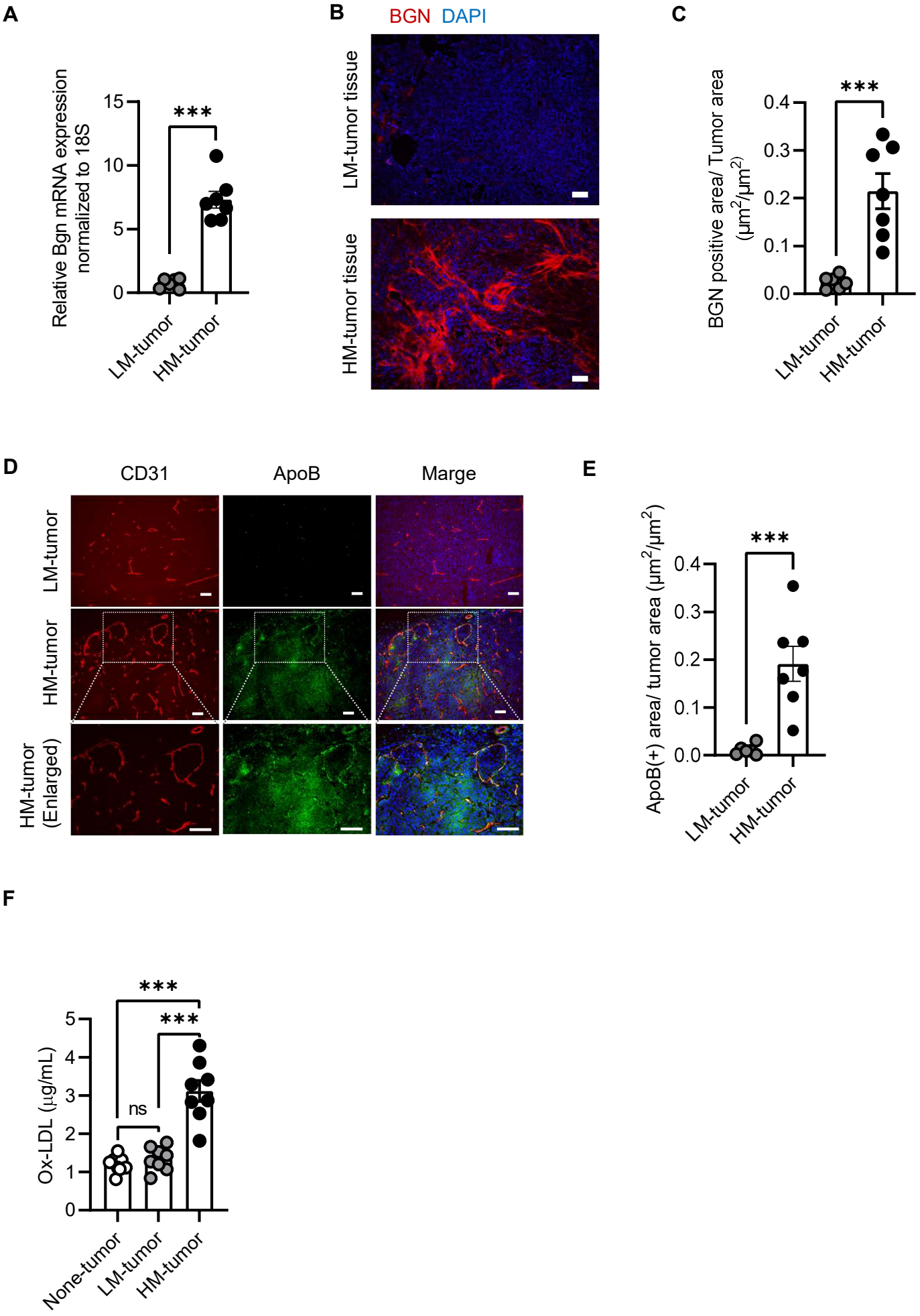

A
Relative Bgn mRNA expression normalized to 18S
15
10
5
0
***
LM-tumor
HM-tumor
B
BGN DAPI
LM-tumor tissue
HM-tumor tissue
C
BGN positive area/ Tumor area (μm²/μm²)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
LM-tumor
HM-tumor
D
CD31
ApoB
Marge
LM-tumor
HM-tumor
HM-tumor (Enlarged)
E
ApoB(+) area/ tumor area (μm²/μm²)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
LM-tumor
HM-tumor
F
Ox-LDL (μg/mL)
5
4
3
2
1
0
***
***
ns
None-tumor
LM-tumor
HM-tumor

Figure 2

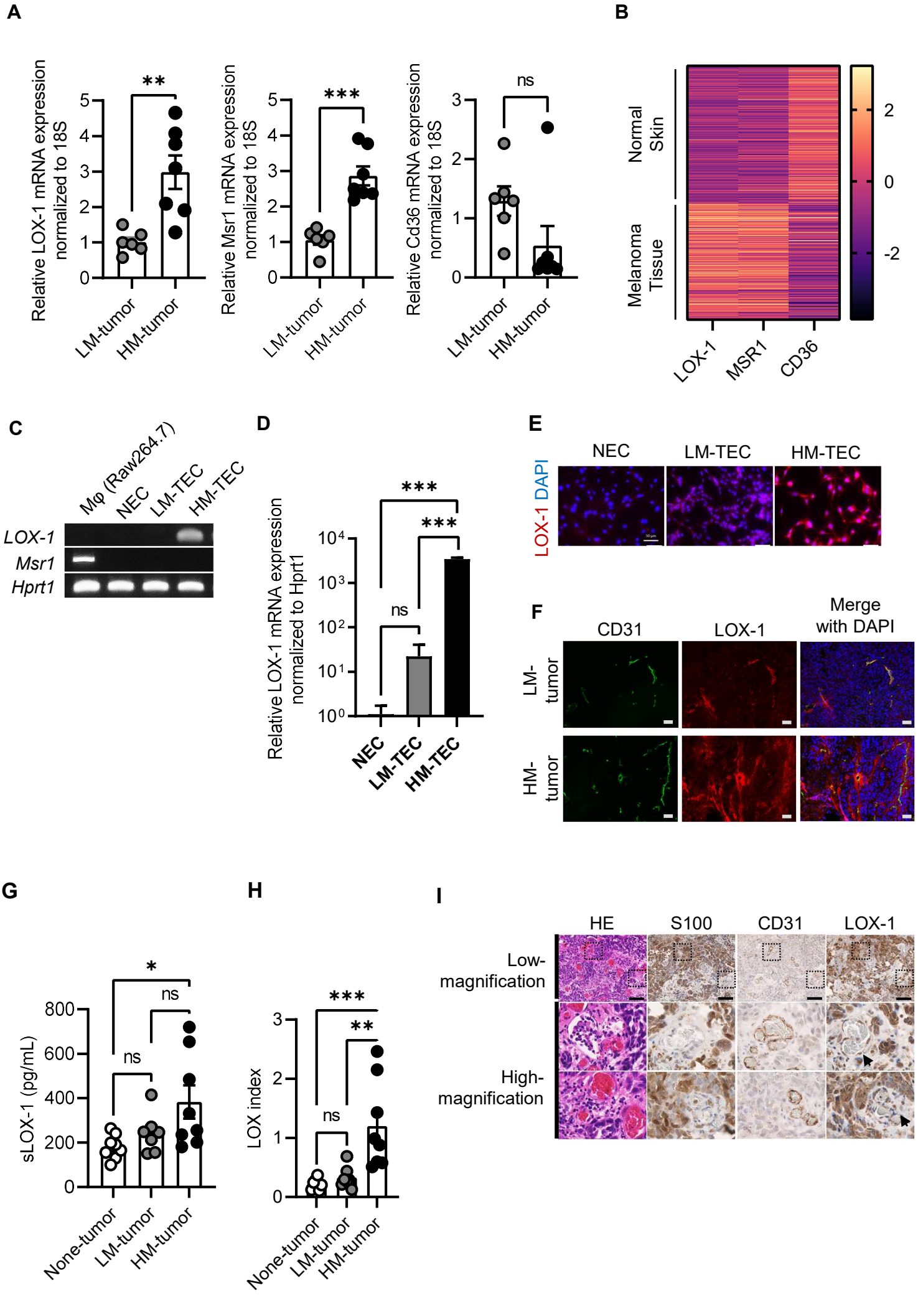

A
Relative LOX-1 mRNA expression normalized to 18S
**
LM-tumor
HM-tumor
Relative Msr1 mRNA expression normalized to 18S
***
Relative Cd36 mRNA expression normalized to 18S
ns
B
Normal Skin
Melanoma Tissue
LOX-1
MSR1
CD36
C
Mφ (Raw264.7)
NEC
LM-TEC
HM-TEC
LOX-1
Msr1
Hprt1
D
Relative LOX-1 mRNA expression normalized to Hprt1
***
ns
E
NEC
LM-TEC
HM-TEC
LOX-1 DAPI
F
CD31
LOX-1
Merge with DAPI
LM-tumor
HM-tumor
G
sLOX-1 (pg/mL)
*
ns
None-tumor
LM-tumor
HM-tumor
H
LOX index
I
HE
S100
CD31
LOX-1
Low-magnification
High-magnification

Figure 3

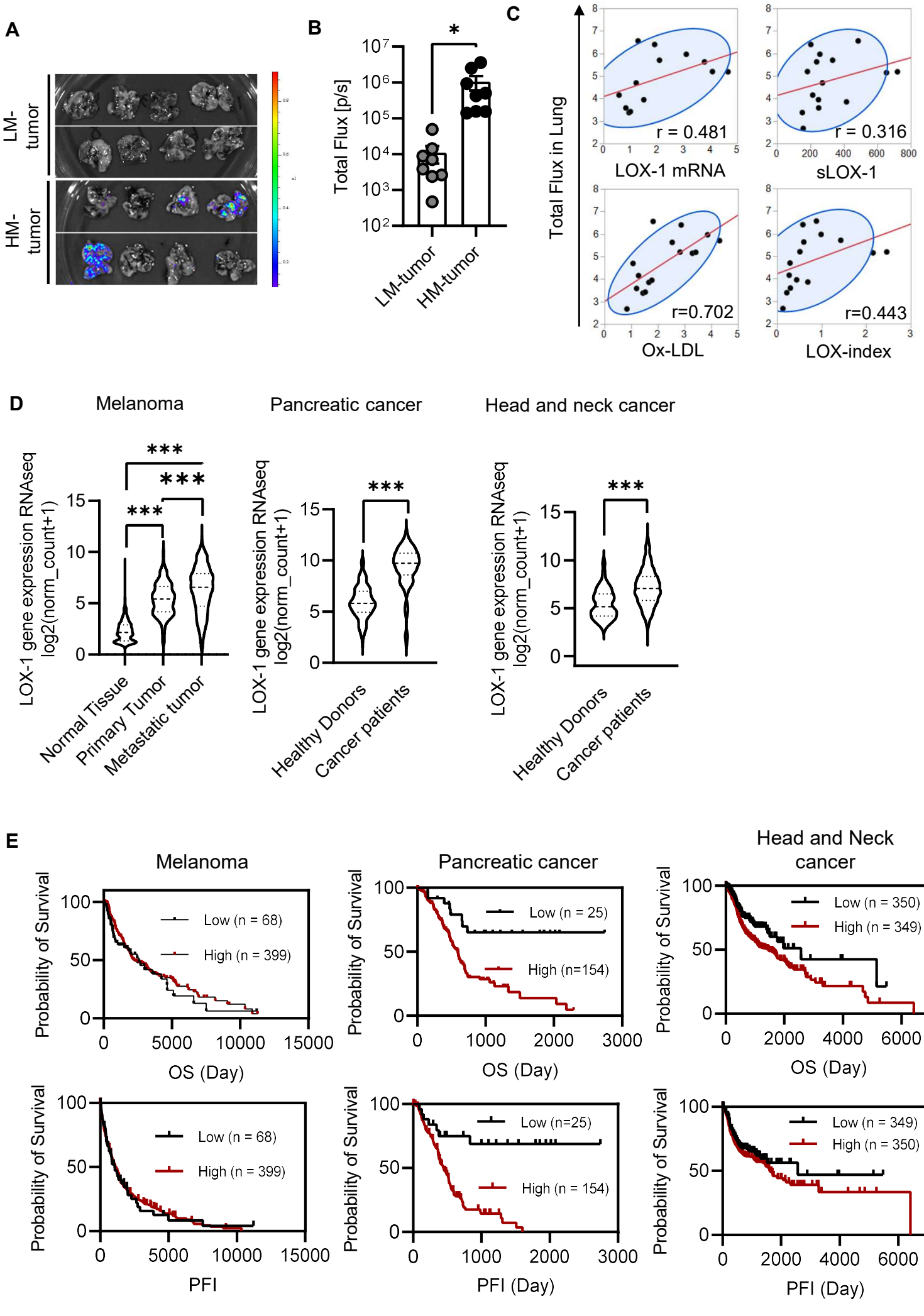

A
LM-tumor
HM-tumor
B
Total Flux [p/s]
LM-tumor
HM-tumor
C
Total Flux in Lung
r = 0.481
LOX-1 mRNA
r = 0.316
sLOX-1
r=0.702
Ox-LDL
r=0.443
LOX-index
D
Melanoma
Pancreatic cancer
Head and neck cancer
LOX-1 gene expression RNAseq log2(norm_count+1)
Normal Tissue
Primary Tumor
Metastatic tumor
Healthy Donors
Cancer patients
E
Melanoma
Pancreatic cancer
Head and Neck cancer
Probability of Survival
Low (n = 68)
High (n = 399)
OS (Day)
Low (n = 25)
High (n=154)
Low (n = 350)
High (n = 349)
PFI
Low (n=25)
High (n = 154)
Low (n = 349)
High (n = 350)
PFI (Day)

Figure 4

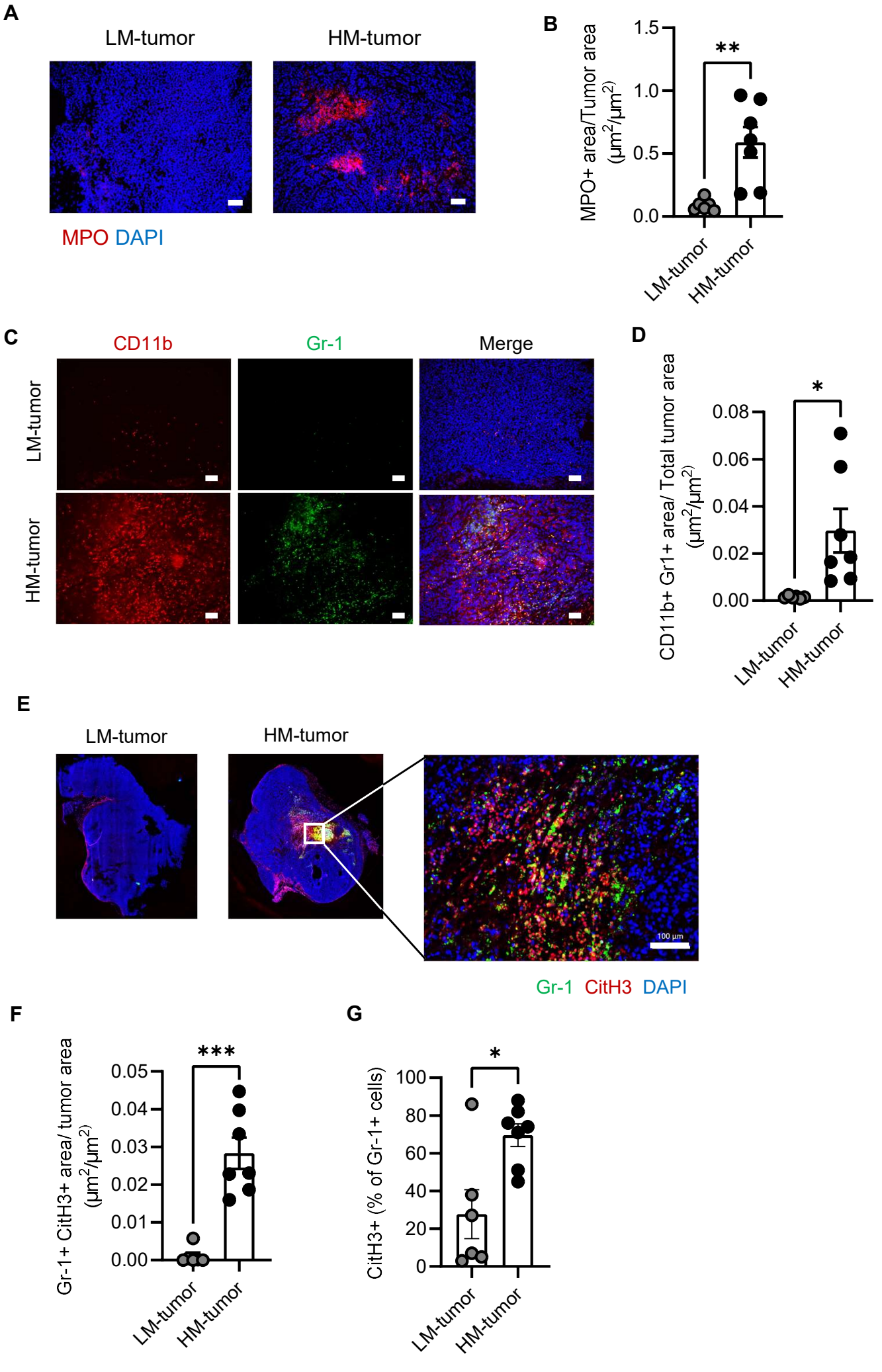
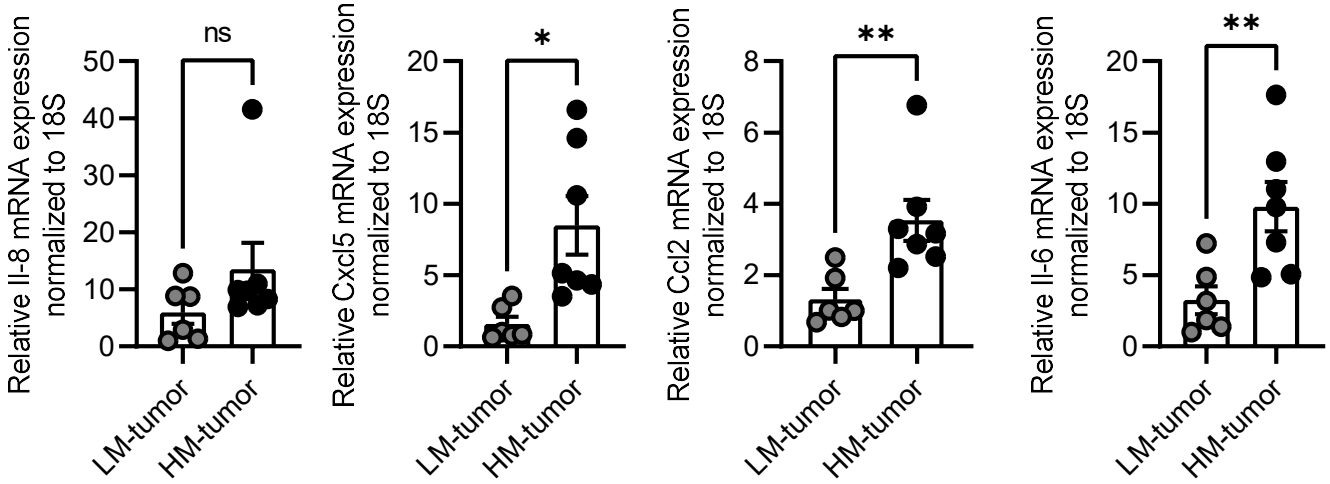
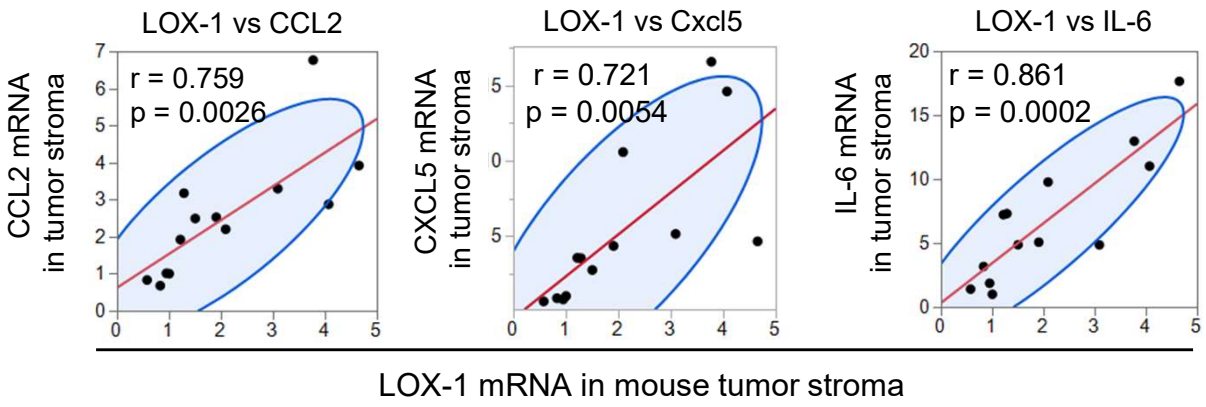

A
LM-tumor
HM-tumor
MPO DAPI
B
MPO+ area/Tumor area (μm²/μm²)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
LM-tumor
HM-tumor
C
CD11b
Gr-1
Merge
LM-tumor
HM-tumor
D
CD11b+ Gr1+ area/ Total tumor area (μm²/μm²)
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
LM-tumor
HM-tumor
E
LM-tumor
HM-tumor
100 μm
Gr-1 CitH3 DAPI
F
Gr-1+ CitH3+ area/ tumor area (μm²/μm²)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
***
LM-tumor
HM-tumor
G
CitH3+ (% of Gr-1+ cells)
100
80
60
40
20
0
*
LM-tumor
HM-tumor

Figure 5

A


Relative Il-8 mRNA expression normalized to 18S
ns
Relative Cxcl5 mRNA expression normalized to 18S
*
Relative Ccl2 mRNA expression normalized to 18S
**
Relative Il-6 mRNA expression normalized to 18S
**
LM-tumor
HM-tumor

B


LOX-1 vs CCL2
r = 0.759
p = 0.0026
CCL2 mRNA in tumor stroma
LOX-1 vs Cxcl5
r = 0.721
p = 0.0054
CXCL5 mRNA in tumor stroma
LOX-1 vs IL-6
r = 0.861
p = 0.0002
IL-6 mRNA in tumor stroma
LOX-1 mRNA in mouse tumor stroma

C

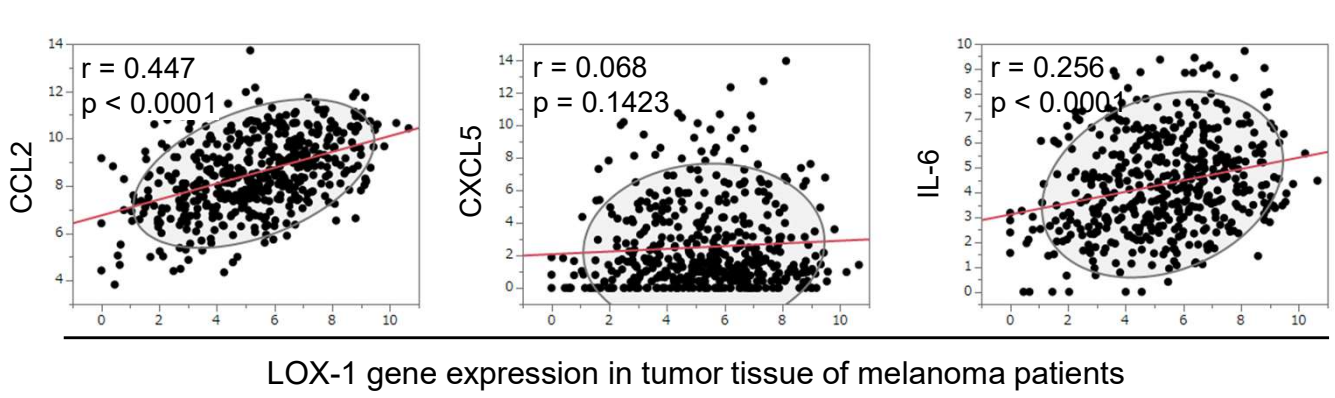

r = 0.447
p < 0.0001
CCL2
r = 0.068
p = 0.1423
CXCL5
r = 0.256
p < 0.0001
IL-6
LOX-1 gene expression in tumor tissue of melanoma patients

Figure 6

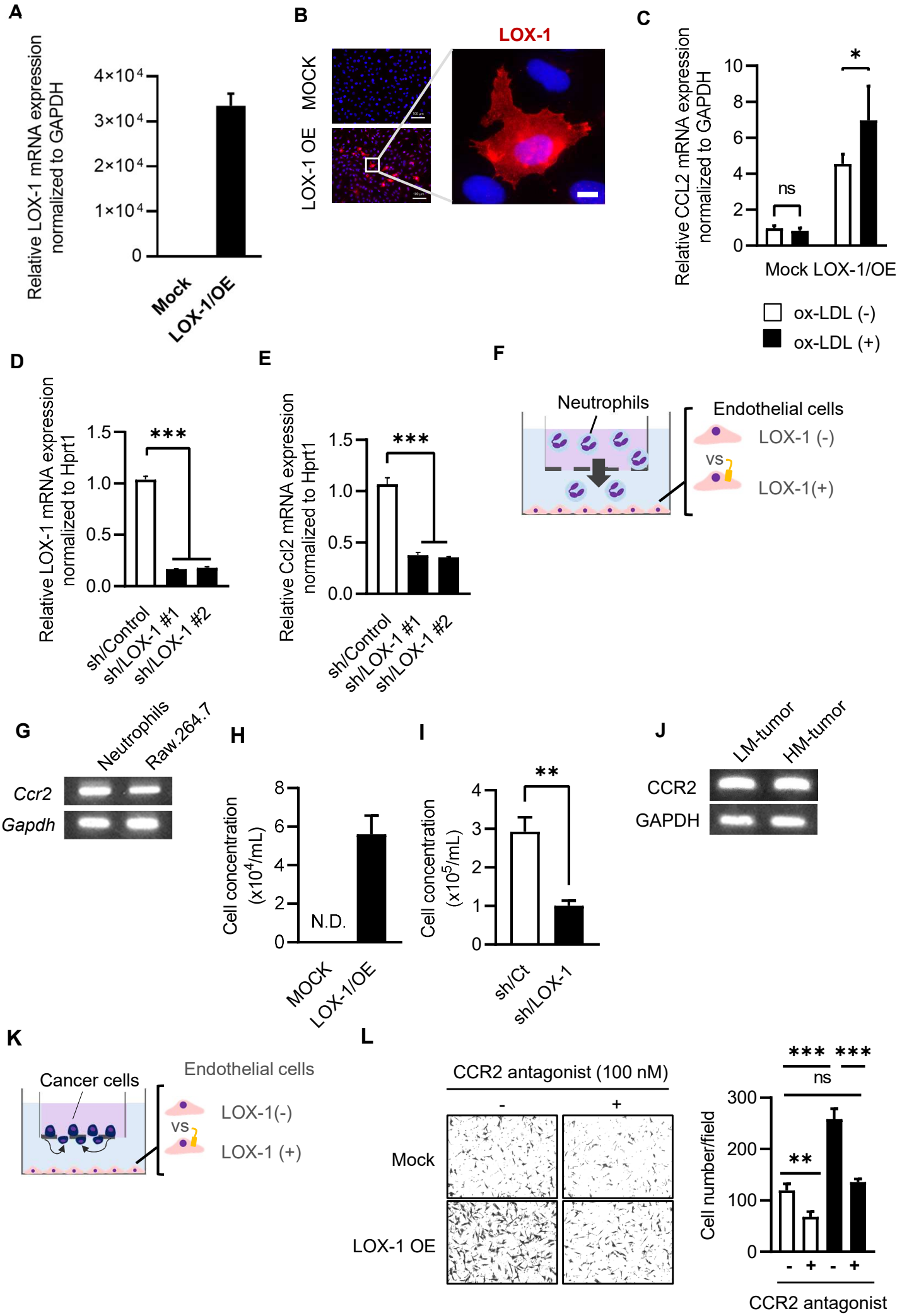

A
Relative LOX-1 mRNA expression normalized to GAPDH
4×10⁴
3×10⁴
2×10⁴
1×10⁴
0
Mock
LOX-1/OE
B
LOX-1
MOCK
LOX-1 OE
C
Relative CCL2 mRNA expression normalized to GAPDH
10
8
6
4
2
0
ns
*
Mock LOX-1/OE
ox-LDL (-)
ox-LDL (+)
D
Relative LOX-1 mRNA expression normalized to Hprt1
1.5
1.0
0.5
0.0
***
sh/Control
sh/LOX-1 #1
sh/LOX-1 #2
E
Relative Ccl2 mRNA expression normalized to Hprt1
1.5
1.0
0.5
0.0
***
sh/Control
sh/LOX-1 #1
sh/LOX-1 #2
F
Neutrophils
Endothelial cells
LOX-1 (-)
vs
LOX-1(+)
G
Neutrophils
Raw.264.7
Ccr2
Gapdh
H
Cell concentration (x10⁴/mL)
8
6
4
2
0
N.D.
MOCK
LOX-1/OE
I
Cell concentration (x10⁵/mL)
4
3
2
1
0
**
sh/Ct
sh/LOX-1
J
LM-tumor
HM-tumor
CCR2
GAPDH
K
Cancer cells
Endothelial cells
LOX-1(-)
vs
LOX-1 (+)
L
CCR2 antagonist (100 nM)
-
+
Mock
LOX-1 OE
Cell number/field
300
200
100
0
***
***
ns
**
- + - +
CCR2 antagonist

Figure 7

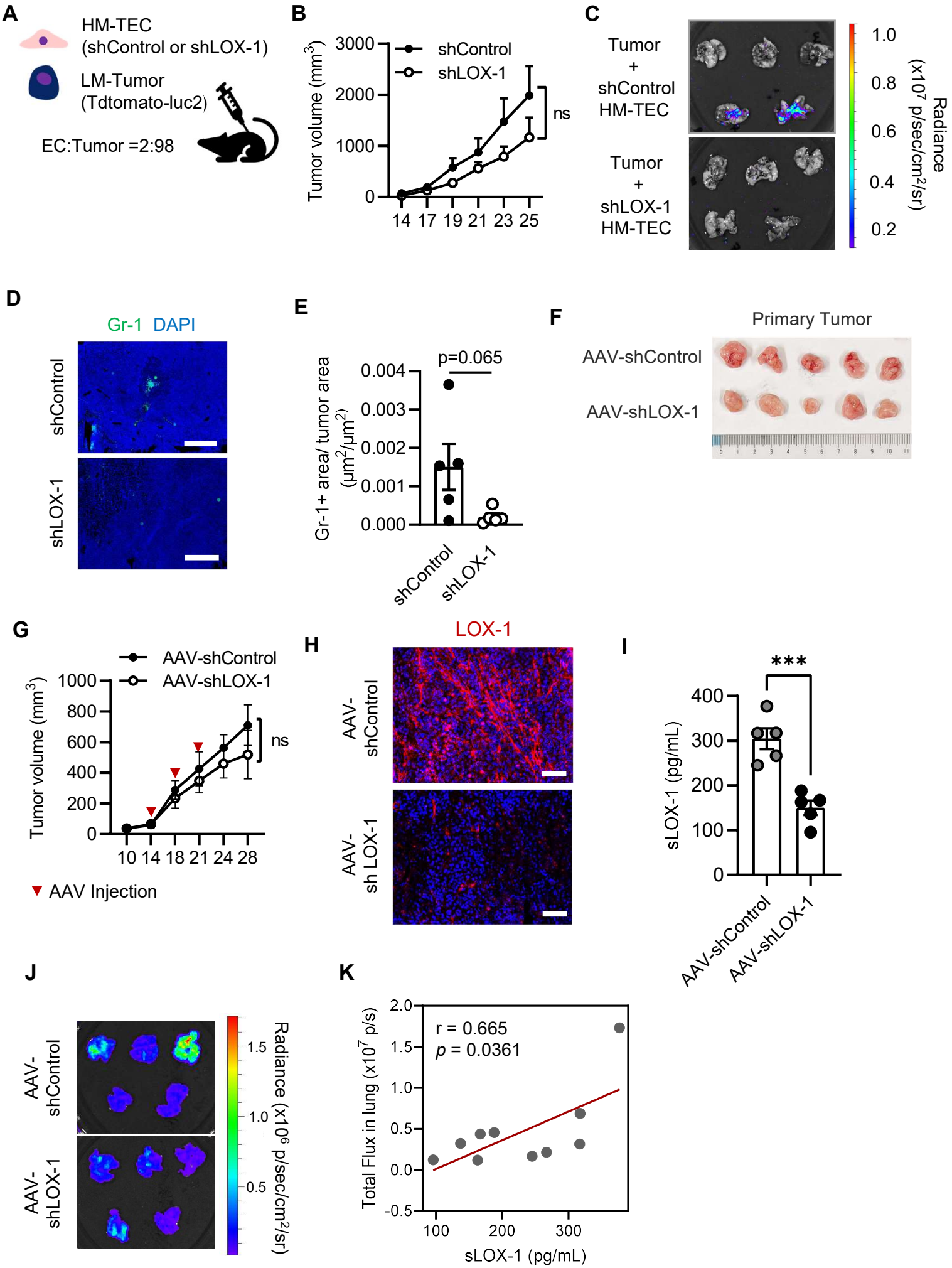
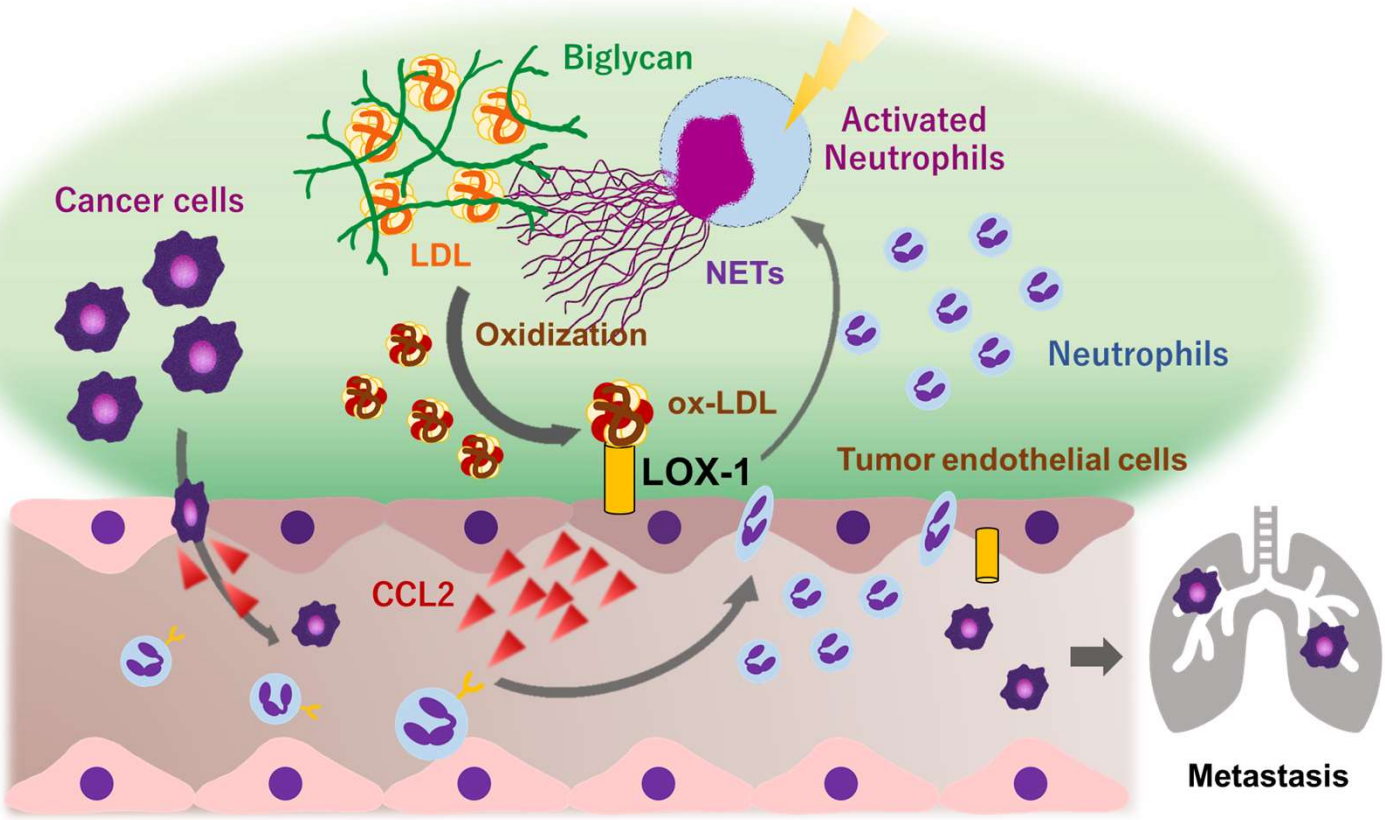

A
HM-TEC
(shControl or shLOX-1)
LM-Tumor
(Tdtomato-luc2)
EC:Tumor =2:98
B
Tumor volume (mm3)
shControl
shLOX-1
ns
C
Tumor + shControl HM-TEC
Tumor + shLOX-1 HM-TEC
Radiance (x10^7 p/sec/cm2/sr)
D
Gr-1 DAPI
shControl
shLOX-1
E
Gr-1+ area/ tumor area (μm2/μm2)
p=0.065
F
Primary Tumor
AAV-shControl
AAV-shLOX-1
G
AAV-shControl
AAV-shLOX-1
Tumor volume (mm3)
ns
AAV Injection
H
LOX-1
AAV-shControl
AAV-sh LOX-1
I
***
sLOX-1 (pg/mL)
AAV-shControl
AAV-shLOX-1
J
AAV-shControl
AAV-shLOX-1
Radiance (x10^6 p/sec/cm2/sr)
K
r = 0.665
p = 0.0361
Total Flux in lung (x10^7 p/s)
sLOX-1 (pg/mL)

Figure 8



Cancer cells: がん細胞、ox-LDL: 酸化LDL、Neutrophils: 好中球、 Metastasis: 転移、
Tumor endothelial cells: 腫瘍血管内皮細胞、NETs: 好中球細胞外トラップ