HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肺癌におけるbiglycanの発現解析とバイオマーカーとしての可能性についての研究
Author(s)	森本，浩史
Description	配架番号：2747
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15481号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15481
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90069
Type	doctoral thesis
File Information	MORIMOTO_Hirofumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

肺癌におけるbiglycanの発現解析とバイオマーカーとしての可能性についての研究

(Studies on biglycan as a possible marker for lung cancer)

2023年3月

北　海　道　大　学

森　本　　浩　史

学　位　論　文

肺癌におけるbiglycanの発現解析とバイオマーカーとしての可能性についての研究

(Studies on biglycan as a possible marker for lung cancer)

2023年3月

北　海　道　大　学

森　本　　浩　史

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 ･････････　１頁
要旨 ･････････････････････････････････　３頁
略語表 ･････････････････････････････････　６頁
緒言 ･････････････････････････････････　７頁
方法 ･････････････････････････････　１３頁
結果 ･････････････････････････････････　２０頁
考察 ･････････････････････････････････　３４頁
結論 ･････････････････････････････････　３９頁
謝辞 ･････････････････････････････････　４０頁
利益相反 ･････････････････････････････　４１頁
引用文献 ･････････････････････････････　４２頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

Hirofumi Morimoto, Yasuhiro Hida, Nako Maishi, Hiroshi Nishihara, Yutaka Hatanaka, Cong Li, Yoshihiro Matsuno, Toru Nakamura, Satoshi Hirano, Kyoko Hida.

Biglycan, tumor endothelial cell secreting proteoglycan, as possible biomarker for lung cancer.

Thoracic Cancer. 12, 1347-1357, (2021)

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 森本浩史，間石奈湖，樋田泰浩，西原広史，畑中　豊，松野吉宏，中村　透，平野　聡，樋田京子
   肺癌症例における腫瘍血管内皮マーカーbiglycanの発現解析
   第5回がんと代謝研究会 in 札幌，2017. 7. 14. 札幌

2. 森本浩史，間石奈湖，畑中　豊，松野吉宏,平野　聡，樋田京子
   肺癌症例における腫瘍血管内皮マーカーbiglycanの発現解析
   第26回日本がん転移学会学術集会，2017. 7. 28. 大阪

3. Hirofumi Morimoto, Nako Maishi, Yasuhiro Hida,Hiroshi Nishihara, Yutaka Hatanaka, Yoshihiro Matsuno,Toru Nakamura, Satoshi Hirano, Kyoko Hida
   The analysis of tumor endothelial cell marker; biglycan expression level in human lung cancer
   The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, 2017. 9. 30, Yokohama, Japan

4. 森本浩史，間石奈湖，樋田泰浩，西原広史，畑中　豊，松野吉宏，中村　透，平野　聡，樋田京子
   肺癌症例における腫瘍血管内皮マーカーbiglycanの発現解析
   第116回北海道癌談話会，2017. 12. 20. 札幌

5. 森本浩史，間石奈湖，樋田泰浩，西原広史，畑中　豊，松野吉宏，中村透，平野　聡，樋田京子
肺癌症例における腫瘍血管内皮マーカーbiglycanの発現解析
第8回IGM研究交流会，2017．10．21．札幌

6. Hirofumi Morimoto, Nako Maishi, Yasuhiro Hida, Hiroshi Nishihara, Yutaka Hatanaka, Yoshihiro Matsuno, Toru Nakamura, Satoshi Hirano, Kyoko Hida
Biglycan tumor endothelial cell secreting proteoglycan, as possible biomarker for lung cancer
2018 AACR Annual Meeting, 2018. 4. 16, Chicago, Illinois, USA

7. 森本浩史，間石奈湖，樋田泰浩，西原広史，畑中　豊，松野吉宏，中村透，平野　聡，樋田京子
肺癌症例における腫瘍血管内皮マーカーbiglycanの発現解析
第107回日本病理学会総会，2018．6．20．札幌

要旨

【背景と目的】

腫瘍血管は癌細胞への酸素や栄養の供給に重要な役割を果たしている。腫瘍血管は正常血管と比べて形態学的に異常があることは広く知られていたが、近年、腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞(Tumor Endothelial Cell：TEC)も正常血管内皮細胞(Normal Endothelial Cell：NEC)と比較し様々な異常性や多様性があることが報告されてきた。当研究室ではNECよりもTECでより高度に発現するいくつかの分子を特定し、その分子の一つとして、Biglycan (BGN)に着目した。BGNはプロテオグリカンで、低分子ロイシンに富んだ特徴的な配列を含んだ40kDa前後のコアタンパクに、二本のコンドロイチン硫酸またはデルマタン硫酸鎖を側鎖に持つ分子である。BGN は通常、マクロファージや線維芽細胞から分泌され、骨格筋・骨・軟骨の細胞外マトリックスに存在している。マクロファージのTLR2/4やP2X7受容体に結合し、炎症を惹起することからダメージ関連分子パターン(Damage associated molecular patterns: DAMPs)の一つとされており、炎症以外に組織の線維化や骨形成にも関与することが知られている。近年、多くの種類の癌腫において腫瘍組織中のBGN発現が亢進していることや血中BGN濃度が高いことなどが報告されており、一部の癌腫では腫瘍細胞を含めた腫瘍組織全体におけるBGN遺伝子の発現亢進が、癌の進行度や患者の予後不良に関連するとの報告がある。しかし、がん微小環境におけるBGN発現や癌の進展との関係などについての報告はほとんどない。

申請者が所属する研究室では、NECと比較しTECでBGN発現が亢進していること、BGNが分泌蛋白であることを明らかにした。また、TECから分泌されたBGNが腫瘍細胞の遊走を促進し、腫瘍細胞の血管内侵入および転移促進に働くことを明らかにした。さらに、これまで数例の結腸癌や肝細胞癌の臨床検体を用いて、健常者よりも担癌患者の血中BGN濃度は高く、その中でも遠隔転移を有する症例においてBGNが高く検出されていることを明らかにした。また、免疫組織染色により、これらの血中BGNはTEC由来であることを確認した。これらの結果から、TECにおけるBGN高発現が癌の悪性度と相関する可能性が示唆された。

肺癌は長い間、多くの国でがんによる死亡の主な死因となっている。非小細胞肺癌患者は、組織型や臨床病期に従って外科的治療や化学療法などの治療が行われる。CTですりガラス状陰影 (Ground-Glass Opacity: GGO)を含む非小細胞肺癌は、良好な生存期間や腫瘍の低悪性度と相関することが知られており、これらの症例は区域切除や部分切除などのより低侵襲な縮小手術の適応が検討されてきている。しかし、術前CT検査で小さなGGOを認めても、その増大を待ってから治療に移行することも多く、手術適応や縮小手術の適応を判断するための悪性度の指標が必要とされている。

本研究では肺癌臨床検体を用いて、腫瘍血管におけるBGN発現や癌の進展度および

患者の予後との関係を解析した。また、肺癌患者の術前血中 BGN 濃度と腫瘍血管における BGN 発現との関係を解析し、術前血中 BGN 濃度と肺癌の悪性度との関係から BGN の治療選択のバイオマーカーとしての可能性について評価した。

【材料と方法】

北海道大学病院循環器・呼吸器外科にて手術を施行された肺癌患者 155 症例の手術標本を用いて、腫瘍組織中の BGN 陽性血管の割合と各種臨床病理学的因子および予後との関係を解析した。切除腫瘍組織検体を用いて血管内皮細胞マーカーである CD31 と BGN の免疫染色を連続切片で行った。次に腫瘍組織内で CD31 陽性血管を多く含むホットスポットにおける CD31 陽性血管と BGN 陽性血管の数を計測し、BGN 陽性血管の割合を解析した。

次に、手術を施行された別の肺癌患者 46 症例を対象とし、術前血中 BGN 濃度を ELISA 法で解析し、術前血中 BGN 濃度と腫瘍血管における BGN 発現との関係を解析した。

【結果】

155 症例の肺癌患者の腫瘍血管における BGN 発現は組織型が扁平上皮癌を示す症例や T 因子が T3 以上の症例で有意に高いことが明らかとなった。腫瘍血管における BGN 発現と全生存率ならびに無再発生存率との関係解析では、BGN 高発現群で全生存期間および無再発生存期間ともに有意に短かった。予後予測因子の解析では、単変量解析により腫瘍血管における BGN 発現は予後不良と相関関係を認めたが、多変量解析では独立した予後予測因子とはならなかった。

別の 46 症例の肺癌患者の術前血中 BGN 濃度は同症例の腫瘍血管における BGN 発現と有意な相関関係を認めた。

健常者・GGO 病変を伴う肺腺癌患者・GGO 病変を伴わない肺腺癌患者・腺癌以外の肺癌患者の 4 群間で血中 BGN 濃度を比較した。GGO 病変を伴う肺腺癌患者群では、GGO 病変を伴わない肺腺癌患者群や腺癌以外の肺癌患者群と比較すると血中 BGN 濃度が有意に低かった。

【考察】

最近、BGN は多くの種類の癌腫において患者の予後や癌の進行に関連していることが報告されている。しかし、がん微小環境における BGN 発現と患者予後や血中 BGN 濃度との関係についての報告は未だなく、本研究では肺癌の腫瘍血管における BGN 発現と予後や肺癌患者の術前血中 BGN 濃度との関係について解析した。肺癌の腫瘍血管における BGN 高発現は予後不良と関係し、術前血中 BGN 濃度は腫瘍血管における BGN 発現を反映している可能性が示唆された。また、悪性度が低く予後良好とされる GGO 伴

う肺腺で術前血中 BGN 濃度がより低いことから、術前血中 BGN 低濃度が肺腺癌の低悪性度の指標となる可能性が示唆された。

CT 検査で pure-GGO を伴う孤立性肺腺癌の患者に対して完全切除を行った場合、疾患特異的 5 年生存率が 100%であることが複数の研究で示されている。しかし、実際には CT 検査で数 mm 程度の小さな GGO を認めた場合、良悪の判定は困難であり病変の増大を確認してから治療に移行することがある。病変増大の確認には頻回な CT 検査が必要になり患者の放射線被爆や高額な医療費などの問題がある。本研究により、比較的簡便で低侵襲な方法により測定された血中 BGN 濃度が肺腺癌患者の手術適応の時期や術式選択などの決定に役立つ可能性が考えられた。

本研究では、肺癌臨床検体の免疫染色で腫瘍血管以外に線維組織中にも BGN 陽性所見を認めた。肺癌以外の一部の癌腫では腫瘍組織中の線維芽細胞における BGN 発現が腫瘍の進行や予後不良と関与することが報告されており、本研究で認められた肺癌組織中の線維組織における BGN 発現についても解析が行う必要がある。

【結論】

肺癌の腫瘍血管における BGN 発現は患者の予後不良と関係していた。また、術前血中 BGN 濃度は腫瘍血管における BGN 発現と相関し、肺腺癌の悪性度と相関を認めたことから、BGN が肺腺癌のフォローアップや治療選択のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中に使用した略語は以下の通りである。

ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin motif
BGN	biglycan
BMP-1	bone morphogenetic protein-1
CAF	cancer associated fibroblast
CEA	carcinoembryonic antigen
CRP	c-reactive protein
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DSCR-1	down syndrome critical region-1
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FGF-2	fibroblast growth factor-2
GGO	ground-glass opacity
HE	hematoxylin and eosin
HGF	hepatocyte growth factor
ICGC	international cancer genome consortium
MMP	matrix metalloproteinase
NEC	normal endothelial cell
NSCLC	non-small cell lung carcinoma
PlGF	placental-derived growth factor
ROS	reactive oxygen species
SCC	squamous cell carcinoma
SUV	standardized uptake value
TAM	tumor associated macrophage
TEC	tumor endothelial cell
TMA	tissue microarray
TLR	toll-like receptor
TSP-1	thrombospoidins-1
VEGF	vascular endothelial growth factor

緒言

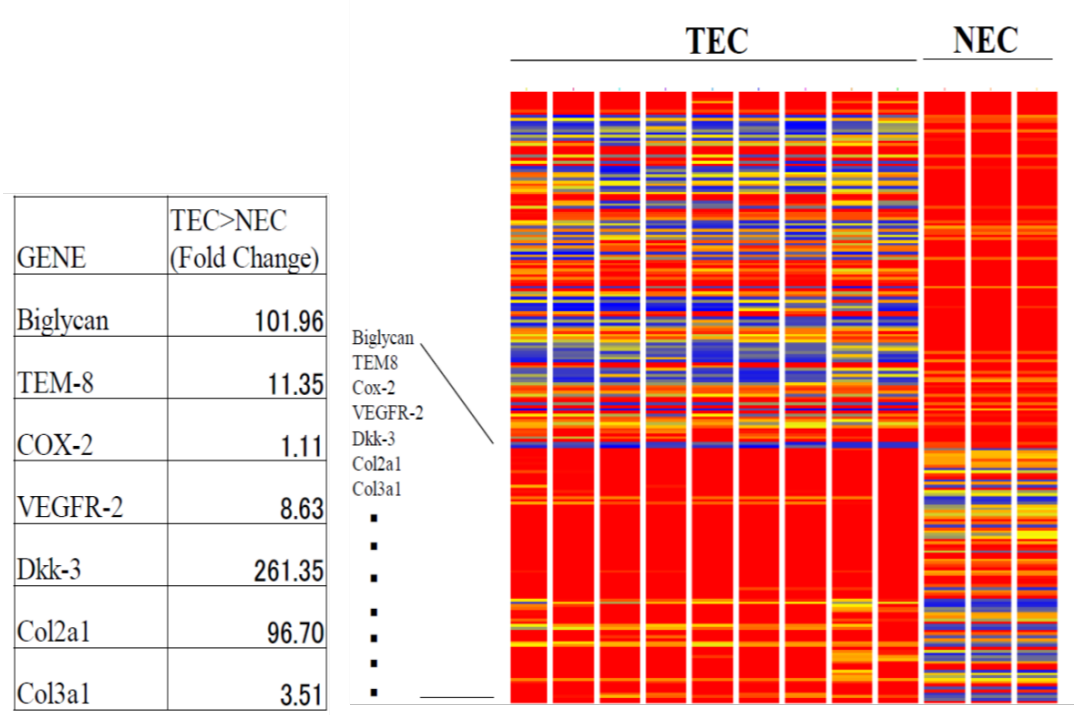
癌は腫瘍細胞と微小環境を構成する間質細胞により構成され、腫瘍微小環境はマクロファージなどの骨髄由来細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、間質を埋める細胞外基質などで構成される。そして、腫瘍の増殖・進展・転移などは腫瘍細胞が持つ特性だけでなく、腫瘍細胞とがん微小環境との相互作用によって制御されている (Hanahan et al., 2011; Yuan et al., 2016)。例えば、腫瘍微小環境のマクロファージや線維芽細胞はそれぞれ、腫瘍関連マクロファージ(Tumor Associated Macrophage: TAM)や癌関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast: CAF)として働き、種々の増殖因子、血管新生因子などを分泌し、癌の増殖浸潤を促進することが知られている(Li et al., 2007; Erez et al., 2010)。このため、腫瘍細胞と腫瘍微小環境の相互作用に関する研究は近年のがん研究の大きなトピックの１つとなっている。

腫瘍血管新生は癌の進展や転移に必須であり、腫瘍微小環境の重要な構成成分の 1 つである。血管新生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(Folkman et al., 2007)。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り、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。成体で起こる血管新生は、癌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分泌された血管新生因子により誘導される。腫瘍血管は腫瘍に酸素と栄養を供給することで、腫瘍の進展を促進したり転移の経路を提供したりすることが知られており、腫瘍血管新生は，腫瘍の進展や転移に重要な役割を果たしている(Folkman et al., 2002)。腫瘍血管新生は腫瘍細胞だけでなく、間質からも血管新生因子が分泌され誘導されることが分かってきたが、これらの因子として血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)の他に線維芽細胞増殖因子-2(Fibroblast Growth Factor-2: FGF-2)、アンジオポエチン(Angiopoietins: Ang)、肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor: HGF)、上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: EGF)、胎盤増殖因子(Placental-derived Growth Factor:PlGF)などが報告されている(Bergers et al., 2003)。さらに、がん微小環境では内因性の血管新生阻害因子エンドスタチン、トロンボスポンジン-1(Thrombospoidins-1: TSP-1)やネガティブ制御因子として Vasohibin(Abe et al., 2001)や Down syndrome critical region-1(DSCR-1)(Minami et al., 2004)なども分泌されており、腫瘍血管新生はこれらの複数の血管新生因子と血管新生阻害因子のバランスによって制御されていることが明らかとなってきた。

腫瘍血管は正常血管と比べて形態学的に異常があることは広く知られている(Nagy et al., 2009)。例えば，腫瘍血管では血管内皮細胞同士の接着が疎であるだけでなく、血管内皮細胞と周皮細胞との接着も疎であり血管透過性が亢進している(Nagy et

al., 2006)。また、増殖する腫瘍細胞により腫瘍組織内の組織間圧は高くなり、血管の屈曲や湾曲など乱雑で不規則な走行、さらには血流の不均一性を引き起こしている(McDonald et al., 2003)。そのため、抗癌剤などの腫瘍細胞への供給経路も阻害されることが多い。また、血管新生が豊富であるにもかかわらず血流が少ないことら、腫瘍組織は低酸素状態となっていることが多く、この低酸素状態は癌の薬剤抵抗性獲得、放射線療法抵抗性や腫瘍細胞の上皮間葉転換による浸潤転移の増悪などの原因となり得ることが報告されている(Jain et al., 2005)。

近年、腫瘍組織中の約 1-5%程度とわずかな割合を占める腫瘍血管内皮細胞(Tumor Endothelial Cell：TEC)を分離し、それらを用いた研究が行われるようになり、腫瘍血管を構成する TEC も正常血管内皮細胞(Normal Endothelial Cell：NEC)と比較し様々な異常性や多様性があることが報告されてきた(Langenkamp et al., 2009; Ohga et al., 2012; St Croix et al., 2000)。申請者の所属する研究室では、NEC よりも TEC でより高度に発現するいくつかの分子を特定し(Muraki et al., 2012; Osawa et al., 2013; Hida et al., 2016)、その分子の一つとして、NEC と比較して TEC では Biglycan (BGN)の発現が亢進していることを報告してきた(Yamamoto et al., 2012)(図 1)。



GENE	TEC>NEC (Fold Change)
Biglycan	101.96
TEM-8	11.35
COX-2	1.11
VEGFR-2	8.63
Dkk-3	261.35
Col2a1	96.70
Col3a1	3.51

図 1　DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析 (mouse-EC)
TEC は NEC よりも BGN の発現が高い。

BGN はプロテオグリカンで、低分子ロイシンに富んだ特徴的な配列を含んだ 40kDa 前後のコアタンパクに、二本のコンドロイチン硫酸またはデルマタン硫酸鎖を側鎖に持つスモールロイシンリッチプロテオグリカン(Small Leucine-Rich Proteoglycan: SLRP)である(Schaefer et al., 2008)(図 2)。BGN は通常、マクロファージや線維芽細胞から分泌され、骨格筋・骨・軟骨・腱などの種々の細胞外マトリックスに存在し、組織の線維化や骨形成に関与するとされる(Westermann et al., 2008; Babelova et al., 2009; Mohan et al., 2010)。マクロファージや線維芽細胞などから分泌され細胞外マトリックスに結合した BGN は、matrix metalloproteinase (MMP)/ a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin motif (ADAMTS)/ bone morphogenetic protein-1(BMP1)/GranzymeB などの酵素により細胞や基質から切り離され、血中や標的細胞の受容体へ遊離するとされる(Hsieh et al., 2014)。また、ストレスや損傷による組織障害や細胞死などに伴って細胞外マトリックスから切り離された BGN は、ダメージ関連分子パターン(damage associated molecular patterns; DAMPs)として機能し炎症を惹起することが知られている (Moreth et al., 2014)(図 3)。腎臓の炎症性疾患では、BGN がマクロファージ上に発現した Toll 様受容体(Toll-Like Receptor : TLR)2/4 や P2X7 受容体を介して、MAPK(mitogen-activated protein kinase)p38、ERK(Extracellular signal regulated kinase)、NF-κB(Nuclear factor-κB)を活性化し、TNF-α(Tumor necrosis factor-α)、CXCL-(Chemokine C-X-C motif ligand)2、CXCL13 などの様々なサイトカインやケモカインを産生している(Hsieh et al., 2014; Moreth et al., 2014; Roedig et al., 2019)。

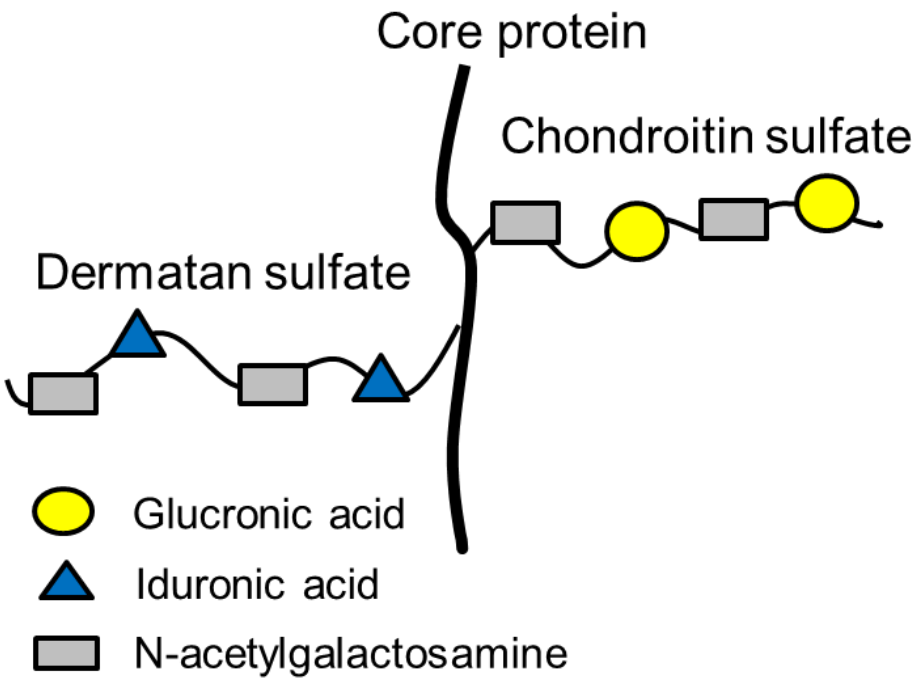


図 2　BGN の分子構造
40kDa 前後のコアタンパクに二本のコンドロイチン硫酸またはデルマタン硫酸鎖を側鎖に持つスモールロイシンリッチプロテオグリカンの 1 つ。

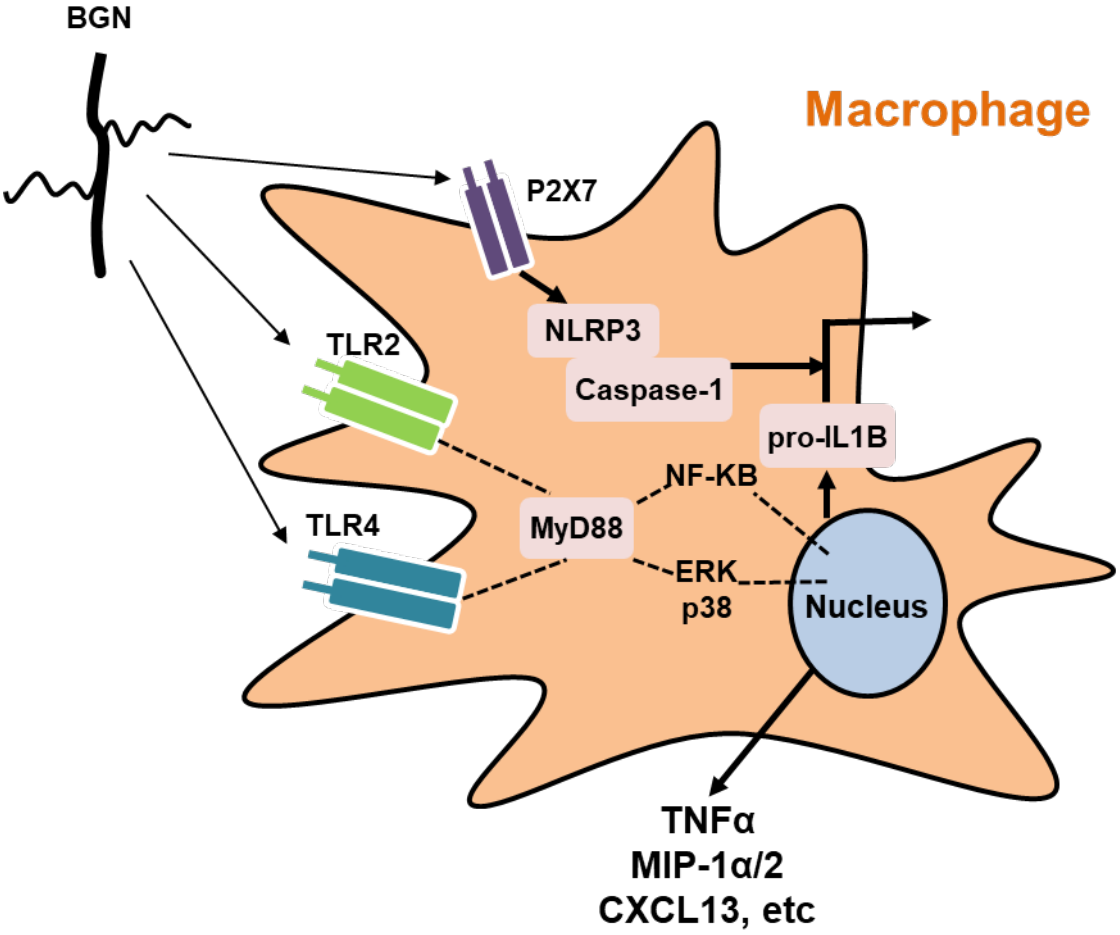


図 3　BGN の機能
TLR2/4 や P2X7 受容体を介して様々な炎症サイトカインの誘導に関与する。

申請者の所属する研究室ではこれまで、BGN が Toll 様受容体を介した NF-κB および ERK シグナル伝達の活性化により腫瘍細胞の遊走を促進し、腫瘍細胞の血管内侵入および転移促進に働くことを明らかにした(Maishi et al., 2016)。また、BGN は in vivo でヒトおよびマウスの腫瘍血管で強く発現し、担癌患者の血中に分泌されていることも報告した(Yamamoto et al., 2012)。また、いくつかのヒト腫瘍細胞における BGN の発現も報告されている。例えば、胃癌細胞における BGN の発現亢進は、FAK シグナル伝達経路を活性化することにより腫瘍細胞の浸潤能を亢進すること(Hu et al., 2014)や、結腸癌細胞における BGN の発現亢進が ERK シグナル伝達経路を介して VEGFA の発現を亢進し、腫瘍血管新生を促進し腫瘍を増大させること(Xing et al., 2015)などが報告されている。さらに、食道癌、胃癌、結腸癌、膵臓癌、子宮内膜癌、前立

腺癌などの多くの種類の上皮癌において、腫瘍組織中のBGN発現亢進や血中のBGN濃度上昇が報告されており、一部の癌腫では、腫瘍細胞を含めた腫瘍組織中のBGN遺伝子の発現亢進や血中のBGN高濃度が、癌の進行度や患者の予後不良に関連するとの報告もある(Chambers et al., 2002; Wang et al., 2011; Gu et al., 2012; Aprile et al., 2013; Liu et al., 2014; Jacobsen et al., 2017)。しかし、TECを含めたがん微小環境におけるBGN発現やその役割、癌の進展との関係などについての報告はほとんどない。

悪性腫瘍全体で肺癌の発生頻度は世界で1番多く、新規に年間約1,825,000件の肺癌が生じ、死亡数は約1,590,000件である(Ferlay et al., 2015)。本邦では、2018年の1年間の推定罹患数は約122,000件、死亡数は約74,300件となっており、死亡数は悪性腫瘍全体で最も多い。組織型によって、小細胞肺癌(Small Cell Lung Carcinoma: SCLC)と非小細胞肺癌(Non-Small Cell Lung Carcinoma: NSCLC)に分けられ、NSCLCには腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌が含まれる。NSCLC患者は、組織型や臨床病期に従って外科的治療や化学療法などの治療が行われる(Kozower et al., 2013)。コンピュータ断層撮影 (Computed Tomography: CT)ですりガラス状陰影 (Ground-Glass Opacity: GGO)を含み、FDG-PET検査でのStandardized Uptake Valueの最大値(SUVmax)の低いNSCLCは、良好な生存期間や腫瘍の低悪性度と相関することが知られている(Asamura et al., 2003; Domen et al., 2013)。したがって、GGO病変を伴う腫瘍やSUVmax値の低い症例では、肺葉切除や肺全摘除術ではなく、区域切除や部分切除などの縮小手術の適応が検討されている(Tsutani et al., 2014)。これらの縮小手術は、手術関連合併症の軽減、死亡率低下、手術侵襲からの早期の回復、および肺機能の温存などに寄与している(Salati et al., 2013)。そのため、根治性を損なうことなく、縮小手術が適応可能な低悪性度病変を判定するための指標が求められている。

申請者の所属する研究室では、これまで数例の結腸癌や肝細胞癌の臨床検体を用いて、健常者よりも担癌患者の血中BGN濃度は高く、その中でも転移症例においてBGNが高く検出されていることを明らかにした。また免疫組織染色により、これらの血中BGNがTEC由来であることも確認した(Maishi et al., 2016)。これらの結果から、TECにおけるBGNの発現亢進が癌の悪性度と相関する可能性が示唆された。

そこで本研究では、肺癌臨床検体を用いて肺癌腫瘍血管におけるBGN発現や癌の悪性度との関係を解析した。また、肺癌患者の術前血中BGN濃度を測定し、血中BGN発現と腫瘍血管におけるBGN発現との関係を解析することで、BGNが肺癌の悪性度のバイオマーカーとして有用であるかについて評価した。

実験方法

BGN 免疫組織染色法

申請者の所属する研究室では、これまで凍結切片を用いた蛍光免疫染色による腫瘍血管における BGN 発現解析は行ってきた。しかし、臨床検体を用いた組織中の BGN の発現解析を行うにあたり、解剖学的な位置関係の解析などには蛍光抗体法よりも酵素抗体法の方が優れていると考え、酵素抗体法を用いた免疫組織染色で解析を行う方針とした。しかし、これまで使用していた BGN 抗体では酵素抗体法による染色で特異的な染色像が得られなかったため、新たな抗体を選別し、パラフィン包埋ブロックを用いた酵素抗体法の染色プロトコールを検討した。

凍結切片を用いた抗 CD31 抗体と抗 BGN 抗体による蛍光二重免疫染色により、腫瘍血管における BGN 発現が確認されている A375SM マウス皮下移植腫瘍組織のパラフィン包埋ブロックを用いて染色方法の検討を行った。

切片をキシレンで脱パラフィン、段階的にアルコールで再水和した。内因性ペルオキシダーゼ活性は 0.5% 過酸化水素を用いて室温で 10 分間行った。BGN 染色では Tris-EDTA 緩衝液またはクエン酸緩衝液を用いて 95℃温浴槽で 30 分間または 121℃オートクレーブで 20 分間の抗原賦活化処理を行った。CD31 染色では Tris-EDTA 緩衝液を用いて 95℃温浴槽で 30 分間抗原賦活化処理を行った。次に、5% ヤギ血清/PBS で 60 分ブロッキング処理をした。BGN 染色では一次抗体として 1:100 に希釈した抗 BGN ウサギポリクローナル抗体 (abcam, #49701, UK)を用い、CD31 染色では一次抗体として 1:400 に希釈した抗ヒト CD31 ウサギポリクローナル抗体 (Abcam, ab28364, USA)を用い、4℃下で 24 時間反応させた。その後、それぞれ 1:100 に希釈した抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (DAKO, #P0448, USA)を用い室温で 60 分反応させた。その後、3,3`-diaminobenzidine (DAKO, K3468, USA)で発色し、ヘマトキシリン溶液 (Wako, Japan)で対比染色を行った。最後に脱水，透徹を行い封入処理した。しかし、組織特異的な染色像は得られなかった。

次に一次抗体として 1:100 に希釈した抗 BGN ウサギポリクローナル抗体 (Proteintech, #16409-1-AP, USA)を用い、抗原賦活化において Tris-EDTA 緩衝液またはクエン酸緩衝液を用いた加熱処理法に加え、ペプシン (DAKO, S3002, USA)・トリプシン (ニチレイバイオサイエンス, 415231, Japan)・プロテアーゼ (ニチレイバイオサイエンス, 415101, Japan)などを用いた酵素処理法についても検討した。その結果、ペプシンを用いた抗原賦活化により CD31 陽性血管や腫瘍間質内に特異的な BGN 発現を認めた (図 4A)。

ヒトの組織検体でも染色可能なことを確認するため、医師主導自主臨床研究 (自 009-0148「腫瘍血管内皮細胞の特異的マーカーの同定」)のプロトコールに従い、同意書を事前に取得した患者の手術検体を用いた。凍結切片を用いた蛍光免疫染色により、

腫瘍血管におけるBGN発現が確認されているヒト大腸癌の手術検体のパラフィン包埋ブロックを用いて検討した。染色法はマウス組織と同様に行った。その結果、ヒト大腸癌組織において、マウス組織と同様に CD31 陽性血管や腫瘍間質内の線維組織と思われる部位に一致して特異的なBGN発現を認めた（図4B)。

最後に抗BGN抗体の適正な希釈濃度およびブロッキング剤の検討を行った。希釈濃度は100倍、200倍、500倍、1000倍に分け、ブロッキング剤として5% ヤギ血清または1% ウシ血清由来アルブミン+10% ヤギ血清+0.3Mグリシンを用いて検討した結果、抗体濃度を 100 倍希釈としブロッキング剤は 1%　ウシ血清由来アルブミン+10%　ヤギ血清+0.3Mグリシンを用いると良好な染色像が得られることが分かった。

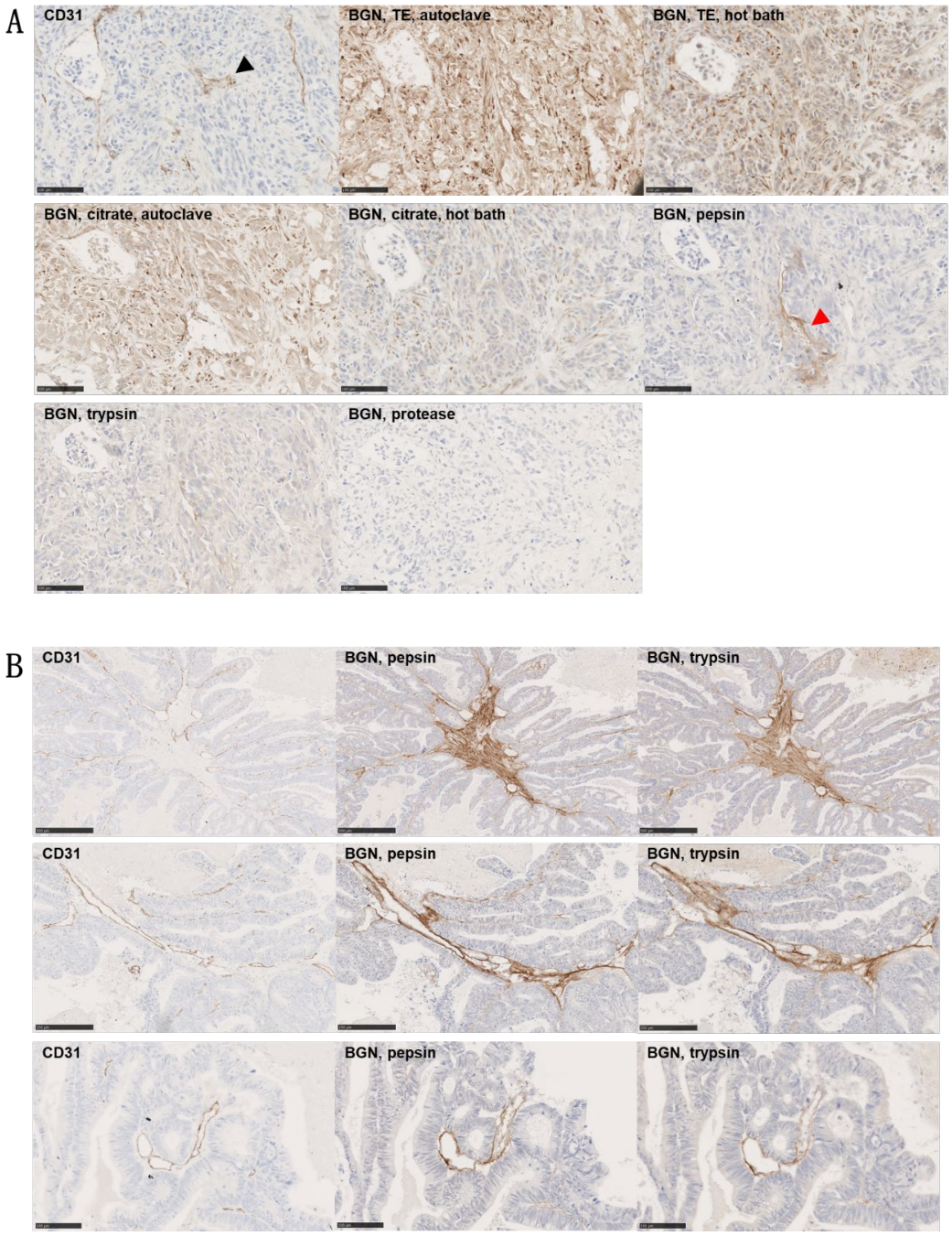


図 4　BGN 免疫組織染色法の検討（A: A375SM マウス皮下移植腫瘍組織, B：ヒト大腸癌腫瘍組織）

Pepsin および Trypsin を用いた抗原賦活化により CD31 陽性血管や腫瘍間質内の線維組織と思われる部位に特異的な BGN 陽性所見を認めた。

黒矢頭; CD31 陽性腫瘍血管, 赤矢頭; BGN 陽性腫瘍血管. A; Scale bar, 100μm. B; Scale bar, 上段/中段 250μm, 下段 100μm

組織マイクロアレイ（Tissue Microarray：TMA)解析

2004 年から 2009 年の間に北海道大学病院循環器・呼吸器外科にて手術を施行された肺癌患者の内､放射線治療や化学療法を受けていない 155 症例の手術標本を用いた。対象患者は術後最初の 2 年間は 3-6 か月毎に血液検査及び CT 検査を行い、以後は 6-12 か月毎に検査を行いフォローアップした。診療記録から以下の臨床病理学的因子：年齢、性別、喫煙歴、術前腫瘍マーカー（CEA/SCC)、組織型、TNM 分類、リンパ管浸潤、血管浸潤、胸膜浸潤、Staging、術後再発の有無などを解析した。

組織 TMA ブロックは JF-4 組織マイクロアレイヤー（パソロジー研究所）を用いて、各症例 2 視野ずつコア径 1.5mm の大きさで作製した、ブロックを 5μm に薄切し切片を作製した。

免疫組織染色

臨床研究（自 012-0413「ヒト肺腫瘍における分子標的治療の効果予測因子と新規分子標的の探索研究」、および自 015-0423「腫瘍血管細胞による血管新生阻害物質のスクリーニング」)のプロトコールに従い､同意書を取得した患者の病理標本を用い､BGN と血管内皮マーカーとして CD31 および CD34 の免疫組織染色を施行した。切片をキシレンで脱パラフィン、段階的にアルコールで再水和した。内因性ペルオキシダーゼ活性は 0.5% 過酸化水素を用いて室温で 10 分間行った。BGN 染色ではペプシン（DAKO, Japan)を用いて 37℃下で 10 分間抗原賦活化処理を行った。1% ウシ血清由来アルブミン（Bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, USA), 10% ヤギ血清, 0.3M グリシン, 0.1% Tween/PBS で 60 分ブロッキング処理をした。CD31/CD34 染色では Tris-EDTA 緩衝液を用いて 95℃温浴槽で 30 分間抗原賦活化処理を行った後、5% ヤギ血清/PBS で 60 分ブロッキング処理をした。BGN 染色では一次抗体として 1:100 に希釈した抗 BGN ウサギポリクローナル抗体（Proteintech, #16409-1-AP, USA)を用い、CD31 染色では一次抗体として 1:400 に希釈した抗ヒト CD31 ウサギポリクローナル抗体（Abcam, ab28364, USA)を用い、CD34 染色では一次抗体として 1:500 に希釈した抗ヒト CD34 ウサギポリクローナル抗体（Abcam, ab81289, USA)を用い､4℃下で 24 時間反応させた。次にそれぞれ 1:100 に希釈した抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体（DAKO, #P0448, USA)を用い室温で 60 分反応させた。その後、3,3`-diaminobenzidine（DAKO, K3468, USA)で発色し､ヘマトキシリン溶液（Wako, Japan)で対比染色を行った。最後に脱水, 透徹を行い封入処理した。

組織内 BGN 発現解析

NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Japan)を使用して染色標本の画像をスキャンし、デジタルデータに変換して解析に用いた。TMA の腫瘍組織での BGN 発現解析では、低倍率(x10)視野内でランダムに 0.75mm^2 の大きさの領域を 2 視野選択した。TMA 以外の組織での発現解析では、低倍率(x10)視野内で CD31 陽性血管を含む 0.75mm^2 の大きさの領域をランダムに 10 視野選択し、それぞれの視野内で CD31 陽性血管数ならびに BGN 陽性血管数をカウントした(Weidner et al., 1991; Lu et al., 2010)。管腔の開いた単一の CD31 陽性となる微小血管を 1 つの血管としてカウントし、CD34 染色と比較しリンパ管でないことや単一の血管であることを確認した。そして、管腔に一致して線状に BGN 陽性所見を認める血管を BGN 陽性血管とした。各視野における CD31 陽性血管数に対する BGN 陽性血管数の割合の平均を腫瘍組織における BGN 発現として算出した。CD31 陽性血管を含む領域の選択例を図 5 に示す。

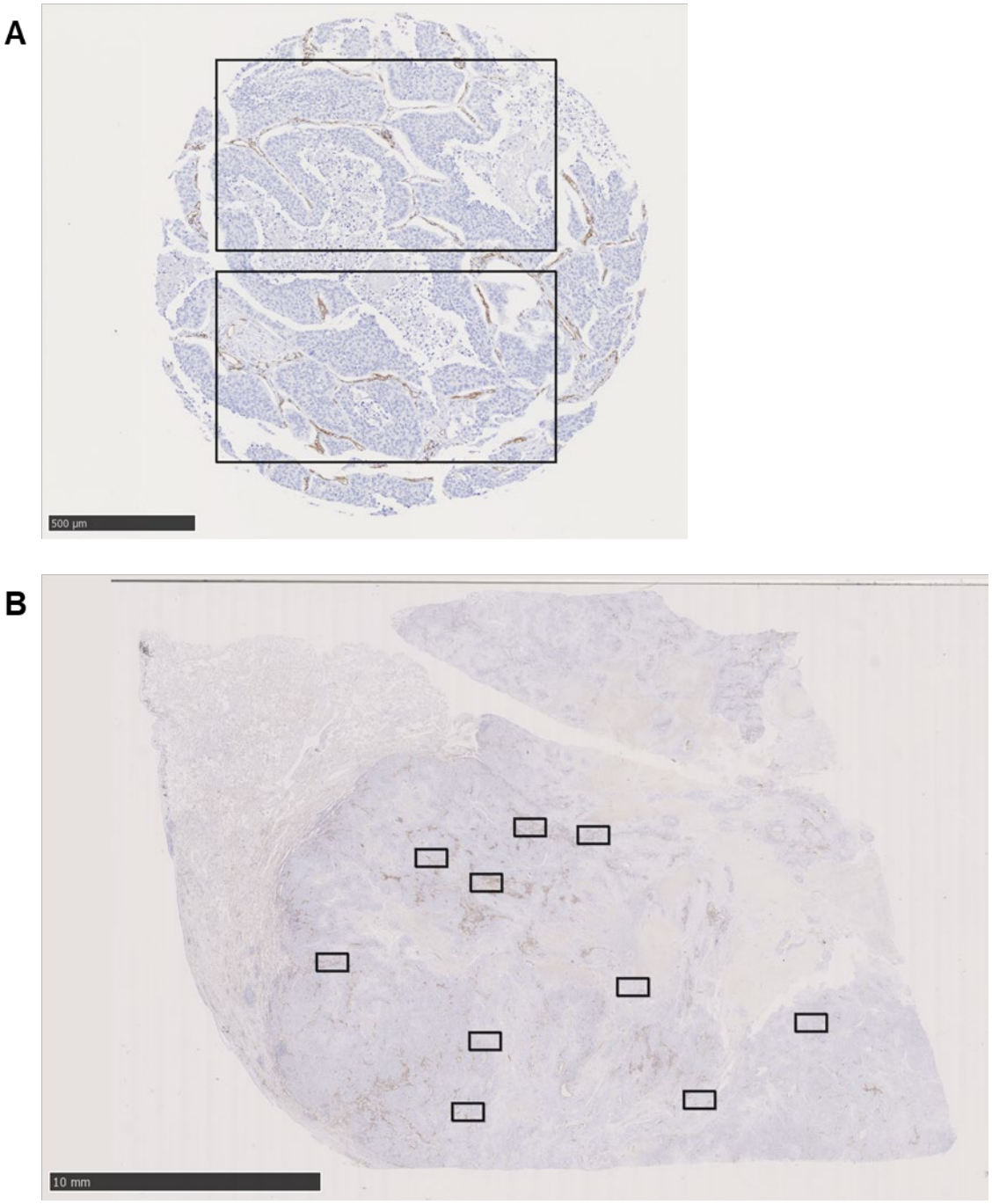


図 5　ヒト肺癌腫瘍組織を用いた CD31 陽性血管を含む領域の選択例.
低倍率(x10)視野内で CD31 陽性血管を含む 0.75mm^2 の大きさの領域をランダムに、A：TMA では 2 視野、B：TMA 以外では 10 視野を選択し、それぞれの視野内で CD31 陽性血管数ならびに BGN 陽性血管数をカウントした。
Scale bar, A：500µm / B：10mm.

血中 BGN 濃度解析

2015 年から 2017 年の間に北海道大学病院循環器・呼吸器外科にて手術を施行された肺癌患者の内、放射線治療や化学療法を受けた患者を除いた 46 症例を解析した。診療記録から以下の臨床病理学的因子：年齢、性別、喫煙歴、術前 CRP 値、術前腫瘍マーカー（CEA/SCC)、SUVmax、組織型、TNM 分類、リンパ管浸潤、血管浸潤、胸膜浸潤、術後再発の有無を解析した。

血液検体は同意書を取得した術前患者およびコントロールとして 8 名の健常者からそれぞれ 10ml ずつ採取し、4℃下で遠心分離し、血清は-80℃下で保存した。

血液検体に加えて、血液検体を採取した肺癌患者の手術標本を用いて TMA で行った方法と同様に腫瘍血管における BGN 発現を解析した。

血清中の BGN タンパク濃度を double-antibody, sandwich ELISA kit (Cloud-clone Corp, USA)を用いて製品プロトコールに従い解析した。各血清サンプルと標準溶液 100μl をそれぞれウェルに加え 37℃で 2 時間静置した。次に検出用抗体溶液 (Detection Reagent A) を 100μl 加え、37℃で 1 時間静置した。反応後、抗体溶液を除去し洗浄液で 3 回洗浄した。次に酵素標識二次抗体溶液（Detection Reagent B）を 100μl 加え、37℃で 30 分間静置した。反応後、二次抗体溶液を除去し洗浄液で 5 回洗浄した。基質溶液を 90μl 加え、37℃で 25 分間静置した。発色を確認し、反応停止液を 50μl 加え反応を止めた。Elisa プレートリーダー（Thermo Fisher Scientific, USA）で吸光度（波長 450nm)を測定し、濃度を算出した。各検体はそれぞれ 2 回解析し、その平均値を測定値とした。

統計解析

カプランマイヤー法により生存率曲線を作成しログランク検定により無再発生存および全生存の生存曲線の差を検定した。肺癌腫瘍組織内の BGN 陽性血管率により 2 群に分けた。カットオフ値の設定は、それぞれの陽性血管率において生存曲線の差における *p*-value が最小となる値とした。2 群間の統計解析には、カイ二乗検定または Fisher's 正確検定を使用した。単変量解析ならびに多変量解析には、COX 比例ハザード回帰分析を使用した。$P<0.05$ を有意差ありと判定した。統計解析には JMP Pro version12 (SAS institute, Japan)を使用した。

実験結果

肺癌臨床検体における BGN 発現解析

肺癌組織内の BGN 発現を免疫組織化学法により解析した。代表的な症例の肺癌組織における BGN 染色像を図 6 に示す。正常組織内で一般的な血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性血管に一致した BGN 陽性所見は認められなかったが（図 6A, 6B)、腫瘍組織では CD31 陽性血管に一致した BGN 陽性所見を認めた（図 6D, 6F)。また、症例によって BGN 陽性血管の割合に差があることがわかった。

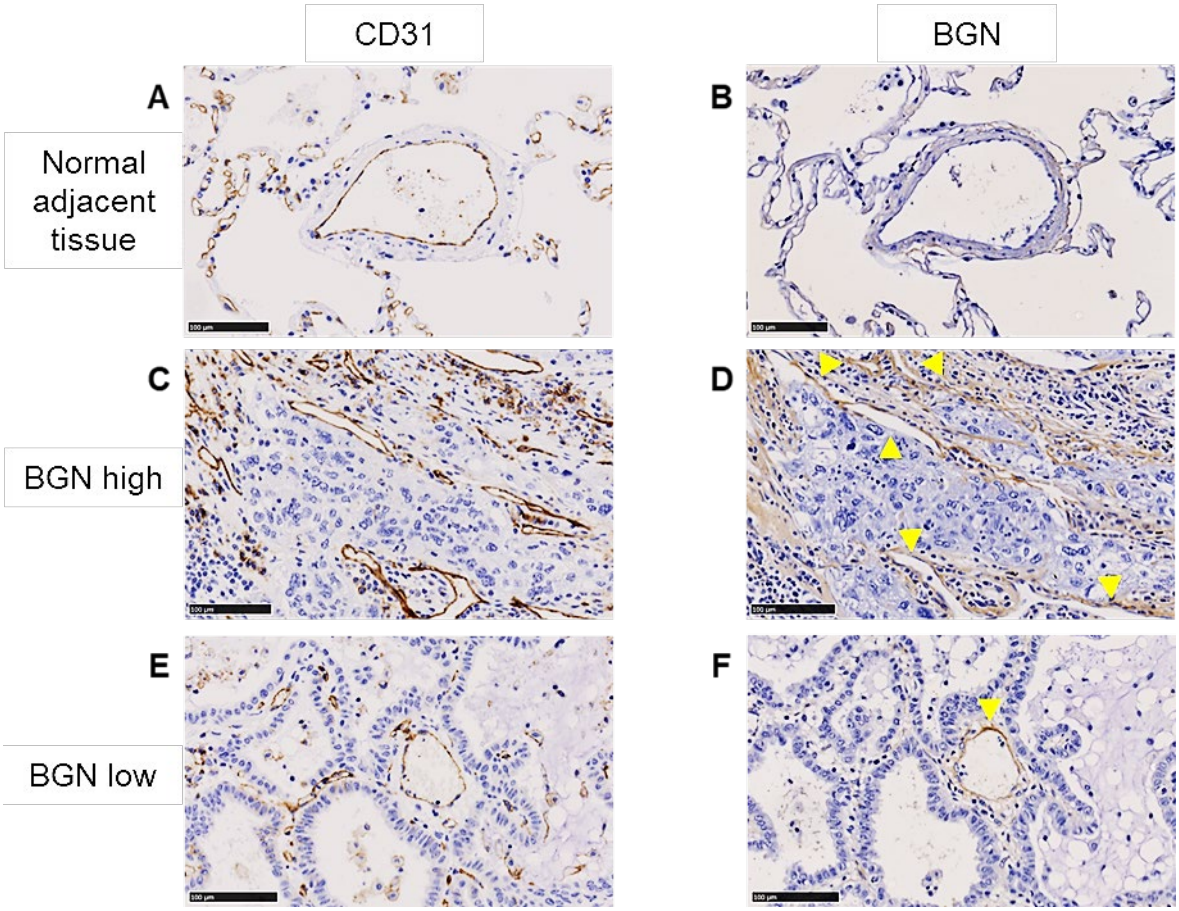


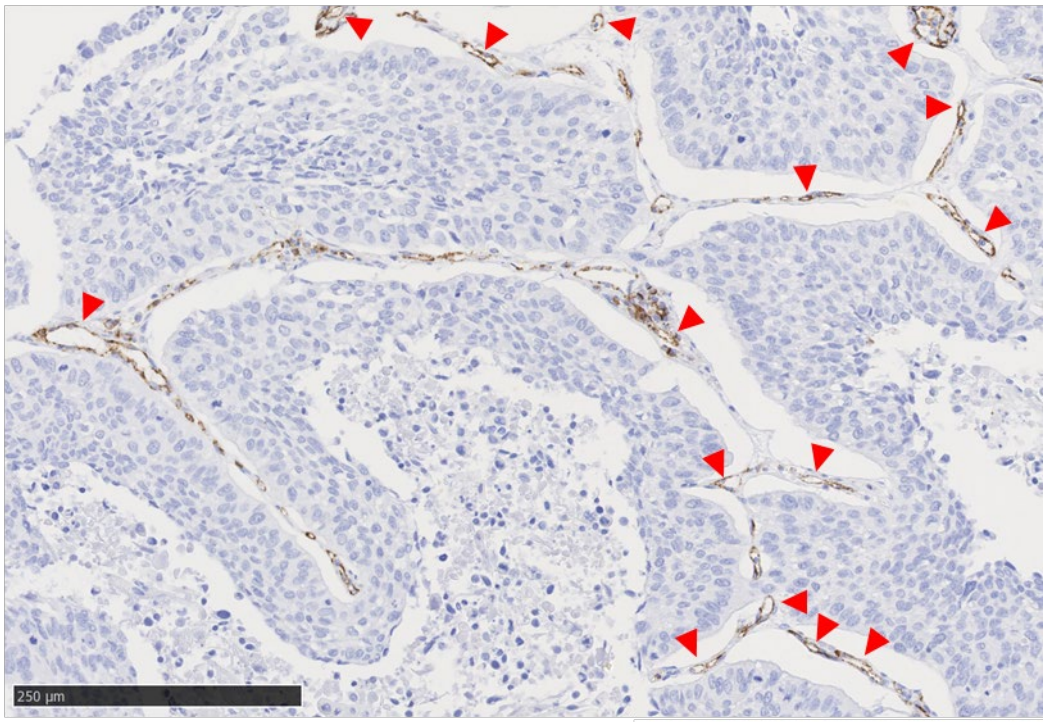
図 6　肺癌組織連続切片を用いた CD31, BGN 免疫染色による腫瘍血管内皮細胞 BGN 発現解析.

非癌部では BGN 陽性血管は認められなかったが、癌部では BGN 陽性血管を認め、症例により BGN 発現に差異を認めた。

A/B; 正常組織, C/D; BGN 高発現症例, E/F; BGN 低発現症例. 黄矢頭; BGN 陽性腫瘍血管. Scale bar, 100μm

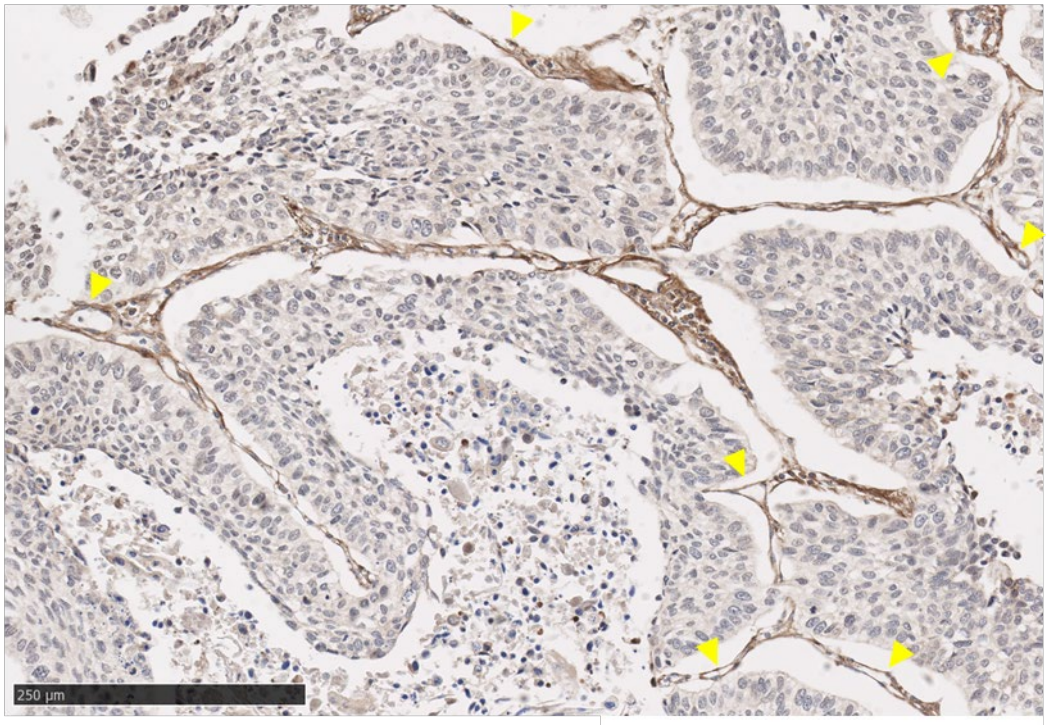
次に各ホットスポットおけるBGN陽性血管率の算出例を図7に示す。各ホットスポットにおいて、管腔の開いた単一のCD31陽性となる微小血管を1つの血管とし、CD34染色と比較してリンパ管でないことや単一の血管であることを確認して CD31 陽性血管の数を計測した。CD31陽性血管の内、BGN陽性を示す血管の数を計測し、BGN陽性血管数をCD31陽性血管数で除しBGN陽性血管率を算出した。

A



CD31陽性血管数:15

B



BGN陽性血管数:7
⇒BGN陽性血管率:7/15

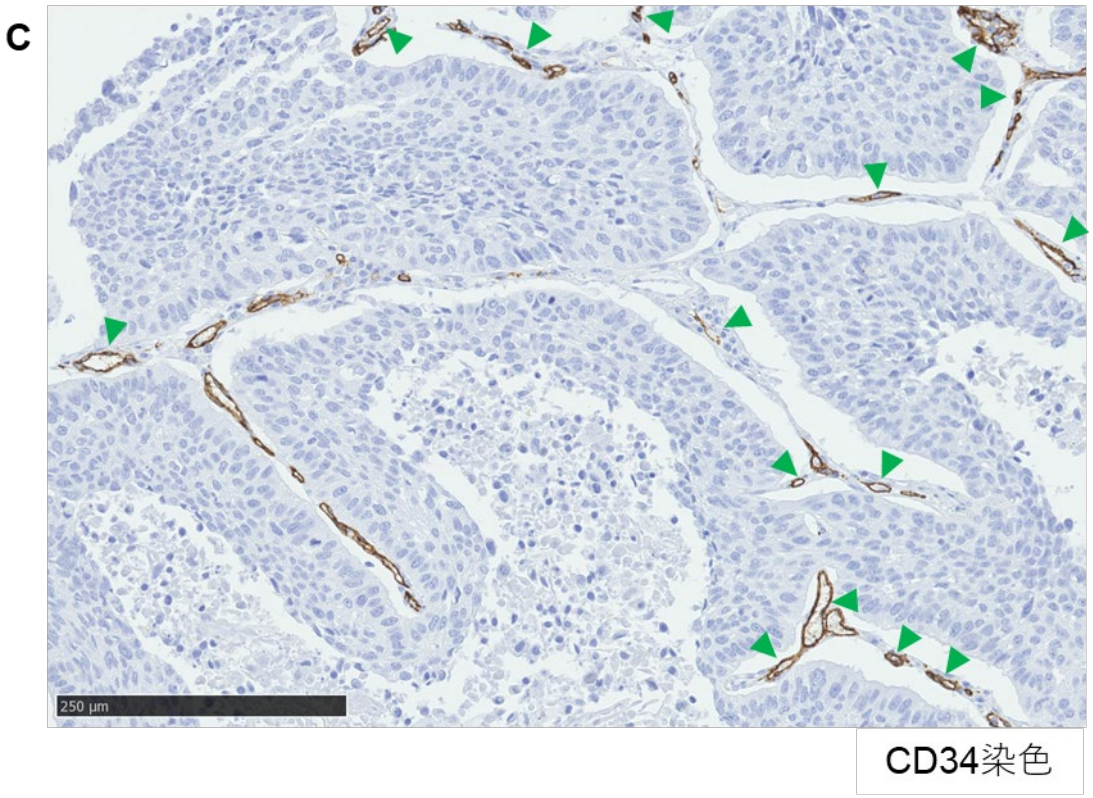


図 7：肺癌組織連続切片を用いた BGN 陽性血管率の解析.
各ホットスポット内で CD31 陽性血管数と BGN 陽性血管数をそれぞれ測定し、各スポットにおける BGN 陽性血管率を算出した。CD31 陽性血管は CD34 染色像と比較し、単一の血管で一致するものをカウントした。
A：CD31 染色. B：BGN 染色. C：CD34 染色
赤矢頭; CD31 陽性血管. 黄矢頭; BGN 陽性血管. 緑矢頭; CD34 陽性血管.
Scale bar, 250 μm

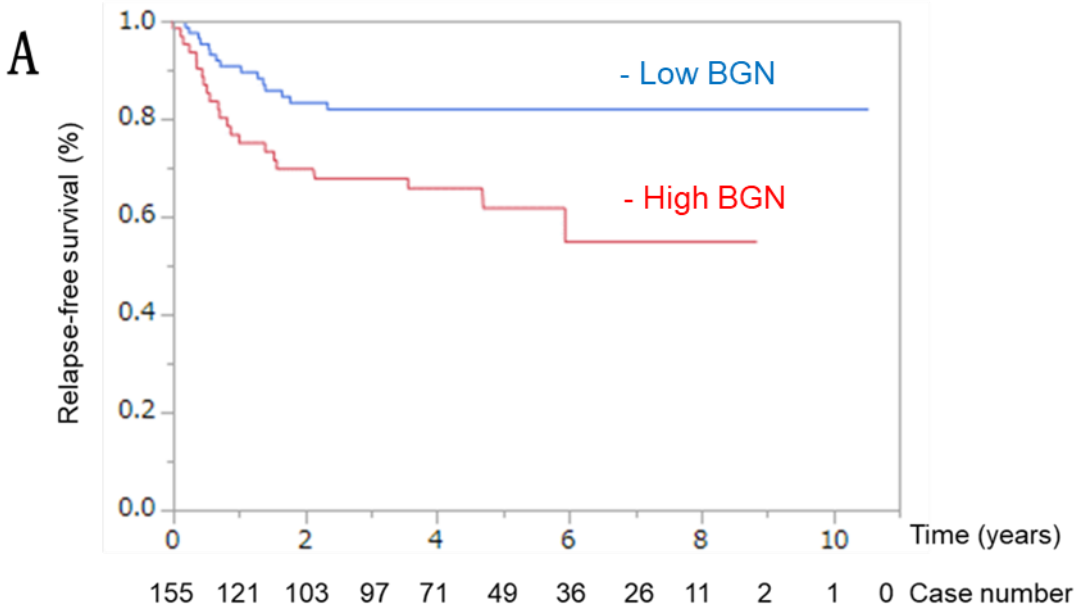
肺癌患者における BGN 発現と予後との相関

肺癌の腫瘍血管における BGN 発現と無再発生存期間および全生存期間との関係を解析した。症例を BGN 陽性血管率で 2 群に分けると、同値が 5.5%でそれぞれ $p = 0.0007$ および $p = 0.0024$ と最小値を示すことからカットオフ値として決定した。BGN 陽性血管率 5.5%未満を BGN 低発現群、5.5%以上を BGN 高発現群とした。肺癌患者 155 症例を BGN 高発現群と低発現群の 2 群に分け、各種臨床病理学的因子との関係を解析した（表 1）。その結果、組織型が扁平上皮癌を示す症例および T 因子が T3 以上の症例で BGN 発現が有意に高いことが判明した。

表１　肺癌症例（N=155)の患者背景

Clinicopathological variates		Low BGN (N=90)	High BGN (N=65)	*P*-value
Gender	Male	47	40	0.2488
	Female	43	25	
Age	≦ 68 Years	43	33	0.7132
	＞ 68 Years	47	32	
Tumor marker				
CEA	≦ 6.5 ng/ml	61	43	0.8319
	＞ 6.5 ng/ml	29	22	
SCC	≦ 2.0 ng/ml	87	56	0.0554
	＞ 2.0 ng/ml	3	7	
Histology	Adenocarcinoma	85	41	<0.0001
	SCC	5	24	
TNM classification				
T factor	≦ T2b	83	51	0.0135
	≧ T3	7	14	
N factor	Negative	70	45	0.2301
	Positive	20	20	
M factor	Negative	90	63	0.1743
	Positive	0	2	
Lymphatic invasion	Negative	26	23	0.3321
	Positive	13	18	
Vascular invasion	Negative	23	23	0.7947
	Positive	16	18	
Pleural invasion	Negative	64	39	0.1483
	Positive	26	26	
Recurrence	Negative	61	40	0.4211
	Positive	29	25	

腫瘍血管における BGN 発現と無再発生存率ならびに全生存率との関係を解析したところ、BGN 高発現群では無再発生存期間、全生存期間ともに有意に短かった（図 8A, 8B)。



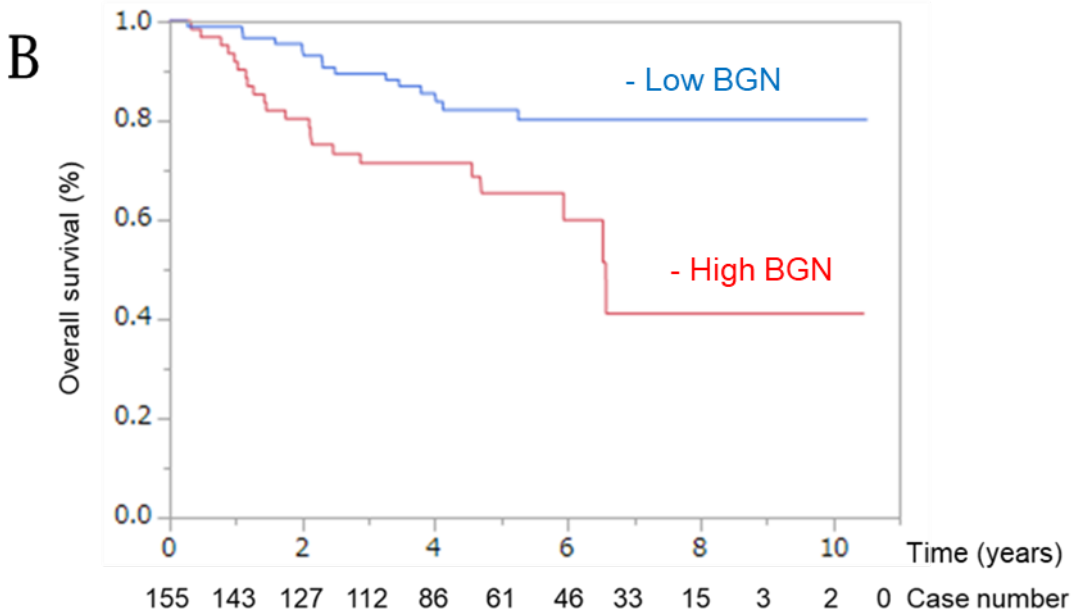


図 8　肺癌患者(N=155)の A;無再発生存期間および B;全生存期間のカプランマイヤー生存曲線．ログランク検定による腫瘍血管 BGN 高発現群と低発現群の群間比較．
全生存期間、無再発生存期間ともに BGN 高発現群で有意に短かった。
A : P = 0.0070, hazard ratio = 1.57 (95% CI; 1.04-2.33)
B: P = 0.0024, hazard ratio = 1.58 (95% CI; 1.06-2.33)

次に再発の予測因子について解析した。単変量解析では性別、腫瘍マーカーのSCC、組織型、T 因子、N 因子、リンパ管浸潤および BGN 発現などの因子が無再発生存率と有意な相関関係を認めた。しかし多変量解析では独立した再発予測因子を認めなかった（表 2)。

同様に予後予測因子についても解析した。単変量解析では性別、腫瘍マーカーのSCC、組織型、T 因子、BGN 発現などの因子が全生存率と有意な相関関係を認め、多変量解析では性別が独立した予後予測因子として抽出された（表 3)。多変量解析の結果では、腫瘍血管における BGN 発現は再発および予後の独立した予測因子ではなかった。

表２　肺癌患者（N=155)の無再発生存率と各種臨床病理学的因子との関連

Clinicopathological variates		Relapse-free survival	
		Univariate *P*-value HR (95% CI)	Multivariate *P*-value HR (95% CI)
Gender	Male	0.005 0.58 (0.40-0.85)	0.3428 1.38 (0.70-2.74)
	Female		
Age	≦ 68 Years	0.6894 1.07 (0.74-1.55)	
	> 68 Years		
Tumor marker			
CEA	≦ 6.5 ng/ml	0.9039 1.03 (0.70-1.54)	
	> 6.5 ng/ml		
SCC	≦ 2.0 ng/ml	0.0359 0.43 (0.23-0.94)	0.8208 1.12 (0.43-3.18)
	> 2.0 ng/ml		
Histology	Adenocarcinoma	0.0012 0.39 (0.24-0.68)	0.5516 0.73 (0.27-2.03)
	SCC		
TNM classification			
T factor	≦ T2b	0.0476 0.51 (0.28-0.99)	0.8774 0.91 (0.31-3.01)
	≧ T3		
N factor	Negative	0.0015 0.43 (0.27-0.71)	0.4944 1.27 (0.64-2.69)
	Positive		
M factor	Negative	0.6892 0.68 (0.38-1.18)	
	Positive		
Lymphatic invasion	Negative	0.0336 0.54 (0.31-0.95)	0.0705 0.54 (0.27-1.05)
	Positive		
Vascular invasion	Negative	0.4428 1.22 (0.73- 1.11)	
	Positive		
Pleural invasion	Negative	0.9138 0.97 (0.64-1.51)	
	Positive		
BGN expression	High (> 5.5%)	0.0243 1.59 (1.06-2.35)	0.7533 1.12 (0.53-2.28)
	Low (< 5.5%)		

表 3　肺癌患者 (N=155)の全生存率と各種臨床病理学的因子との関連

Clinicopathological variates		Overall survival	
		Univariate *P*-value HR (95% CI)	Multivariate *P*-value HR (95% CI)
Gender	Male	0.0007 1.91 (1.31-2.79)	0.0319 1.57 (1.04-2.37)
	Female		
Age	≦ 68 Years	0.6256 0.91 (0.63-1.31)	
	> 68 Years		
Tumor marker			
CEA	≦ 6.5 ng/ml	0.8319 0.95 (0.65-1.43)	
	> 6.5 ng/ml		
SCC	≦ 2.0 ng/ml	0.0047 0.31 (0.16-0.67)	0.2086 0.55 (0.23-1.41)
	> 2.0 ng/ml		
Histology	Adenocarcinoma	0.0001 0.31 (0.18-0.55)	0.2245 0.61 (0.28-1.33)
	SCC		
TNM classification			
T factor	≦ T2b	0.0212 0.45 (0.25-0.87)	0.2523 0.65 (0.33-1.37)
	≧ T3		
N factor	Negative	0.8946 0.96 (0.62-1.56)	
	Positive		
M factor	Negative	0.6454 0.24 (0.05-1.05)	
	Positive		
Lymphatic invasion	Negative	0.0976 0.62 (0.36-1.09)	
	Positive		
Vascular invasion	Negative	0.2796 1.33 (0.79-2.27)	
	Positive		
Pleural invasion	Negative	0.8686 0.96 (0.64-1.49)	
	Positive		
BGN expression	High (> 5.5%)	0.0235 1.58 (1.06-2.33)	0.4468 1.20 (0.74-1.88)
	Low (< 5.5%)		

肺癌患者における術前血中 BGN 濃度と予後との相関

46 症例の肺癌患者の術前血中 BGN 濃度および健常者 8 名の血中 BGN 濃度を ELISA 法により解析した結果、健常者の血中 BGN の濃度の中央値は 285ng/ml、肺癌患者の術前血中 BGN 濃度の中央値は 451ng/ml であった。両群に有意差は認めなかったが、健常者と比較し術前血中 BGN が非常に高い患者群が存在することが判明した(図 9)。46 症例の腫瘍組織における BGN 陽性血管率と術前血中 BGN 濃度との関係を解析したところ、両者に有意な相関関係を認めた（図 10)。

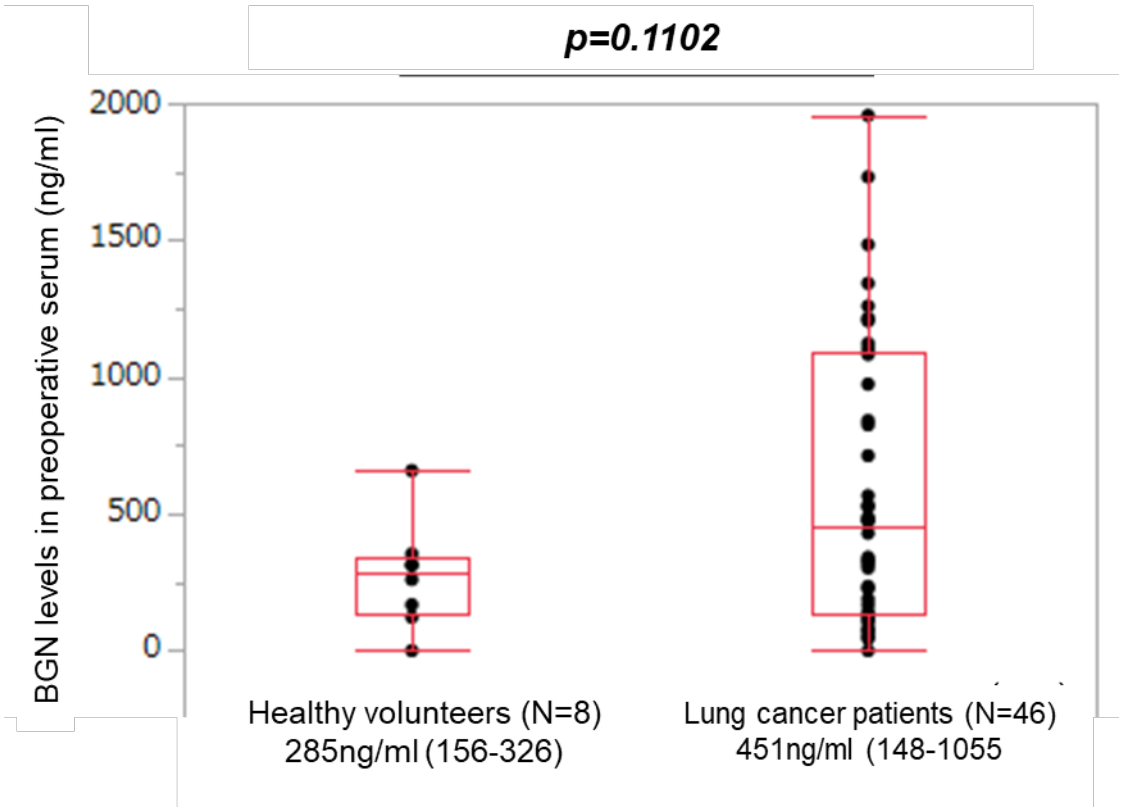


図 9　肺癌患者（N = 46)の術前血中および健常者（N = 8)の血中 BGN 濃度の解析. 健常者と比較し肺癌患者で術前血中 BGN 濃度が非常に高い症例を認めた。

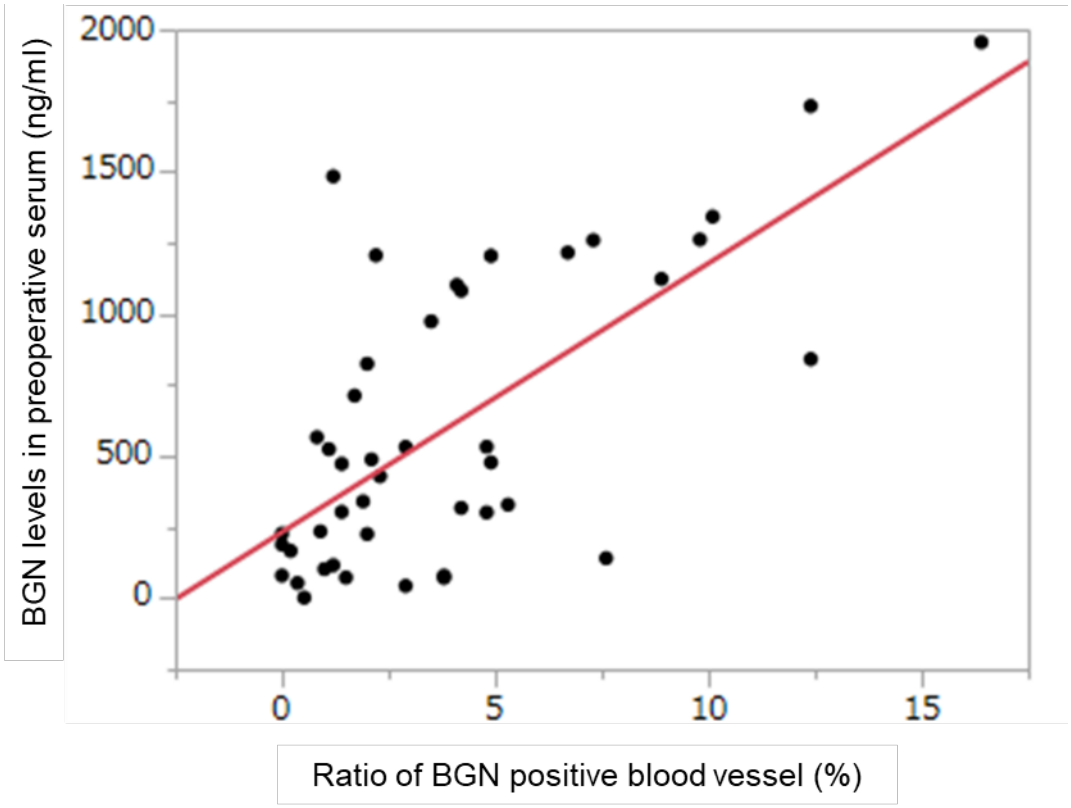


図 10　肺癌患者 (N = 46)の術前血中 BGN 濃度と腫瘍組織における BGN 発現の相関関係の解析.
腫瘍組織における BGN 陽性血管率と術前血中 BGN 濃度との間に正の相関関係を認めた。
相関係数；0.6529, $P < 0.0001$

次に術前血中 BGN 濃度と臨床病理学的因子との関係を解析した。各臨床病理学的因子との関係解析において、有意差が出る項目が最も多い術前血中 BGN 濃度 500ng/ml をカットオフ値と設定した。血中濃度が 500ng/ml 未満を BGN 低発現群、それ以上を BGN 高発現群として肺癌患者 46 症例を 2 群に分け、術前血中 BGN 濃度と臨床病理学的因子との関係について解析した (表 4)。その結果、術前血中 BGN 濃度と T 因子・術前 CRP 値・SUVmax 値との間に有意な相関関係を認めた。

表 4：肺癌症例 (N=46)の患者背景

Clinicopathological variates		Low blood BGN (N=26)	High blood BGN (N=20)	*P*-value
Gender	Male	19	15	0.8829
	Female	7	5	
Age	≦ 68 Years	9	7	0.7616
	> 68 Years	17	13	
Smoking history	Negative	5	2	0.4462
	Positive	21	18	
CRP (mg/dl)	≦ 0.14	20	8	0.0325
	> 0.14	6	12	
CEA	≦ 6.5 ng/ml	19	16	0.7324
	> 6.5 ng/ml	7	4	
SCC	≦ 2.0 ng/ml	22	15	0.4725
	> 2.0 ng/ml	4	5	
SUVmax	< 3.0	10	1	0.0189
	≧ 3.0	14	19	
Histology	Adenocarcinoma	20	11	0.1159
	SCC	6	9	
T factor	≦ T2b	24	13	0.0288
	≧ T3	2	7	
N factor	Negative	20	12	0.2162
	Positive	6	8	
M factor	Negative	24	20	0.4976
	Positive	2	0	
Lymphatic invasion	Negative	17	12	0.7076
	Positive	9	8	
Vascular invasion	Negative	13	6	0.1720
	Positive	13	14	
Pleural invasion	Negative	22	12	0.0741
	Positive	4	8	
Recurrence	Negative	22	18	0.6836
	Positive	4	2	

肺癌患者における術前血中 BGN 濃度と腫瘍の悪性度との関係解析

これまで、肺癌患者において術前 CT 検査での GGO 病変の存在が腫瘍の低悪性度と相関することが報告されている(Ohde et al., 2003; Ito et al., 2012)。そこで、術前血中 BGN 濃度と肺癌の悪性度との関係を解析するため、肺癌患者 46 症例について術前血中 BGN 濃度と CT 検査での GGO 病変の有無との関係を解析した。その結果、GGO 病変を伴わない症例では、GGO 病変を伴う症例と比較し、術前血中 BGN 濃度が有意に高い結果となった（表 5)。また、GGO 病変は腺癌において認められることから、46 症例中の肺腺癌 31 症例に限って同様に解析を行ったが、同様に GGO 病変を伴わない症例では、GGO 病変を伴う症例と比較し、術前血中 BGN 濃度が有意に高い結果となった（表 5)。

表 5　肺癌患者 (N=46)の術前血中 BGN 濃度と GGO 病変との関係解析

Clinicopathological variates	Low blood BGN	High blood BGN	*P*-value
46 lung cancer patients	(N = 26)	(N = 20)	
GGO negative	17	19	0.0320
GGO positive	9	1	
31 lung adenocarcinoma patients	(N = 20)	(N = 11)	
GGO negative	11	10	0.0407
GGO positive	9	1	

最後に、健常者・GGO 病変を伴う肺腺癌患者・GGO 病変を伴わない肺腺癌患者・腺癌以外の患者の 4 群間で血中 BGN 濃度を比較した。健常者と GGO 病変を伴う肺腺癌患者群の血中 BGN に差は認めなかった。GGO 病変を伴う肺腺癌患者群では、GGO 病変を伴わない肺腺癌患者群と比較し血中 BGN 濃度が低い傾向にあり、腺癌以外の患者群と比較すると血中 BGN 濃度が有意に低かった（図 10）。これらの結果から、低い術前血中 BGN 濃度が肺癌の低悪性度の指標となる可能性が示唆された。

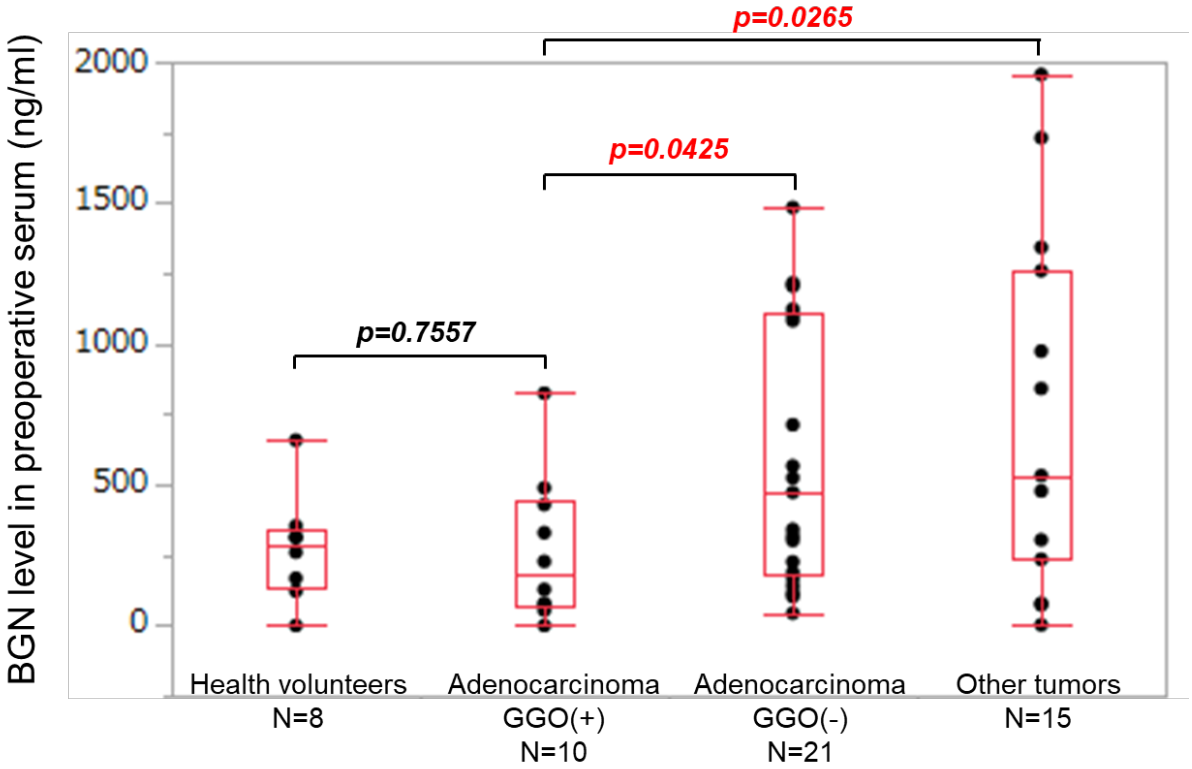


図 10　肺癌患者（N=46）の術前血中 BGN 濃度と腫瘍の悪性度との関係解析
GGO 病変を伴う肺腺癌患者群の術前血中 BGN 濃度は健常者と差はなく、GGO 病変を伴わない肺腺癌患者群や腺癌以外の患者群の術前血中 BGN 濃度と比較し有意に低かった。

考察

近年、BGN の発現は様々な種類の癌腫において、患者の予後や癌の進行に関連していることが報告されている(Hu et al., 2014; Xing et al., 2015; Chambers et al., 2002; Wang et al., 2011; Gu et al., 2012; Aprile et al., 2013; Liu et al., 2014; Jacobsen et al., 2017)。例えば、胃癌、結腸癌、直腸癌では腫瘍組織から分離された BGN の mRNA とタンパク質の発現レベルが腫瘍の進行と悪性度に関連していることが報告されている(Wang et al., 2011; Gu et al., 2012)。子宮内膜癌においては、血清中の BGN レベルは組織学的 Grade、国際産婦人科連合の病期分類、子宮筋層浸潤の深さ、およびリンパ節転移などの臨床病理学的因子と有意に関連していることが報告されている(Liu et al., 2014)。しかし、肺癌における BGN 発現や腫瘍の進行および患者の予後との関係を解析した報告はない。本研究では、腫瘍血管における BGN 発現と癌の悪性度との関係を解析し、バイオマーカーとしての可能性を明らかにするため、ある程度まとまった症例数で組織と血液の両方の臨床検体が解析可能であり、血管新生阻害療法も比較的多く行われている肺癌を解析対象として選択した。Oncomine のデータベースを用いて 20 症例のヒト正常肺組織と 226 症例のヒト肺癌組織における BGN 発現を評価すると、正常肺組織と比較し肺癌組織で BGN の遺伝子発現がより高いことが明らかとなった(Rhodes et al., 2004)。また、International Cancer Genome Consortium (ICGC)のデータベースを用いて肺癌の腫瘍組織における BGN 遺伝子発現と肺癌患者の予後との関係を調べると、腫瘍組織中の BGN の mRNA 発現が高い患者で全生存期間が有意に短いことが明らかとなった。しかし、TEC を含めたがん微小環境における BGN 発現と腫瘍の進行および患者の予後との関係や、組織における BGN 発現と血中濃度との関係についての報告はいまだない。本研究で申請者は、肺癌の腫瘍血管に BGN 発現を認め、腫瘍血管における BGN 発現が患者の予後不良と相関し、血中 BGN 濃度が腫瘍血管における BGN 発現と相関することを明らかにした。

本研究で、肺癌組織の腫瘍血管における BGN 発現は腺癌と比較し扁平上皮癌で有意に高い結果であったが、血中 BGN 濃度の解析では組織型による差は認めなかった。血中 BGN 濃度解析において、同じ腺癌でも GGO 病変を伴う腺癌と比較し、GGO 病変を伴わない充実成分のみの腺癌では血中 BGN 濃度が高い傾向にあり、同じく充実成分のみで構成されている腺癌以外の組織型でも血中 BGN 濃度が有意に高い結果であった。血中濃度と同様に、腫瘍血管における BGN 発現も組織型による違いではなく、充実成分の違いにより発現に差が生じた可能性が考えられた。また、腫瘍血管における BGN 発現と血中 BGN 濃度ともに TNM 分類の T3 以上の腫瘍サイズの大きい症例で有意に高い結果であった。申請者が所属していた研究室では BGN ノックアウトマウスに乳癌細胞を同所移植した腫瘍モデルを用いて、BGN の阻害は肺転移を減少するものの、腫瘍増殖には関与していないことを明らかにしており (Cong et al., 2021)、腫瘍径の大き

い腫瘍や充実成分の多い腫瘍で BGN 発現が亢進している可能性が考えられた。BGN 発現を亢進する因子として、TGF-β(Burch et al., 2011)や活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS) (Hojo et al., 2017)などが知られており、これらの因子の腫瘍組織や血中での発現について検討する必要がある。

肺腺癌において、CT 検査で GGO 病変を伴う症例は腫瘍の悪性度が低く、切除後の生存期間が良好であることが知られており(Asamura et al., 2003)、CT 検査で pure-GGO を伴う孤立性肺腺癌の患者に対して完全切除を行った場合、疾患特異的 5 年生存率が 100%であることが複数の研究で示されている(Noguchi et al., 1995; Vazquez et al., 2009)。また、腫瘍の悪性度が GGO 成分を除く充実成分の最大径または面積に依存するとの報告もある (Tsutani et al., 2012; Murakawa et al., 2013)。本研究で申請者は、GGO 病変を伴わない肺腺癌患者と比較し、より充実成分の大きい GGO 病変を伴わない肺腺癌患者で血中 BGN 濃度が高いことを明らかにしており、血中 BGN 濃度が肺腺癌の悪性度の指標となる可能性が示唆された。実際の臨床では、CT 検査で小さな pure-GGO を認めた場合、他の画像検査や血液検査データを併用しても良性疾患との鑑別が困難なため、頻回の CT 検査で GGO 病変の増大または充実成分の出現を待って治療に移行することがある。GGO 病変を伴う腺癌のフォローアップに血液検査という比較的簡便で低侵襲な方法により測定された血中 BGN 濃度を用いた場合、GGO 病変を伴う肺腺癌患者の血中 BGN 濃度は健常者と同程度であるが、血中 BGN 濃度が本研究で設定したカットオフ値500ng/ml より高値を示した場合にCT検査を追加することで、CT 検査の回数を抑制し放射線被爆や医療費高騰などの問題を軽減できる可能性が考えられる。また、血中 BGN 濃度が低い GGO 成分を伴う肺腺癌症例では悪性度が低いと考えられ、部分切除や区域切除などの縮小手術の術式決定にも有用である可能性が考えられる。

血管新生阻害療法は腫瘍血管を標的としがんを兵糧攻めにしようという治療法で、1971 年に Judah Folkman によって初めて提唱された(Folkman et al., 1971)。臨床では、世界初の血管新生阻害剤として 2004 年に欧米で認可されたヒト VEGF 中和抗体薬ベバシズマブ(Bevacizumab)により、さらに広く知られるようになった。現在では VEGF 中和抗体だけでなく、血管新生因子の受容体シグナル伝達経路を遮断するチロシンキナーゼ阻害剤などが臨床応用され、様々な種類の癌腫において臨床転帰を改善することが報告されている(McCarthy et al., 2003)。しかし、VEGF は NEC の生存にとっても重要であり、その阻害は消化管穿孔、高血圧, 出血などの副作用を引き起こすことが報告されている(Giantonio et al., 2007)。そのため TEC に特異的に作用する新規の血管新生阻害剤の開発が望まれている。血管新生阻害剤は、このように異常な腫瘍血管の退縮と残存する腫瘍血管の正常化に働くとされ(Vosseler et al., 2005)、その腫瘍血管の正常化は腫瘍の低酸素の状態を改善し、癌の進行を抑制し、腫瘍組織の

間質圧を低下させることで抗癌剤の腫瘍への到達を促進することが示されている(Jain et al., 2014a)。しかし、血管新生阻害剤の長期間投与は腫瘍組織の虚血を惹起し、逆に悪性化をもたらすとの報告もある(Jain et al., 2005)。従って、血管新生阻害剤の使用開始や中止時期、適応患者を決定するためのコンパニオン診断薬の欠如も問題視されるようになってきている。

肺癌治療においても血管新生阻害療法は有効な治療法の1つと考えられている。これまで、扁平上皮癌を除く切除不能な進行・再発NSCLC患者を対象にプラチナ製剤併用化学療法に VEGF 中和抗体であるベバシズマブを追加することの有効性を評価した臨床試験が行われ、全生存期間や無増悪生存期間の有意な延長が認められた(Sandler et al., 2006; Zhou et al., 2015; Lima et al., 2011; Soria et al., 2013)。しかし、その後の臨床試験において、無増悪生存期間の1か月程度の延長効果は示されたものの、全生存期間の延長効果を証明することができなかった試験も複数存在した。その原因は十分には解明されていないが、VEGF以外の血管新生因子が治療抵抗性を誘導する可能性(Limaverde-Sousa et al., 2014)や血管新生阻害が腫瘍細胞の悪性度を増強する可能性(Paez-Ribes et al., 2009)などが指摘されている。本研究で、申請者は肺癌の腫瘍血管にBGN発現を認め、血中BGN濃度が腫瘍血管におけるBGN発現と相関することを明らかとしており、BGN が血管新生阻害療法の効果をモニタリングするためのバイオマーカーとなり得る可能性が期待される。

BGN は炎症以外に組織の線維化にも関与することが報告されている(Bani-Hani et al., 2009)。線維芽細胞から分泌されたBGNがintegrin-β1の発現を誘導し、組織を硬化させ黒色腫の浸潤を促進することが報告されおり(Andrlova et al., 2017)、BGNによる細胞外マトリックスの硬直が腫瘍の進展や転移を促進する可能性が考えられる。また、BGN による細胞外マトリックスの硬化が腫瘍血管を圧迫し血管機能を阻害する可能性があること(Martin et al., 2019)や、腫瘍組織の線維化が腫瘍の低酸素につながる可能性についての報告もある(Jain et al., 2014b)。申請者が所属していた研究室では、BGN ノックアウトマウスに乳癌細胞を同所移植した腫瘍モデルを用いて、間質中のBGNを標的とすることで、腫瘍の線維形成を抑制させ、腫瘍血管の圧迫を軽減することを報告している(Cong et al., 2021)。本研究では、肺癌組織において腫瘍血管だけでなく腫瘍間質部にもBGN陽性所見を認めた。炎症性病変では、マクロファージや線維芽細胞から分泌されたBGNは細胞外マトリックスに沈着し、血液循環に入る前に様々な種類の酵素によって切断・分解されることが報告されている(Hsieh et al., 2014)。本研究で肺癌の腫瘍血管以外の間質部で認めたBGN陽性所見が、細胞外マトリックスに沈着したBGNである可能性があり、肺癌においても腫瘍の線維化とBGN発現の関係について解析する必要がある。また、腫瘍組織内でBGNがどのように切断・分解され血液循環に入るかについて解析した報告は認められなかったが、もし腫瘍組

織内でも炎症性病変と同様に間質に沈着したBGNが酵素により切断・分解され血液循環に入るとしたら、血中BGN濃度は腫瘍血管から分泌されたもの以外に、線維芽細胞やマクロファージにおけるBGN発現の影響も受けている可能性が考えられ、これらの発現についても解析する必要がある。

筆者が所属していた研究室ではin vivoマウスモデルにおいてBGNが腫瘍細胞の血管内侵入および転移を促進することを報告しており(Maishi et al., 2016)、ヒトの臨床検体を用いてBGN発現と遠隔転移との関連についても解析する必要がある。しかし、遠隔転移を伴う肺癌の場合、通常、外科的切除は適応されないため、BGN 発現と遠隔転移との関連を示すことはできなかった。BGN 発現と遠隔転移との関連性を解析するためには、肝転移や肺転移を伴う大腸癌など、遠隔転移を伴っていても原発巣の外科的切除が選択されうる癌腫での解析が必要である。

肺癌の基本的な組織型は腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌の4種類であり、その中で最多とされる肺腺癌にはさらに細かな亜型分類が存在し(Travis et al., 2011)、この亜型分類は悪性度や予後などをよく反映していることが知られている(Motoi et al., 2008)。申請者は腫瘍血管におけるBGN発現と血中BGN濃度の両者を解析可能であった肺腺癌 31 症例について、この亜型分類を用いて BGN 発現と肺腺癌の悪性度との関係解析も検討したが、分類された各亜型の症例数が少なく統計学的な解析は困難であった。今後症例を蓄積し、亜型分類を用いた肺腺癌におけるBGN発現と悪性度との関係を解析する必要がある。

本研究にはいくつかの問題点が挙げられる。1 つ目の問題点は BGN 陽性血管率の解析方法についてである。免疫染色を用いた血管密度の解析方法として、組織内で血管を多く含む領域をホットスポットとし、ホットスポットを数視野ランダムに選択し、各ホットスポットにおいて血管内皮マーカーである CD31 陽性となる血管数を計測する方法が報告されている(Weidner et al., 1991; White et al., 2002; Valencak et al., 2004; Lu et al., 2010)。本研究でも同様の方法でホットスポットを選択し、各ホットスポットにおいて管腔の開いた単一の CD31 陽性となる微小血管を 1 つの血管として計測し解析を行った。しかし、例えば隣接した2つの微小血管をそれぞれ単一の血管として計測していたものが、実は連続した1つの血管である可能性も考えられ、血管を重複して計測している可能性が否定できないという問題点がある。単一の組織切片で酵素抗体法を用いた CD31 と BGN の二重免疫染色についても検討を行ったが、特異的な染色像を得ることができず、本研究では連続切片を用いて CD31 と BGN それぞれの免疫染色を行い解析した。より正確なBGN陽性血管率の解析のため、酵素抗体法を用いた二重免疫染色のプロトコール樹立が必要である。2 つ目の問題点は BGN 抗体の抗原についてである。通常、マクロファージや線維芽細胞などから分泌され細胞外マトリックスに結合した BGN は、matrix metalloproteinase (MMP)/

a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin motif (ADAMTS)/bone morphogenetic protein-1(BMP1)/GranzymeB などの酵素により細胞や基質から切り離され、血中や標的細胞の受容体へ遊離するとされる(Hsieh et al., 2014)。各酵素により BGN の切断部位は異なっており(Melching et al., 2006; Scott et al., 2000)、血中には様々な糖鎖修飾を持った BGN が混在している可能性が考えられるが、各酵素による切断後の BGN の機能や活性の違いについての報告はない。また、本研究において免疫染色で用いた BGN 抗体の抗原決定基は不明であるが、ELISA 法で用いられている BGN 抗体の抗原決定基と異なっている可能性があり、腫瘍血管で発現している BGN と血中に遊離している BGN とでは、機能や活性が異なっている可能性が考えられる。今後、エピトープの判明している新たな BGN 抗体の作成や糖鎖修飾の違いによる BGN の機能および活性の違いについて検討を行う必要がある。

本研究で、申請者は BGN が肺癌 TEC で発現し、TEC での BGN 発現が患者の予後不良と関連していることを示した。さらに、術前血中 BGN 濃度が、TEC における BGN 発現と相関し、特に肺腺癌の悪性度と相関していることを示した。以上から、BGN が肺腺癌の手術適応の時期や術式選択の決定に有用なバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

総括および結論

① 本研究全体から得られた新知見

・肺癌の腫瘍組織内において BGN 陽性血管を認めた
・肺癌症例において腫瘍血管内皮細胞の BGN 発現が腫瘍の進展度や予後と相関した
・術前血中 BGN 濃度が腫瘍組織内の BGN 陽性血管率と相関した
・肺腺癌症例において術前血中 BGN 濃度が腫瘍の悪性度と相関した

② 新知見の意義

腫瘍細胞ではなく、がん微小環境における BGN 発現が肺癌の悪性度や予後と相関することが明らかとなった。また、腫瘍血管における BGN 発現が肺癌、特に肺腺癌の手術適応の時期や縮小手術などの術式選択の決定に有用なバイオマーカーになり得ることが示唆された。そして、これを術前に血液検査という比較的簡便で低侵襲な方法で解析が可能であることは患者にとって非常に大きな意義がある。

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

本研究で低悪性度の肺腺癌では血中 BGN 濃度が低いことが明らかとなった。良性疾患との鑑別が困難な低悪性度の肺腺癌病変のフォローアップにおいて、血中 BGN 濃度を測定することで手術適応の時期を判断する指標となり得る可能性がある。

肺癌の腫瘍血管で発現が亢進している BGN の治療前後の血中濃度を測定することで、血管新生阻害療法の治療効果をモニタリングするためのコンパニオン診断薬となり得る可能性がある。また、BGN を標的とした新規の血管新生阻害剤の創薬や効果的な投与法の開発にもつながることが期待される。

肺癌以外の癌腫においても同様に、腫瘍血管を含めたがん微小環境における BGN 発現と腫瘍の進行や予後との関係を解析することで、診断や予後予測因子などのバイオマーカーとなり得ることが期待される。

④今後の課題

腫瘍以外に炎症性疾患でも BGN はマクロファージや線維芽細胞から分泌されており、血中 BGN 濃度は TEC から分泌されたもの以外の影響も受けている可能性がある。また、腫瘍組織内で TEC 以外での BGN 発現が高い場合、腫瘍血管だけを治療標的としても治療効果は乏しいと考えられ、TEC だけでなく TAM や CAF など他のがん微小環境を構成する細胞における BGN 発現についても解析が必要である。

また、これまでの報告で TEC における BGN が遠隔転移に関与することが報告されており、臨床検体においても遠隔転移を有する症例や再発症例を対象として、TEC における BGN 発現と遠隔転移との関係について解析を行う必要がある。

謝辞

本研究の機会を与え御指導を賜りました、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ　平野聡教授に深甚なる謝意を表します。また、直接の御指導を賜りました、北海道大学大学院歯学研究院口腔病態学分野血管生物分子病理学教室　樋田京子教授、間石奈湖助教に深く感謝申し上げます。また、本研究にあたり様々な面でご協力頂きました、北海道大学大学院医学研究院循環器外科・呼吸器外科学講座　樋田泰浩准教授、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの皆様および北海道大学大学院歯学研究院口腔病態学分野血管生物分子病理学教室の皆様に心よりお礼申し上げます。

利益相反

本研究に関連し、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abe, M., and Sato, Y. (2001). cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells. Angiogenesis. *4*, 289-298.

Andrlova,H., Mastroianni,J., Madl,J., Kenn,J.S., Melchinger,W., Dierbach,H., Wernet,F., Follo,M., Technau-Hafsi,K., and Has,C. (2017). Biglycan exression in the melanoma microenvironment promotes invasiveness via increased tissue stiffness inducing integrin-beta1 expression. Oncotarget. *8*, 42901-42916.

Aprile, G., Avellini, C., Reni, M., Mazzer, M., Foltran, L., Rossi, D., Cereda, S., Iaiza, E., Fasola, G., and Piga, A. (2013). Biglycan expression and clinical outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. Tumor Biol. *34*, 131-137.

Asamura, H., Suzuki, K., Watanabe, S.-i., Matsuno, Y., Maeshima, A., and Tsuchiya, R. (2003). A clinicopathological study of resected subcentimeter lung cancers: a favorable prognosis for ground glass opacity lesions. Ann. Thorac. Surg. *76*, 1016-1022.

Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M.F., Bruckner, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R.M., Grone, H.J., et al. (2009). Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. J. Biol. Chem. *284*, 24035-24048.

Bani-Hani, A. H., Leslie,J.A., Asamura,H., Dinarello,C.A., Campbell,M.T., Meldrum,D.R., Zhang.H., Hile,K., and Meldrum,K.K. (2009). IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial-mesenchmal transition and renal fibrosis. Kidney Int. *76*, 500-511.

Bergers, G., and Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat. Rev. Cancer. *3*, 401-410.

Burch, M., Zheng, W., Little, P. J. (2011). Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis. Cell. Mol. Life. Sci. *68*, 97-107.

Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat. Rev. Cancer. *2*, 563-572.

Cong, L., Maishi, N., Annan, D. A., Young, M. F., Morimoto ,H., Morimoto ,M., Nam ,J.M., Hida ,Y., and Hida, K. (2021). Inhibition of stromal biglycan promotes normalization of the tumor microenvironment anda enhances chemotherapeutic efficacy. Breast Cancer Res. *23*, 1-17.

Domen, H., Hida, Y., Okamoto, S., Hatanaka, K.C., Hatanaka, Y., Kaga, K., Tamaki, N., Hirano, S., and Matsuno, Y. (2013). Histopathologic characterization of lung adenocarcinoma in relation to fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake on positron emission tomography. Jpn. J. Clin. Oncol. *43*, 874-882.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblast Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-KappaB-Dependent Manner. Cancer Cell. *17*, 135-47.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer. *136*, E359-386.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. *285*, 1182-1186.

Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin. Oncol. *29*, 15-18.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. Nat. Rev. Drug Discov. *6*, 273-86.

Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O'Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., and Benson, A.B. (2007). 3rd; Eastern Cooperative Oncology Group Study, E. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. J. Clin. Oncol. *25*, 1539-1544.

Gu, X., Ma, Y., Xiao, J., Zheng, H., Song, C., Gong, Y., and Xing, X. (2012). Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers. Clin. Exp. Med. *12*, 195-199.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. *144*, 646-674.

Hida, K., Maishi, N., Kawamoto, T., Akiyama, K., Ohga, N., Hida, Y., Yamada, K., Hojo, T., Kikuchi, H., Sato, M., et al. (2016). Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels. Pathol. Int. *66*, 687-694.

Hojo, T., Maishi, N., Towfik, A. M., Akiyama, K., Ohga, N., Shindoh, M., Hida, Y., Minowa, K., Fujisawa, T., Hida, K. (2017). ROS enhance anginogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells. Oncotarget. *8*, 45484-45495.

Hsieh, L.T., Nastase, M.V., Zeng-Brouwers, J., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2014). Soluble biglycan as a biomarker of inflammatory renal diseases. Int. J. Biochem. Cell Biol. *54*, 223-235.

Hu, L., Duan, Y. T., Li, J. F., Su, L. P., Yan, M., Zhu, Z. G., Liu, B. Y., and Yang, Q. M. (2014). Biglycan enhances gastric cancer invasion by activating FAK signaling pathway. Oncotarget. *5*, 1885-1896.

Ito, T., Murakawa, T., Sato, H., Tanabe, A., Maekawa, M., Yoshida, Y., Fukayama, M., and Nakajima, J. (2012). Simple preoperative computed tomography image analysis shows good predictive performance for pathological vessel invasion in clinical stage IA non-small cell lung cancer. Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg. *15*, 633-638.

Jacobsen, F., Kraft, J., Schroeder, C., Hube-Magg, C., Kluth, M., Lang, D.S., Simon, R., Sauter, G., Izbicki, J.R., Clauditz, T.S., et al. (2017). Up-regulation of Biglycan is Associated with Poor Prognosis and PTEN Deletion in Patients with Prostate Cancer. Neoplasia. *19*, 707-715.

Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vascularture: an emerging cocept in antiangiogenic therapy. Science. *307*, 58-62.

Jain, R. K. (2014a). Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarker. J. Clin. Oncol. *31*, 2205-2218.

Jain,R.K. (2014b). Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. Cancer Cell. *26*, 605-622.

Kozower, B.D., Larner, J.M., Detterbeck, F.C., and Jones, D.R. (2013). Special treatment issues in non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. *143*, e369S-e399S.

Langenkamp, E., and Molema, G. (2009). Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequences for antiangiogenic therapy of cancer. Cell Tissue Res. *335*, 205-222.

Li, H., Fan, X., and Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. J. Cell Biochem. *101*, 805-15.

Lima, A. B. C., Macedo, L., and Sasse A. D. (2011). Addition of bevacizumab to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. PloS. One. *6*, e22681.

Limaverde-Sousa, G., Sternberg, C., and Ferreira, C. G. (2014). Antiangiogenesis beyond VEGF inhibition: a journeyfrom antiangiogenic single-target to broad-spectrum agents. Cancer Treat. Rev. *40*, 548-557.

Liu, Y., Li, W., Li, X., Tai, Y., Lu, Q., Yang, N., and Jiang, J. (2014). Expression and significance of biglycan in endometrial cancer. Arch. Gynecol. Obstet. *289*, 649-655.

Lu, C., Calin, G. A., Denkbas, E. B., Lim, J. Y., Lee, J. S., Kundra, V., Birrer. M. J., Hung, M. C., Berestein, G. L., Sood, A. K. et al. (2010). Regulation of Tumor Angiogenesis by EZH2. Cancer Cell. *18*, 185-197.

Maishi, N., Ohba, Y., Akiyama, K., Ohga, N., Hamada, J., Nagao-Kitamoto, H., Alam, M.T., Yamamoto, K., Kawamoto, T., Inoue, N., et al. (2016). Tumour endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. Sci. Rep. *6*, 28039.

Martin,J.D., Seano,G., and Jain,R.K. (2019). Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges. Annu. Rev. Physiol. *81*, 505-534.

McCarthy, M. (2003). Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. Lancet. *361*, 1959.

McDonald, D. M., and Choyke, P. L. (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. Nat. Med. *9*, 713-725.

Melching, L.I., Fisher, W.D., Lee, E.R., Mort, J.S., and Roughley, P.J. (2006). The cleavage of biglycan by aggrecanases. Osteoarthritis Cartilage. *14*, 1147-1154.

Minami,T., Abid, M, R., Takabe, W., Noguchi, N., Kohro, T., Ge, X., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T., Arid, W. C., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor- and thrombin-indeced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelialcell proliferation and angiogenesis. J. Biol. Chem. *279*, 50537-50554.

Mohan, H., Krumbholz, M., Sharma, R., Eisele, S., Junker, A., Sixt, M., Newcombe, J., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Lassmann, H., et al. (2010). Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. Brain Pathol. *20*, 966-975.

Moreth, K., Frey, H., Hubo, M., Zeng-Brouwers, J., Nastase, M. V., Hsieh, L. T., Haceni, R., Pfeilschifter, J., Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2014). Biglycan-triggered TLR-2- and TLR-4- signaling exacerbates the pathophisiology of ischemic acute kidney injury. Matrix Biol. *35*, 143-151.

Motoi, N., Szoke, J., Riely G. J., Seshan, V. E., Kris, M. G., Rusch, V. W., Gerald, W. L., Travis, W. D. (2008). Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggets correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. Am. J. Surg. Pathol. *32*, 810-827.

Murakawa, T., Konoeda, C., Ito, T., Inoue, Y., Sano, A., Nagayama, K., and Nakajima, J. (2013). The ground glass opacity component can be eliminated from the T-factor assessment of lung adenocarcinoma. Eur. J. Cardiothorac. Surg. *43*, 925-932.

Muraki, C., Ohga, N., Hida, Y., Nishihara, H., Kato, Y.; Tsuchiya, K., Matsuda, K., Totsuka, Y., Shindoh, M., Hida, K. et al. (2012). Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. Int. J. Cancer. *130*, 59-70.

Nagy, J. A., Feng, D., Vasile, E., Wong, W. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (2006). Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. Lab. Invest. *86*, 767-780.

Nagy, J. A., Chang, S. H., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (2009). Why are tumor blood vessels abnormal and why is it important to know? Br. J. Cancer. *100*, 865-869.

Noguchi, M., Morikawa, A., Kawasaki, M., Matsuno, Y., Yamada, T., Hirohashi, S., Kondo, H., and Shimosato, Y. (1995). Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. Cancer. *75*, 2844-2852.

Ohde, Y., Nagai, K., Yoshida, J., Nishimura, M., Takahashi, K., Suzuki, K., Takamochi, K., Yokose, T., and Nishiwaki, Y. (2003). The proportion of consolidation to ground-glass opacity on high resolution CT is a good predictor for distinguishing the population of non-invasive peripheral adenocarcinoma. Lung Cancer. *42*, 303-310.

Ohga, N., Ishikawa, S., Maishi, N., Akiyama, K., Hida, Y., Kawamoto, T., Sadamoto, Y., Osawa, T., Yamamoto, K., Kondoh, M., Ohmura, H., Shinohara, N., Nomura, K., Shindoh, M., and Hida, K. (2012). Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. Am. J. Pathol. *180*, 1294-1307.

Osawa, T., Ohga, N., Akiyama, K., Hida, Y., Kitayama, K., Kawamoto, T., Yamamoto, K., Maishi, N., Kondoh, M., Onodera, Y., et al. (2013). Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. Br. J. Cancer. *109*, 2237-2247.

Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicites malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. Cancer Cell. *15*, 220-231.

Roedig, H., Nastase, M. V., Frey, H., Moreth, K., Zeng-Brouwers, J., Poluzzi, C., Hsieh, L. T., Brandts, C., Fulda, S., Wygrecka, M., et al. (2019). Biglycan is a new high-affinity ligand for CD14 in macrophages. Matrix Biol. *77*, 4-22.

Roedes, D. R., Yu, Jianjun, M., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., Chinnaiyan, A. M., et al. (2004). Oncomine: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. Neoplasia. *6*, 1-6.

Salati, M., Refai, M., Pompili, C., Xiume, F., Sabbatini, A., and Brunelli, A. (2013). Major morbidity after lung resection: a comparison between the European Society of Thoracic Surgeons Database system and the Thoracic Morbidity and Mortality system. J. Thorac. Dis. *5*, 217-222.

Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. *355*, 2542-2550.

Schaefer, L., and Iozzo, R.V. (2008). Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. J. Biol. Chem. *283*, 21305-21309.

Scott, I.C., Imamura, Y., Pappano, W.N., Troedel, J.M., Recklies, A.D., Roughley, P.J., and Greenspan, D.S. (2000). Bone morphogenetic protein-1 processes probiglycan. J. Biol. Chem. *275*, 30504-30511.

Soria, J. C., Mauguen, A., Reck, M., Sandler, A. B., Saijo, N., Johnson, D. H., Burcoveanu, D., Fukuoka, M., Besse, B., Pignon, J. P. (2013). Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann. Oncol. *24*, 20-30.

St Croix, B., Velculescu, V., Traverso, G., Romas, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B & Kinzler, K. W. et al. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium. Science. *289*, 1197-1202.

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Schil, P. E. V. et al. (2011). International association for study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J. Thorac. Oncol. *6*, 244-285.

Tsutani, Y., Miyata, Y., Nakayama, H., Okumura, S., Adachi, S., Yoshimura, M., and Okada, M. (2012). Prognostic significance of using solid versus whole tumor size on high-resolution computed tomography for predicting pathologic malignant grade of tumors in clinical stage IA lung adenocarcinoma: a multicenter study. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. *143*, 607-612.

Tsutani, Y., Miyata, Y., Nakayama, H., Okumura, S., Adachi, S., Yoshimura, M., and Okada, M. (2014). Appropriate sublobar resection choice for ground glass opacity-dominant clinical stage IA lung adenocarcinoma: wedge resection or segmentectomy. Chest. *145*, 66-71.

Valencak, J., Heere-Ress, E., Kopp, T., Schoppmann, S.F., Kittler, H., and Pehamberger, H. (2004). Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. Eur. J. Cancer. *40*, 358-364.

Vazquez, M., Carter, D., Brambilla, E., Gazdar, A., Noguchi, M., Travis, W.D., Huang, Y., Zhang, L., Yip, R., Yankelevitz, D.F., et al. (2009). Solitary and multiple resected adenocarcinomas after CT screening for lung cancer: histopathologic features and their prognostic implications. Lung Cancer. *64*, 148-154.

Vosseler, S., Mirancea, N., Bohlen, P., Mueller, M. M., and Fusenig, N. E. (2005). Angiogenesis inhibition by vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade reduces stromal matrix metalloproteinase expression, normalizes stromal tissue, and reverts epithelial tumor phenotype in surface heterotransplants. Cancer Res. *65*, 1294-1305.

Wang, B., Li, G.X., Zhang, S.G., Wang, Q., Wen, Y.G., Tang, H.M., Zhou, C.Z., Xing, A.Y., Fan, J.W., Yan, D.W., et al. (2011). Biglycan expression correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric cancer. Exp. Biol. Med. (Maywood). *236*, 1247-1253.

Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. *324*, 1-8.

Westermann, D., Mersmann, J., Melchior, A., Freudenberger, T., Petrik, C., Schaefer, L., Lullmann-Rauch, R., Lettau, O., Jacoby, C., Schrader, J., et al. (2008). Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. Circulation. *117*, 1269-1276.

White, J.D., Hewett, P.W., Kosuge, D., McCulloch, T., Enholm, B.C., Carmichael, J., and Murray, J.C. (2002). Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. Cancer Res. *62*, 1669-1675.

Xing, X., Gu, X., Ma, T., and Ye, H. (2015). Biglycan up-regulated vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and promoted angiogenesis in colon cancer. Tumor Biol. *36*, 1773-1780.

Yamamoto, K., Ohga, N., Hida, Y., Maishi, N., Kawamoto, T., Kitayama, K., Akiyama, K., Osawa, T., Kondoh, M., Matsuda, K., et al. (2012). Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. Br. J. Cancer. *106*, 1214-1223.

Yuan, Y., Jiang, Y. C., Sun, C. K., and Chen, Q. M. (2016). Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). Oncol. Rep. *35*, 2499-2515.

Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Liu, X., Zhu, Y., Lu, S., Feng, J., He, J., Han, B., Wang, J., et al. (2015). Beyond: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Phase III Study of First-Line Carboplatin/Paclitaxel Plus Bevacizumab or Placebo in Chinese Patients With Advanced or Recurrent Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. J. Clin. Oncol. *33*, 197-204.