

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山崎 まどか
学位論文題目			
<p>Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells (膵癌細胞由来の Sonic hedgehog は血管内皮前駆細胞の血管新生能を増強する)</p>			
共著者名			
<p>中村和正、水上裕輔、伊井正明、笹島順平、杉山祥晃、西川智哉、中野靖弘、柳川伸幸、佐藤一也、前本篤男、丹野誠志、奥村利勝、唐崎秀則、河野 透、藤谷幹浩、蘆田知史、Daniel C. Chung、高後 裕</p>			
Cancer Science 2008 年 4 月 (on line)			
研究目的			
<p>癌の発育・進展において血管新生は必須のプロセスであり、乏血性腫瘍といわれる膵癌においても、他の癌種と同様に血管新生は悪性度に深く関わる。腫瘍血管新生には既存の成熟血管内皮細胞の増殖・遊走による狭義の血管新生 (angiogenesis)と、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) の動員による脈管形成 (vasculogenesis)が関与することが報告されている。また、がん患者で末梢血中の EPC が増加していることや、担癌動物を用いた実験において、骨髄由来の EPC が angiogenic switch さらには転移機構にも深く関わっていることが証明されている⁽¹⁾。</p>			
<p>Sonic Hedgehog (Shh)は胎生期の原始血管叢を含む器官形成に深く関わるが、膵癌など様々な癌の形成や悪性度との関連も知られている。Shh 欠失マウスの発生期の肺において血管分岐の異常や、神経外胚葉の血管形成障害がみられることから、Shh は血管新生促進作用を有すると考えられる。また、マウス下肢虚血モデルを用いた血管再生実験において、Shh の血管新生促進効果が血管内皮細胞に対する直接作用ではなく、線維芽細胞における VEGF や Ang-1 の発現増強を介した間接的な作用であることが示された⁽²⁾。つまり、Shh は血管新生促進サイトカインの調節因子としての役割を有すると考えられている。</p>			
<p>最近、創傷治癒促進モデルにおいて Shh が EPC を介して血管新生を促進することが明らかにされた⁽³⁾。そこで、我々は膵癌細胞から分泌される SHH が骨髄由来の EPC の活性化を介して腫瘍血管新生を促進する可能性を考えた。本研究ではこの仮説を検証し、がん細胞による EPC 活性化の分子機構を明らかにする。</p>			

材 料・方 法

インフォームド・コンセントのもと旭川医科大学および旭川厚生病院で切除された膵管癌 9 症例で、癌部と非癌部における PTCH1 および CD31 の発現を免疫組織学的に解析した。

ヒト EPC の分離は、末梢血単核球をヒト fibronectin コート dish 上で血管内皮分化促進培地 (EGM-MV 培地; 5% FBS, w/o hydrocortisone) を用いて 4-7 日間培養し、付着細胞として得た。なお、末梢血単核球は健常人の末梢血および潰瘍性大腸炎患者の治療目的に行ったアフエレーシス (遠心分離方式) の際に回収されたサンプルを用いた (倫理委員会承認済み)。

293 細胞にヒト分泌型 SHH の発現ベクターをトランスフェクションし、SHH を含む培養上清 (conditioned medium; CM) を調整した。また、各種ヒト癌細胞株の CM を濃縮カラムを用いて調整した。これらの CM の存在下でヒト EPC, HUVEC, HMVEC を培養し、各種血管新生因子の発現を定量的 RT-PCR で解析した。なお、CM 中における SHH 蛋白の存在は、抗 SHH 抗体を用いた Western blotting により確認した。

次に HUVEC と DiI にてラベルした EPC をマトリゲル上にて co-culture し (EBM2, 2% FBS)、CM で刺激を行った EPC と未刺激の EPC との HUVEC の管腔形成能を比較した。

成 績

膵癌切除標本において、異型腺管のみならず、間質内の腫瘍血管内皮細胞の一部 (CD31 陽性細胞の約 6%) に PTCH1 の発現が確認された。一方、正常膵においては PTCH1 の発現は認められなかった。

培養血管内皮細胞を用いて PTCH1 の発現を定量的 RT-PCR および免疫細胞染色により解析したところ、EPC における PTCH1 の発現が HUVEC や HMVEC に比較して著しく高かった。しかし EPC においても 10 日以上長期培養によりその発現が低下した。一方、HUVEC や HMVEC などの成熟血管内皮細胞では SHH の negative regulator である hedgehog interacting protein (HIP) の mRNA 発現がみられたが、EPC では全く認められなかった。

ヒト EPC および HUVEC, HMVEC をヒト分泌型 SHH を一過性発現させた 293 細胞の CM で刺激したところ、EPC においてのみ PTCH1, GLI1 mRNA の発現増強が得られ、SHH への応答性が確認された。EPC では刺激後の VEGF, SDF-1, Ang-1 mRNA の発現が亢進したのに対し、HUVEC や HMVEC では同様の変化はなかった。

各種ヒト癌細胞株における SHH mRNA レベルは KP-1N, PK-8, Panc1 などの膵癌細胞で他臓器の癌細胞株 (胃癌、大腸癌、肝細胞癌、肺癌) に比較し発現が高かった。そのうち、最も発現レベルが高い KP-1N の CM を用いて EPC を刺激したところ、VEGF mRNA の発現が 48 時間で約 15 倍と著しく増強した。この発現増強は、SHH の中和抗体である MAB4641 および Hh 阻害剤の cyclopamine により容量依存性に抑制された。一方、SHH 発

現の低発現株である PK-1 の CM では VEGF の発現増強は軽度であった。

EPC がサイトカイン供与体として機能するか否かについて明らかにするために、マトリゲル上で EPC と HUVEC の co-culture を行い、HUVEC による管腔形成能を評価した。HUVEC 単独ではわずかにしかみられなかった管腔形成 (branch point, tube length) はより顕著に増強された。この管腔形成促進は MAB4641 および cyclopamine により部分的に抑制された。さらに、EPC の管腔への取り込みは CM 刺激の有無により影響を受けず、EPC 自身が管腔を形成する可能性は否定的であった。

考 案

SHH は胎生期の重要な morphogen であり、当初は器官形成期にのみ発現すると考えられていた。しかし最近、膵癌の発生段階において Hedgehog 経路が活性化することや、膵癌細胞が産生する SHH が autocrine に作用して、自身の増殖を促すことが報告された。今回我々は膵癌組織の血管内皮細胞の一部に PTCH1 の発現がみられることを見だし、SHH 経路の活性化が膵癌細胞の自律性増殖 (autonomous effect) のみならず、腫瘍血管新生の促進 (paracrine effect) にも貢献する可能性を示唆する実験結果を得た。

SHH の成熟血管内皮細胞への直接作用はないことが報告されているが、本実験結果からより幼弱な EPC においては SHH への応答性が確認された。EPC において PTCH1 発現が成熟血管内皮細胞に比較して高く、HIP の down regulation がみられることから、Hedgehog 経路の活性化が、EPC において選択的にみられることが示唆された。しかしながら、SHH/PTCH1 の下流で VEGF や Ang-1 などの血管新生因子がどのように調節されているのかは依然として明らかではない。

膵癌細胞株の CM を用いた EPC の刺激実験や管腔形成能の実験結果から、膵癌細胞由来の様々な因子が EPC を機能的に活性化し、直接的・間接的に腫瘍血管新生を促進することが示された。また、SHH の阻害実験により、その発現増強作用は部分的に抑制された。以上から、骨髄よりがん組織に動員された EPC はがん細胞由来の因子により活性化され、がん微小環境の形成に貢献する可能性が示唆された。また、SHH はその機構の少なくとも一部を担う重要な分子であると考えられた。

結 論

膵癌細胞より分泌される SHH は autocrine に自身の増殖を促すのみならず、EPC を介して直接的・間接的に腫瘍血管新生を促進することが示された。

SHH は癌細胞と腫瘍間質細胞の相互作用を担う分子の一つであり、SHH を標的としたがん治療は腫瘍血管新生をも阻害する可能性があると考えられた。

引用文献

1. Gao D, Naolan DJ, Melick AS, *et al.* Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008; 319: 195-8.
2. Pola R, Ling LE, Silver M, *et al.* The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 2001;7: 706-11.
3. Asai J, Takenaka H, Kusano KF, *et al.* Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* 2006;113(20):2413-24.

参考論文

1. 蓑口まどか, 柳川伸幸, 石川千里、他. 転移性膵悪性黒色腫の1例. 日本消化器病学会雑誌 104; 1082-1087, 2007.
2. Nakano Y, Tanno S, Koizumi K, *et al.* Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *British journal of Cancer* 96; 457-463, 2007.
3. Tanno S, Nakano Y, Nishikawa T, *et al.* Natural history of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas without mural nodules: long-term follow-up results. *Gut* 57; 339-343, 2008.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	山崎 まどか
<p style="text-align: right; margin-right: 20px;">審査委員長 <u>小川 勝洋</u> ㊞</p> <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">審査委員 <u>葛西 眞一</u> ㊞</p> <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">審査委員 <u>奥村 利勝</u> ㊞</p> <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">審査委員 <u>高後 裕</u> ㊞</p>			
学 位 論 文 題 目			
<p>Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells</p> <p>(膵癌細胞由来の Sonic hedgehog は血管内皮前駆細胞の血管新生能を増強する)</p>			
<p>癌の発育・進展には血管新生が必須である。癌組織における血管新生には既存の血管内皮細胞に加えて、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) の動員が重要とされている。一方、Sonic hedgehog (Shh)は胎生期の個体形成に重要な働きをする因子で、そのレセプターである Patched 1 (Ptch1)を介して転写因子 Gli を活性化し、Gli は Ptch1 および Gli 自身を活性化する。また、Shh-Patch1 経路は VEGF、Angiopoietin 1 (Ang1)などの血管新生因子の発現を促進することにより心血管系の発生に重要な働きをする。さらに、癌細胞ではしばしば Shh の発現亢進が見られることや、Shh は創傷治癒時に EPC を介して血管新生を促進することが報告されている。</p>			

本学位提出者は、Shh のレセプターである Ptch1 は正常膵組織では発現していないが、膵癌組織では一部の血管内皮に発現していることを見いだした。ヒト血管内皮細胞である HUVEC、HMVEC 及び末梢血より分離した EPC について Ptch1 mRNA、蛋白の発現を検討したところ、EPC に特異的に高発現していた。次に 293 細胞に Shh cDNA を導入して Shh を高発現させて、その培養上清を EPC に作用させたところ、Gli の発現が亢進し、Gli の転写標的である Ptch1、VEGF、SDF-1、Ang1 mRNA の発現亢進が見られ、この反応は Shh に対する中和抗体により阻止された。しかし、成熟型血管内皮である HUVEC、HMVEC ではそのような反応は見られなかった。同様の反応はヒト膵癌細胞株の培養上清を EPC に作用させた場合にも観察され、また、その反応は Shh 中和抗体及び Ptch1 inhibitor である cyclopamine によって阻止された。さらに EPC と成熟型血管内皮である HUVEC を共培養したところ、HUVEC による脈管形成が起こり、この反応は膵癌細胞の培養上清の添加によりさらに増強したが、Shh 中和抗体または cyclopamine の添加により抑制された。

以上の結果は、膵癌細胞内に動員された EPC が、膵癌細胞に由来する Shh の影響を受けて、Ptch1 経路を介して血管新生因子を産生し、腫瘍血管新生に関わる可能性を示したものである。すなわち、癌組織内環境では癌細胞由来の Shh と EPC の Ptch1 から成る paracrine 経路が、血管新生に重要な働きをすることを示唆するものであり、Shh-Ptch1 経路が癌の新たな治療標的となる可能性を示した。

本学位論文提出者は、当該分野において高い知識と経験を備えており、諮問調査においても適切な回答が得られた。よって本審査委員会は、本論文は学位論文にふさわしいものと判定した。なお、本論文は Cancer Science にすでに掲載されていることを申し添える。