

学位論文の要旨

| | | | |
|--|----|----|-------|
| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 中村 和正 |
| <p>学位論文題目</p> <p>Tumor Vasculature is a Paracrine Target of Hedgehog in Pancreatic Cancer</p> <p>(膵癌細胞が産生する Hedgehog は paracrine に作用し腫瘍血管新生を促進する)</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>Hedgehog (Hh) 経路の異常は様々な癌において見られ、そのリガンドの一つである sonic hedgehog (Shh) は主に autocrine に作用して癌細胞の自立性増殖に寄与すると考えられてきた。近年、Shh は癌細胞から間質細胞へ paracrine に作用することで腫瘍の増大に貢献することが示されており、Hh 経路の標的は癌間質である可能性がある(引用文献 1)。しかし、癌間質における Hh 応答細胞と paracrine 効果による腫瘍増殖のメカニズムは解明されていない。我々はヒト膵癌組織において Shh 受容体である Ptch1 が腫瘍血管内皮細胞に発現しており、膵癌細胞由来の Shh がヒト血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) における vascular endothelial growth factor (VEGF) や stromal derived factor-1 (SDF-1) の発現を増強し、paracrine 効果を介して血管内皮細胞の管腔形成を促進することを報告した(参考論文 1)。今回、Hh 阻害によって腫瘍血管新生が抑制されるか否か、またそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。</p> | | | |

材 料 ・ 方 法

各種ヒト膀胱癌細胞株における Hh 経路の構成分子 (Shh, Ptch1, Gli1, Smo) の発現を qPCR 法により解析した。また、Hh 阻害薬として Smo に対する選択的抑制効果を有する cyclopamine (1~10 μ M) を用い、その存在下でのヒト膀胱癌細胞株の増殖能および遺伝子発現の変化を、WST assay 法および定量的 RT-PCR 法により解析した。また、腫瘍細胞のアポトーシスを抗 Annexin V 抗体を用いた Flow cytometry 法により解析した。

ヒト膀胱癌細胞株 KP-1N を用いてヌードマウスに皮下腫瘍を作成し、cyclopamine (50mg/kg/day) を一週間連日皮下投与し、腫瘍の組織学的変化を解析した。さらに GFP マウスをドナーとした骨髄置換ヌードマウスを作成して、同様に皮下腫瘍を作成し、cyclopamine 投与実験を行い、抗 CD31 抗体、抗 VE-cadherin 抗体を用いて、腫瘍内への骨髄由来細胞の動員を免疫組織学的に解析した。また抗 NG2 抗体、抗 SMA 抗体を用い、腫瘍血管の pericyte coverage 率を算出した。Tie2/LacZ マウスをドナーとした骨髄置換ヌードマウスに KP-1N の濃縮培養上清を添加した Matrigel を皮下移植し、骨髄由来 EPC の migration に及ぼす影響を isolectin B4 および β -gal 免疫染色により解析した (Matrigel plug assay)。さらにマウス骨髄由来 EPC を 5 μ m 径の transwell に播種し、KP-1N の存在下で 8 時間後に transwell 下面へと遊走した細胞数をカウントした (EPC migration assay)。マウス骨髄 EPC の分離は、骨髄単核球をラット vitronectin コート dish 上で血管内皮分化促進培地 (EGM2-MV 培地; 10 % FBS, w/o hydrocortisone) を用いて 4-7 日間培養し、付着細胞として得た。腫瘍組織から RNA を抽出し、Hh 阻害により癌細胞および間質に起こる遺伝子変化を、それぞれヒト、マウスのプライマーを用いた qPCR 法により解析した。癌細胞による癌間質内の EPC への修飾を *in vitro* で再現するために、マウス骨髄 EPC を 0.4 μ m 径の transwell を用いて KP-1N と co-culture し、EPC の遺伝子発現の変化を解析した。

成 績

KP-1N および Suit2 において Shh mRNA の高発現が見られた。Smo の mRNA 発現は Suit2 において高かったが、KP-1N での発現は低かった。Cyclopamine の添加により、両者で Hh 経路の活性指標となる Ptch1 および Gli1 mRNA の発現低下を認め、Hh 経路の抑制が確認された。Suit2 において cyclopamine 10 μ M 処理 72 時間で約 20% の細胞数低下を認めたが、KP-1N では増殖抑制効果は見られず、また

アポトーシス誘導も起こらなかった。Hh 経路の阻害による *in vitro* での増殖抑制を受けない KP-1N を用いて xenograft を作成し、癌間質における Hh 経路の役割を解析した。cyclopamine の投与により腫瘍重量は有意に減少し、H-E 像で癌間質内に広範な壊死を認め、Ki-67 index の低下および TUNEL index の増加が見られ、*in vivo* においては Hh 経路の阻害が KP-1N の腫瘍組織に対して増殖抑制効果を示した。CD31 免疫染色で腫瘍血管の断片化と狭小化が見られ、血管密度も著しく低下した。SMA および NG2 免疫染色の結果、pericyte coverage が減少していた。GFP 骨髄置換ヌードマウスを用いて同様の実験を行い、GFP 陽性の骨髄由来細胞の一部が CD31、VE-cadherin 陽性であり、腫瘍内へ動員された骨髄由来細胞の一部が新生血管の構成要素となることが示された。これら腫瘍内への骨髄由来細胞 (EPC) の動員および腫瘍血管への取り込みは、Hh 阻害により著明に減少した。EPC migration assay の結果、膀胱癌細胞の存在下で EPC の遊走能が促進され、Hh 阻害により抑制された。また Matrigel plug assay の結果、膀胱癌細胞の培養上清が骨髄由来細胞の動員と管腔形成を促進し、同様に Hh 阻害より抑制された。Cyclopamine 処理を行った腫瘍組織において、宿主 (マウス) 由来の angiopoietin-1 (Ang-1) および insulin like growth factor-1 (IGF-1) の mRNA の発現低下が見られた。またマウス骨髄 EPC を KP-1N と co-culture した際に誘導された Ang-1 および IGF-1 mRNA も Hh 阻害により発現が低下した。

考 案

cyclopamine による Hh 阻害は顕著な血管新生の阻害を伴う腫瘍増殖の抑制をもたらし、Hh 阻害の標的が腫瘍血管である可能性が示唆され、さらに *in vitro* および *in vivo* のモデルで Hh 経路が EPC の migration および EPC を介した capillary morphogenesis にも寄与していることを確認した。また腫瘍組織における癌間質、および膀胱癌細胞と co-culture した EPC において、Hh 阻害により Ang-1/IGF-1 mRNA に同様の変化が見られており、膀胱癌細胞由来の Hh の修飾のもとで EPC 自身がこれらの因子の産生源となり新生血管の安定化に寄与している可能性がある。実際に、Ang-1 は Hh の制御を受けて肺の原始血管の発達に貢献すること、IGF-1 は P13K/Akt 経路を通して EPC を介した血管新生を増強することが報告されている。このように腫瘍血管は Hh の paracrine 効果の標的として重要な間質成分であり、Hh を標的とした癌治療薬は血管新生阻害薬としての側面を有することが示された。現在、Hh 阻害薬を用いた臨床試験が米国で進行中であり、その抗腫瘍効果のメカニ

ズムの理解は臨床的にも極めて重要である。本研究は Hh の paracrine 効果が癌細胞による血管新生促進機構の一端を担うことを解明したものであり、この経路の遮断による抗腫瘍効果を説明する重要な知見である。

結 論

癌細胞由来の Hh リガンドは paracrine 効果を介して骨髄からの腫瘍血管への動員を促進し、その結果、血管新生が誘導、安定化されることを明らかにした。Hh は癌組織と骨髄細胞のクロストークを担う因子であり、膵癌治療における有効な標的分子と考えられる。

引用文献

1. Yauch RL, Gould SE, *et al.* A paracrine requirement for hedgehog signaling in cancer. *Nature* 2008;455:406-10.
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. Yamazaki M, Nakamura K, Mizukami Y, *et al.* Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci* 99:1131-1138, 2008
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 | 中村 和正 |
| <p>審査委員長 <u>小川 勝洋</u></p> <p>審査委員 <u>牛首 文隆</u></p> <p>審査委員 <u>高後 裕</u></p> | | | |
| <p>学位論文題目</p> <p>Tumor Vasculature is a Paracrine Target of Hedgehog in Pancreatic Cancer</p> <p>(膵癌細胞が産生する Hedgehog は paracrine に作用し腫瘍血管新生を促進する)</p> | | | |
| <p>膵癌は難治性癌の一つであり、未だ治療成績が低いことから有効な治療剤の開発が望まれている。Hedgehog (Hh) 経路は胎生期の器官形成に重要な働きをするとともに膵癌を含め種々の癌で活性化していることから、癌の治療標的として注目されている。</p> <p>本学位論文提出者は Hh 経路の活性化に関する <i>smoothed (smo)</i> を抑制する <i>cyclopamine (cycl)</i> の膵癌に対する治療効果を検討した。Hh を高発現するが <i>smo</i> 発現の低いヒト膵癌細胞株 KP-1N 細胞を <i>in vitro</i> で <i>cyclopamine</i> 処理をしたところ、増殖抑制、アポトーシスは促進しなかったが、同腫瘍細胞を移植したヌードマウスに <i>cyclopamine</i> 処理を行なったところ、著明な増殖抑制と広汎な壊死が観察された。このとき、腫瘍細胞内の血管成分の減少及び狭小化が見られ、また正常構造を持つ血管</p> | | | |

が減少したことから、cyclopamine は腫瘍血管の発達を阻害する可能性が示された。一方、GFP 標識骨髄細胞で骨髄置換したヌードマウスに移植した腫瘍では、腫瘍血管構成細胞に骨髄由来細胞 (EPC) が含まれており、cyclopamine 処理により EPC の数が減少することが明らかになった。一方、EPC の遊走能は KP-1N 細胞存在化で促進され、またそれは cyclopamine で抑制されることから、腫瘍細胞の産生する Hh は Hh 経路を介して EPC の遊走能を促進することが明らかになった。さらに、移植腫瘍、培養 EPC では cyclopamine 処理により angiopoietin-1 (Ang-1) 及び insulin growth factor (IGF-1) mRNA の発現が低下した。Ang-1 及び IGF-1 は血管新生因子であることから cyclopamine による血管新生抑制は EPC の腫瘍内への遊走だけではなく、EPC による血管新生因子の産生抑制も関わっている可能性が示された。以上の結果は膀胱癌の治療標的としての Hh 経路の重要性を示すだけでなく、Hh 経路が、腫瘍における EPC による血管新生に関わっていることを示した点で重要な発見である。

本学位論文提出者は、審問審査においても当該分野について広く且つ深い知識と経験を備えていることが明らかになった。よって本審査委員会が本論文が学問論文にふさわしいものと判定した。