

【目的】 肺癌は日本を含む世界における癌関連死病因の第 1 位であり、非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) は肺癌患者の約 8 割以上を占めている。腫瘍の大部分は自身に栄養と酸素を供給させるため、腫瘍に向かって新たな血管を既存血管から新生させる (腫瘍血管新生)。血管新生に重要な働きをする血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) は NSCLC を含む多くの腫瘍で発現・分泌されており、VEGF ファミリーの 1 つである VEGF-A と血管内皮細胞 (endothelial cells, EC) に発現する VEGF 受容体 (VEGF receptor, VEGFR)、特に VEGFR2 が結合することで腫瘍血管新生は強く誘導される。近年、腫瘍の増大・浸潤・転移を防ぐことを目的に VEGF-A/VEGFR2 軸をターゲットとした抗血管新生療法が大腸癌、NSCLC、脳腫瘍、卵巣癌、乳癌などの腫瘍に選択されている。扁平上皮癌を除く NSCLC の 1 次療法に抗 VEGF-A モノクローナル抗体であるベバシズマブを併用する、または、NSCLC の 2 次療法に抗 VEGFR2 モノクローナル抗体であるラムシルマブを併用することで NSCLC 患者の奏効率、無増悪生存期間、全生存期間に有意な改善が見られた。しかし、VEGF 系を阻害しても NSCLC は増大・進展する症例が多数あり、VEGF とは異なる因子が血管新生を制御する可能性が強く示唆されるが、その因子は依然不明である。

【方法】 細胞培養には血清などの細胞外因子が用いられるが、それらを除去しなければ、細胞が分泌する液性因子を特定することは困難である。本研究では、NSCLC 細胞が分泌する VEGF とは異なる血管新生因子を探索するために、ヒト NSCLC 細胞株 A549 と EBC-1 を無血清培養に使用した。無血清培養後の NSCLC 細胞株の細胞死は光学顕微鏡による細胞観察とフローサイトメトリーを用いた解析から判断した。その後、無血清培養下においても生存可能な細胞株の培養上清を回収し、コラーゲンゲルを用いた管腔形成実験、ウェスタンブロット解析、ELISA アッセイを行った。EC にはヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein EC, HUVEC) を使用した。また、その無血清培養上清に対して LC-MS/MS を用いた網羅的タンパク質解析を実施し、その上清中の分泌タンパク質を同定した。同定されたタンパク質の中から血管新生関連因子として報告のあるタンパク質の遺伝子に対する RNA 干渉を NSCLC 細胞株に行い、その細胞株の無血清培養上清を回収することで血管新生の関与を解析した。

【結果】 無血清で培養することで A549 細胞では細胞死が観察されたが、EBC-1 細胞には細胞死は誘導されなかったことから、EBC-1 細胞は無血清培養下でも生存可能な細胞株であることが示された。EBC-1 細胞の無血清培養上清 (EBC-1 sup.) を回収して 3 次元培養下の HUVEC に添加したところ、濃度依存的に管腔形成が観察された。加えて、抗 VEGF 中和抗体を EBC-1 sup. に添加したところ、完全ではないが管腔形成は抑制された。これらの結果から、EBC-1 sup. による管腔形成は VEGF と VEGF とは別の血管新生因子によって制御されていることが示された。EBC-1 sup. を網羅的タンパク質解析した結果、1,007 個のタンパク質が同定され、その中から血管新生に関与すると報告のあるタンパク質 X の遺伝子に対する RNA 干渉を EBC-1 細胞に行い、その無血清培養上清を回収して管腔形成実験を行った。その結果、タンパク質 X をノックダウンした EBC-1 sup. による管腔形成は、コントロール処理した EBC-1 sup. と比べて軽度ではあるが有意に抑制された。以上の結果より、タンパク質 X が VEGF 非依存性の血管新生因子である可能性が示唆された。

非小細胞肺癌 (NSCLC) は血管内皮増殖因子 (VEGF) とタンパク質 X を介して腫瘍血管新生を誘導する

