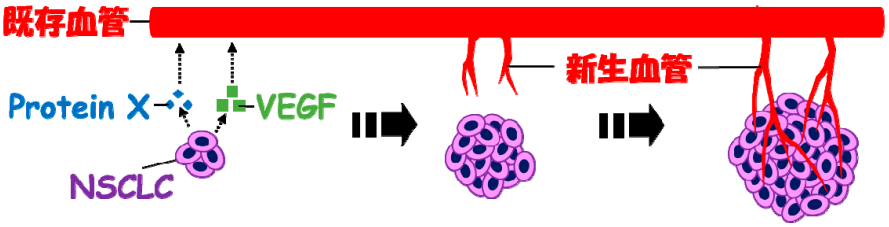
119　非小細胞肺癌における新規血管新生因子の同定	江口　良二

【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解析を実施し、その上清中の分泌タンパクを同定した。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



119. 非小細胞肺癌における新規血管新生因子の同定

江口　良二

兵庫医科大学 医学部 環境予防医学講座

Key words：非小細胞肺癌，腫瘍血管新生，VEGF

緒　言

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、肺癌患者の約８割以上を占めているのが非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）である［1，2］。切除不能の進展型 NSCLC の標準的治療法であるプラチナ製剤を中心とした併用化学療法は、臨床治験を重ねた結果、プラチナ製剤単剤よりも奏効率、平均生存期間を増加させた［3］。しかし、その期間は１年を満たないことから、新たな治療戦略の開発が急務である。

既存血管から腫瘍に向かって新たに血管が形成される現象（腫瘍血管新生）は、腫瘍に栄養と酸素を供給するだけでなく、腫瘍の進展・転移に必須である［4］。NSCLC のような腫瘍血管新生を伴う多くの腫瘍は、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）を発現している。VEGF にはファミリーが存在し、血管壁に存在する内皮細胞（endothelial cell，EC）は VEGF に結合する受容体（VEGF receptor，VEGFR）を発現する［5］。VEGF ファミリーと VEGFR のうち、特に VEGF-A と VEGFR2 の結合が腫瘍血管新生において重要な働きを担う［5］。VEGF-A と VEGFR2 が結合すると、VEGFR2 の細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化され、その下流で MAPK ファミリーの１つである細胞外シグナル制御リン酸化酵素（extracellular signal-regulated kinase，ERK）を活性化することで細胞増殖・生存が促進される［5］。VEGF-A/VEGFR2 をターゲットとした抗血管新生療法は腫瘍の増大・浸潤・転移を防ぐことを目的とした有望な治療戦略である［6］。現在では既に、VEGF-A に対するモノクローナル抗体製剤であるベバシズマブを上述の併用化学療法に追加した 1 次療法が、扁平上皮癌を除く切除不能の進展型の NSCLC 患者に使用されている［3］。さらに本邦で近年、VEGFR2 に対するモノクローナル抗体製剤であるラムシルマブをドセタキセルに追加した併用化学療法が、扁平上皮癌を含む切除不能の進展型 NSCLC の 2 次療法に承認された［3，7］。どちらの抗血管新生療法によっても NSCLC の患者の奏効率、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

1. 細胞培養、形態観察および試薬

ヒト NSCLC 細胞株 A549 と EBC-1 は RPMI-1640 培地に 10%ウシ胎児血清（fetal bovine serum，FBS）、ペニシリン（5 μg/ml）、ストレプトマイシン（5 μg/ml）、ネオマイシン（10 μg/ml）を添加して培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein EC，HUVEC）はゼラチンコート培養皿を用いて MCDB104GK 培地に 10%FBS、ウシ脳抽出物（100 ng/ml）、epidermal growth factor（10 ng/ml）、ヘパリン（100 μg/ml）、ペニシリン（5 μg/ml）、ストレプトマイシン（5 μg/ml）、ネオマイシン（10 μg/ml）を添加して培養した。培養は 37℃、95%大気、5%CO_2 で行った。光学顕微鏡を用いて位相差画像を撮影した。

2. 無血清培養

EBC-1 細胞をトリプシン処理して回収後、4℃で遠心して上清を吸引した。EBC-1 細胞ペレットを氷冷した無血清の MCDB104GK 培地で 2 回洗浄・遠心し、上清を吸引して同様の無血清培地で再懸濁した。コールターカウンター

Z1 を用いて図 1a に記した細胞密度となるように再懸濁した EBC-1 細胞を 35～100 mm の培養皿に播種し、37℃で 24 時間培養した。EBC-1 細胞の無血清培養上清 (EBC-1 sup.) は 24 時間後に同細胞を遠心して回収し、0.45 μm PVDF メンブレンフィルターでろ過およびアミコンウルトラ 3K で限外ろ過を行い濃縮した。ブラッドフォード法により濃縮した無血清培養上清のタンパク濃度を測定した。

3. フローサイトメーターを用いた細胞死解析

EBC-1 細胞を 24 時間無血清の条件下で培養後、トリプシン処理により同細胞を採取して 3×10^5 cells/ml になるように 1%FBS を含むリン酸緩衝食塩液（phosphate-buffered saline, PBS）で希釈した。その後、アネキシン-V/7-アミノ-アクチノマイシン D（7-AAD）試薬（Muse™ Annexin-V & Dead Cell Kit）を加え、Muse™ Cell Analyser を用いて解析した。

4. 管腔形成、管腔形成阻害実験及び定量解析

24 穴培養プレートを用いて、HUVEC を 1.1×10^5 cells/cm^2 の細胞密度で 2 層のコラーゲンゲルの間に挟み込み、24 時間培養した。MCDB104GK 培地と 199 培地を 13 : 7 になるように混合し、2%FBS、アスコルビン酸 (25 μg/ml)、ペニシリン（5 μg/ml)、ストレプトマイシン（5 μg/ml)、ネオマイシン（10 μg/ml）を含んだ培地（管腔誘導培地）に、VEGF-A（30 ng/ml）もしくは EBC-1 sup.（2～50 μg/ml）を加えた混合培地を用いて 24 時間管腔形成を誘導した。管腔形成阻害実験は前述の混合培地に抗 IgG2B 抗体（10 μg/ml）もしくは抗 VEGF-A 抗体（10 μg/ml）を加えて行った。管腔面積は Scion Image 4.0.3 program を用いて定量した。独立した 3 回の実験を行い、管腔形成の代表的な画像結果を示した。

5. ウェスタンブロット法

HUVEC をコラーゲンコート 60 mm 培養皿に 1×10^5 cells/cm^2 の細胞密度で播種し、MCDB104GK 培地に 10%FBS、ウシ脳抽出物（100 ng/ml)、epidermal growth factor（10 ng/ml)、ヘパリン（100 μg/ml)、ペニシリン（5 μg/ml)、ストレプトマイシン（5 μg/ml)、ネオマイシン（10 μg/ml）を添加して培養した。24 時間培養後に培地を吸引し、培養皿を PBS で洗い、無血清の管腔誘導培地で 3 時間培養した。3 時間後に上述の培地を吸引し、EBC-1 sup. (50 μg/ml) を含む無血清の管腔誘導培地単独、もしくはこの培地に抗 IgG2B 抗体か抗 VEGF-A 抗体を添加し、0～60 分の時点まで刺激した。刺激後、HUVEC からタンパクを抽出してウェスタンブロット法を以前の報告と同様に行った［8]。独立した 3 回の実験を行い、代表的な画像結果を示した。

6. ELISA 法

EBC-1 sup.（50 μg/ml）中の VEGF-A タンパク量は、VEGF-A ELISA Kit を用いて手引き書に従って測定した。

7. RNA 干渉

コントロールとして Stealth RNAi Negative Control Duplexes を、遺伝子 X に対する Stealth small interfering RNA（siRNA） duplex oligoribonucleotides を使用した。オリゴヌクレオチドは 20 μM となるように二炭酸ジエチルで処理した水に溶解した。EBC-1 細胞に対する siRNA の一過性の遺伝子導入は Lipofectamine RNAiMAX を用いて行った。遺伝子導入の際のオリゴヌクレオチドは終濃度 5 nM となるように使用し、RNA 干渉は以前の報告から一部修正して行った [8]。EBC-1 細胞を 100 mm 培養皿に 1×10^6 cells の細胞数で播種し、ペニシリン、ストレプトマイシン、ネオマイシンを含まず 10%FBS を含んだ RPMI-1640 培地をその培養皿に加え、一晩培養した。翌日、RNAiMAX とオリゴヌクレオチドの混合物を加えて培養した。48 時間培養後、培養皿の上清を吸引し、PBS で洗浄し、ペニシリン、ストレプトマイシン、ネオマイシンを含まず 10%FBS を含んだ新鮮な RPMI1640 培地に交換して培養した。24 時間培養後、トリプシン処理によって EBC-1 細胞を回収し、上述の無血清培養を行った。

8. 統計解析

実験は全て独立した 3 回の実験を行い、結果数値は全て平均値±標準誤差で示した。統計的有意差における多重解析には One-way factorial ANOVA-Bonferoni 法を用いた。

結果および考察

1. ヒト NSCLC 細胞株 EBC-1 由来の無血清培養上清には管腔形成を誘導する血管新生因子が存在する

最近、我々はヒト悪性中皮腫細胞株由来の無血清培養上清から VEGF 非依存性の新規血管新生因子を同定した[8]。本研究課題では同様の無血清培養法を用いて、NSCLC における新規血管新生因子の同定を試みた。図 1a に示すように、ヒト NSCLC 細胞株 A549 では無血清培養 24 時間後に細胞塊様の凝集と細胞収縮様の細胞死が観察された。一方で、別の細胞株 EBC-1 ではどちらの現象も観察されず（図 1a）、無血清培養時の EBC-1 細胞における細胞死解析を行ったところ、血清の有無および無血清培養時の細胞密度の増加のどちらにおいても細胞死は誘導されなかった（図 1b）。この結果から、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。次に、EBC-1 sup.を回収し、この上清が管腔形成を誘導するか試みた。その結果、EBC-1 sup.は濃度依存的に 3 次元培養下の HUVEC に管腔形成を誘導させた（図 1c）ことから、EBC-1 sup.中に血管新生因子が存在することが示された。

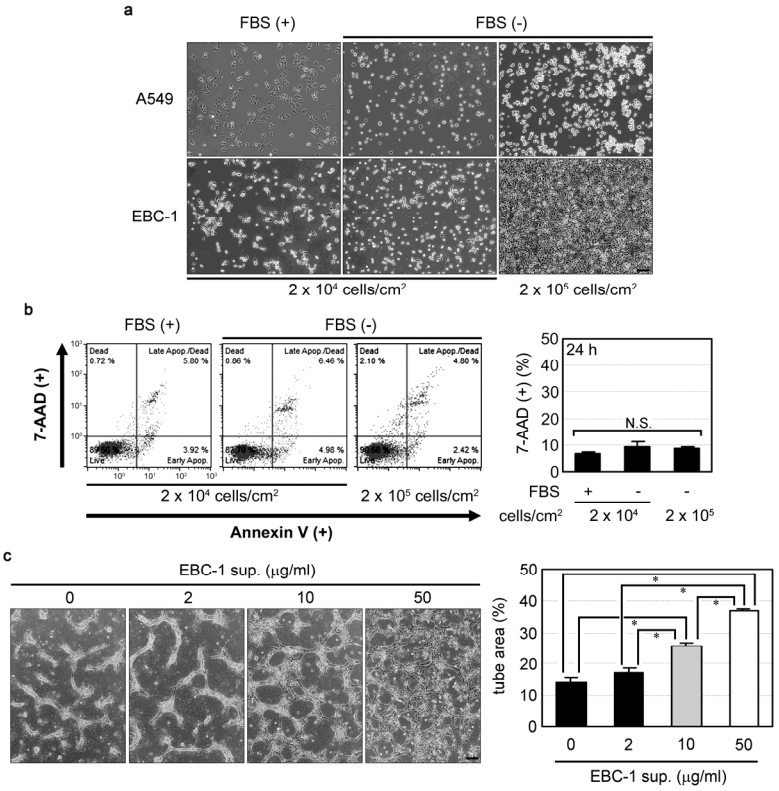


図 1. ヒト NSCLC 細胞株 EBC-1 由来の無血清培養上清（EBC-1 sup.）は管腔形成を誘導する

a）A549 細胞では無血清培養によって細胞塊様の凝集と細胞収縮様の細胞死が誘導されるのに対し、EBC-1 細胞ではそれらは誘導されない。b）アネキシン V と 7-AAD の二重染色を用いたフローサイトメトリー解析。N.S.は not significant を示す。c) EBC-1 sup.は濃度依存的に管腔形成を誘導する。a と c のスケールバーは 100 μm を示す。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。

2. EBC-1 sup.が誘導する管腔形成は VEGF 依存的・非依存的経路の両方を介して制御される

次に、VEGF が EBC-1 sup.により誘導される管腔形成のトリガーかを確かめるため、単層培養の HUVEC の VEGFR2 のリン酸化を調べた。その結果、EBC-1 sup.（50 μg/ml）は一過性に VEGFR2 と ERK1/2 をリン酸化させた（図 2a）。また、抗 VEGF-A 中和抗体（10 μg/ml）は完全ではないが有意に EBC-1 sup.による管腔形成を抑制した（図 2b）。加えて、抗 VEGF-A 中和抗体は EBC-1 sup.による VEGFR2 のリン酸化を顕著に阻害したが、ERK1/2 のリン酸化は完全には抑制できなかった（図 2c）。私たちは以前の報告で 30 ng/ml の VEGF-A による管腔形成を 10 μg/ml の抗 VEGF-A 中和抗体で完全に阻害することを示している [8]。VEGF-A に対する ELISA 法により EBC-1 sup.（50 μg/ml）中の平均 VEGF-A 濃度は 16.47±2.65 ng/ml であったことから、抗 VEGF-A 中和抗体は VEGF-A の活性を十

分阻害していることが考えられる。これらの結果から、EBC-1 sup.が誘導する管腔形成はVEGF 依存的・非依存的経路の両方を介して制御されることが示唆された。

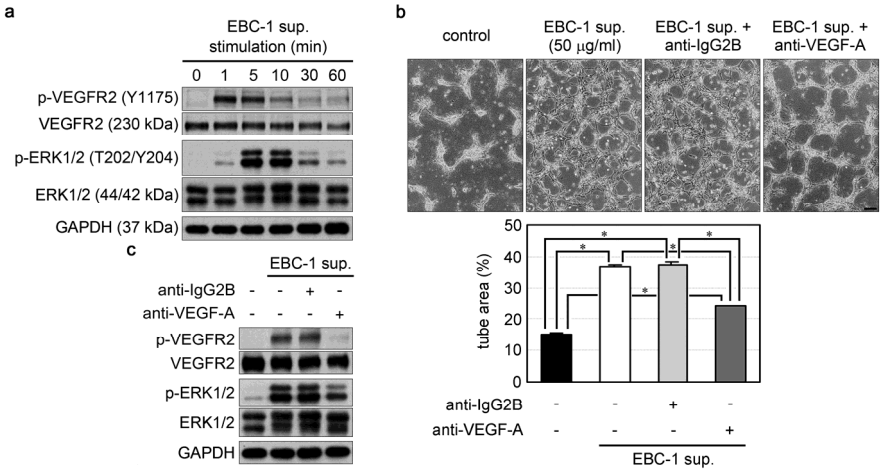


図 2. EBC-1 sup.はVEGF 依存的・非依存的経路の両方を介して管腔形成を誘導する

a) EBC-1 sup. (50 μg/ml) は一過性にVEGFR2 とERK1/2 を活性化させる。b) 抗VEGF-A 中和抗体は完全にはEBC-1 sup. による管腔形成を抑制できない。スケールバーは100 μm を示す。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。c) ERK1/2 のリン酸化はVEGF-A 依存的・非依存的経路の両方で誘導される（刺激処理5 分)。

3. タンパク質X はEBC-1 細胞 におけるVEGF 非依存性の血管新生因子である

EBC-1 sup.により誘導されるVEGF 非依存的血管新生を制御する液性因子を探索するため、LC-MS/MS を用いた網羅的タンパク解析を行った。その結果、EBC-1 sup.中のタンパク質1,007 個が2 回の解析より同定（再現）された。接着タンパクや細胞骨格タンパクがその多くを占めていることから、EBC-1 sup.中にはエクソソームのような細胞小胞（microvesicle）が存在することが示唆された。1,007 個のタンパク質の中から血管新生に関連すると報告されている因子を探索した結果、VEGF を除いた9 個のタンパク質がEBC-1 sup.中に存在した。その中のタンパク質X についてRNA 干渉を行って解析したところ、今回使用したsiRNA で処理したEBC-1 細胞は無血清培養中においても生存可能であることが確認された（図3a)。さらに、RNA 干渉によりタンパク質X をノックダウンしたEBC-1 sup.はvehicle 処理やコントロールsiRNA 処理したEBC-1 sup.と比べて軽度ではあるが有意に血管新生を抑制した（図3b)。これらの結果から、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。

タンパク質X に対する中和抗体は商業的に入手困難である（販売していない）ため、今後はタンパク質X の遺伝子に対する別のsiRNA 配列を用いて今回示された結果と同様の結果が得られるかについて解析を行う。また、同定された他の8 つのタンパク質に対する中和抗体実験やRNA 干渉を行い、EBC-1 sup.による血管新生に関与するかについて解析する。さらに、タンパク質X の遺伝子に対してsiRNA 処理したEBC-1 sup.と抗VEGF-A 中和抗体を用いることで抗VEGF-A 抗体単独よりも血管新生阻害効果が得られるかについても実験を行う予定である。

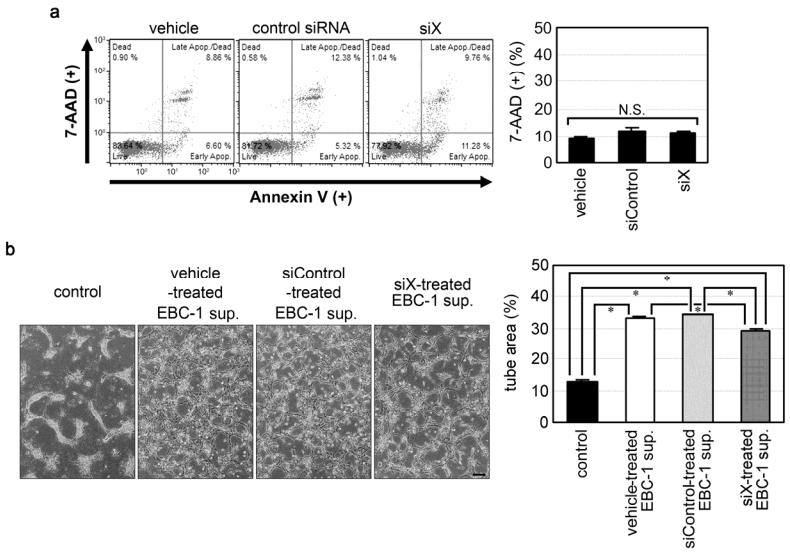


図 3. タンパク質 X は EBC-1 sup.による VEGF 非依存性の血管新生に関与する

a) EBC-1 細胞のタンパク質 X の遺伝子に対する RNA 干渉は EBC-1 細胞における無血清培養に影響を与えない。N.S.は not significant を示す。b) タンパク質 X をノックダウンした EBC-1 sup.は vehicle 処理やコントロール siRNA 処理をした EBC-1 sup.と比べて軽度ながら有意に血管新生を抑制する。スケールバーは 100 μm を示す。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。

共同研究者

本研究は、兵庫医科大学環境予防医学講座の若林一郎教授とともに行った研究である。

文　献

1) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. Epub 2016 Jan 7. DOI: 10.3322/caac.21332.

2) Inoue M, Sawada N, Matsuda T, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Shibuya K, Tsugane S. Attributable causes of cancer in Japan in 2005--systematic assessment to estimate current burden of cancer attributable to known preventable risk factors in Japan. Ann Oncol. 2012 May;23(5):1362-9. Epub 2011 Nov 2. DOI: 10.1093/annonc/mdr437.

3) Villaruz LC, Socinski MA. The role of anti-angiogenesis in non-small-cell lung cancer: an update. Curr Oncol Rep. 2015 Jun;17(6):26. DOI: 10.1007/s11912-015-0448-y.

4) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 1996 Aug 9;86(3):353-64. PMID:8756718.

5) Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol. 2002 Nov 1;20(21):4368-80. DOI: 10.1200/JCO.2002.10.088.

6) Ebos JM, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. Nat Rev Clin Oncol. 2011 Mar 1;8(4):210-21. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.21.

7) Yoh K, Hosomi Y, Kasahara K, Yamada K, Takahashi T, Yamamoto N, Nishio M, Ohe Y, Koue T, Nakamura T, Enatsu S, Lee P, Ferry D, Tamura T, Nakagawa K. Lung Cancer. 2016 Sep;99:186-93. Epub 2016 Jul 18. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.07.019.

8) Eguchi R, Nakano T, Wakabayashi I. Progranulin and granulin-like protein as novel VEGF-independent angiogenic factors derived from human mesothelioma cells. Oncogene. 2017 Feb 2;36(5):714-722. Epub 2016 Jun 27. DOI: 10.1038/onc.2016.226.