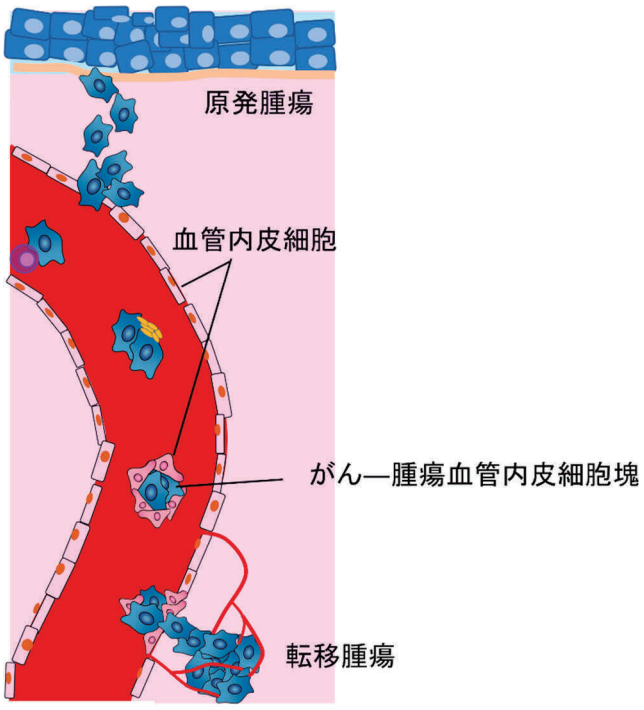
220　腫瘍血管の役割解明による新規診断・治療法の開発	間石　奈湖

【目的】腫瘍血管はがんへの栄養・酸素の供給や、転移の関門としての役割を担っている。我々はこれまで、腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞が様々な異常性を示すことを見出してきた。また、異常性を獲得した腫瘍血管内皮細胞が、がんの転移促進に関与することも報告してきた。近年、血行性転移の際に血管内に侵入したがん細胞は、時にがん細胞同士やその他の間質細胞、血小板などと細胞塊を形成することが知られている。我々はこれまで、腫瘍血管内皮細胞が様々な接着分子や Angiocrine factor と呼ばれるサイトカイン等を高く発現することを見出しており、腫瘍血管内皮細胞が接着因子の発現を介してがん細胞と細胞塊を形成し、Angiocrine factor などにより循環血流内におけるがん細胞の生存や転移先臓器への接着を促進して、転移をほう助しているのではないかと考えた。本研究では、腫瘍血管内皮細胞ががん細胞と細胞塊を形成することで、血管内侵入したがん細胞の転移形成を促進していると仮説を立て、担癌患者の血液中におけるがん細胞と血管内皮細胞の細胞塊の存在を明らかにするとともに、それらと予後との関連など臨床的意義について分子機構とともに解明することを目的とした。

【方法と結果】腎癌初期症例の手術摘出組織標本を用いて組織学的に観察したところ、血管腔内に血管内皮細胞で囲まれるがん細胞塊が存在する症例が複数みられた。また、そのような症例では無増悪生存期間が短く、3 年以内の再発転移率が高いことが示された。がん細胞塊の形成ががんの悪性化に与える影響について、非接着カルチャープレート上でがん細胞と腫瘍血管内皮細胞を共培養し、がん―腫瘍血管内皮細胞塊を作製し検討した。がん―腫瘍血管内皮細胞塊形成により浸潤能が亢進し、さらにマウス尾静脈注射により、肺転移形成能が高いことが示された。トランスクリプトーム解析により、がん―腫瘍血管内皮細胞塊ががん悪性化に関わる分子機構について検討し、絞り込んだ分子の機能について siRNA を用いて検討したところ、分子の発現抑制によりがん―腫瘍血管内皮細胞塊の浸潤能が低下した。これらの腎癌組織における発現と予後との関連についてさらに検討する予定である。

がん―腫瘍血管内皮細胞塊形成によるがんの転移促進



220. 腫瘍血管の役割解明による新規診断・治療法の開発

間石　奈湖

北海道大学 大学院歯学研究院 血管生物分子病理学教室

Key words：がん，腫瘍血管，循環腫瘍細胞，がん―腫瘍血管内皮細胞塊

緒　言

腫瘍血管はがんへの栄養・酸素の供給や、転移の関門としての役割を担っている。我々はこれまで、腫瘍血管を構成する血管内皮細胞（腫瘍血管内皮細胞）が、正常組織の血管内皮細胞（正常血管内皮細胞）と比較して染色体不安定性や薬剤耐性を示すこと、サイトカイン等の発現が亢進していることなど、様々な違いがあることを見出している［1］。また、がんの悪性度が異なると、そのがん由来の腫瘍血管内皮にも血管新生能やサイトカイン発現量などに違いがあり、ひとくちに腫瘍血管内皮細胞といっても多様性があることを見出している［2］。さらに、高転移腫瘍内でより異常性を獲得した血管内皮細胞が、糖タンパク Biglycan を分泌してがん細胞の遊走を刺激し、がんの血管内侵入ならびに肺転移を促進することを報告した［3］。したがって、腫瘍血管内皮細胞は血行性転移の経路の入り口となるだけではなく、積極的にがんの転移など、悪性化に影響を与えうることが示唆され、転移の新たな機序を世界で初めて明らかにした。

腫瘍血管を裏打ちする腫瘍血管内皮細胞は、正常血管内皮に比べて血管内皮細胞同士の結合が疎であり、ペリサイトや基底膜との結合力が弱いことから、容易に剥がれ落ちて血液中を循環することが知られている（循環腫瘍血管内皮細胞）。循環腫瘍血管内皮細胞の役割については未だ不明である。一方で、血管内に侵入したがん細胞は、時にがん細胞同士やその他の間質細胞、血小板などと細胞塊を形成している様子が組織像で観察されている［4］。しかし、これらの間質細胞が血行性転移の過程において、どのような役割を果たしているかについてはいまだ不明な点が多い。担癌患者の血液中において、原発巣から剥がれ落ちたがん細胞が検出される（循環腫瘍細胞）が、転移巣形成にはがん細胞の血流中での生存と転移先臓器への接着が必須であり、血中がん細胞の数に比べて転移形成率が低いことも報告されている。原発巣から循環血流内へと侵入したがん細胞は、足場の無い状態で循環血流に曝されるが、がん細胞が転移先臓器に辿り着くには、アノイキス（足場がないことによる細胞死）や血流によるシェアストレスに耐えなければならない。血管内皮細胞はその解剖学的位置から、常に循環血液によるシェアストレスにさらされており、その耐性は高い。我々はこれまで、腫瘍血管内皮細胞が様々な接着分子や Angiocrine factor と呼ばれるサイトカイン等を高く発現することを見出していることから、腫瘍血管内皮細胞が接着因子の発現を介してがん細胞と細胞塊を形成し、Angiocrine factor などにより循環血流内におけるがん細胞の生存や転移先臓器への接着を促進して、転移をほう助しているのではないかと考えた。

本研究では、腫瘍血管内皮細胞ががん細胞と細胞塊を形成することで、血管内侵入したがん細胞の転移形成を促進していると仮説を立て、担癌患者の血液中におけるがん細胞と血管内皮細胞の細胞塊の存在を明らかにするとともに、それらと予後との関連など臨床的意義について分子機構とともに解明することを目的とした。

方法および結果

1．がん―腫瘍血管内皮細胞塊の検出と臨床的意義の解明

腎癌初期症例の手術摘出組織標本を用いて、H-E 染色ならびに組織免疫染色を行った。血管内皮マーカーCD34 で可視化される血管腔内に、血管内皮細胞で囲まれるがん細胞塊が存在する症例が複数みられた（図 1）．これら

のがん―腫瘍血管内皮細胞塊がん患者の予後に与える影響を解析するため、がん―腫瘍血管内皮細胞塊の存在と無増悪生存期間（Progression-Free Survival）との関連を解析した。がん―腫瘍血管内皮細胞塊が存在する症例では無増悪生存期間が短く、3 年以内の再発転移率が高いことが示された。

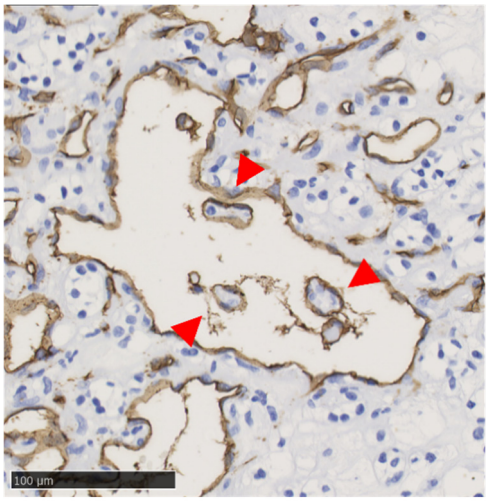


図 1. 血管腔内にみられるがん―腫瘍血管内皮細胞塊
腎癌組織の CD34 免疫染色像。血管内皮細胞が茶色に染まっている。血管の中に、血管内皮細胞で囲まれるがん細胞塊が観察される（矢頭）。スケールバー：100 μ m。

2. がん―腫瘍血管内皮細胞塊形成によるがん悪性化の検討

がん―腫瘍血管内皮細胞塊の形成ががんの悪性化に与える影響について、*in vitro* および *in vivo* で検討した。非接着カルチャープレート上でがん細胞と腫瘍血管内皮細胞を共培養し、がん―腫瘍血管内皮細胞塊を作製した（図 2）。比較対象として、がん細胞単独培養で作製したがん細胞塊、がん細胞と正常血管内皮細胞を共培養して作製したがん―正常血管内皮細胞塊を用いた。がん―腫瘍血管内皮細胞塊形成により、がん細胞の増殖能、血管内皮細胞層への接着能に 3 群間で違いは見られなかったが、浸潤能は亢進した。さらに、それぞれの細胞塊をマウス尾静脈から注射し、転移能を *in vivo* イメージング装置で評価したところ、がん―腫瘍血管内皮細胞塊は他の 2 群よりも転移形成能が高いことが示された。

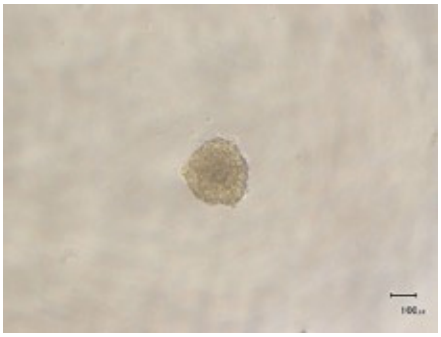


図 2. がん―腫瘍血管内皮細胞塊
非接着カルチャープレート上でがん細胞と腫瘍血管内皮細胞を 48 時間共培養後、顕微鏡下で観察。スケールバー：100 μ m。

3. がん―腫瘍血管内皮細胞塊によるがん悪性化に関わる分子の網羅的解析

がん細胞と血管内皮細胞を共培養して細胞塊を形成後、コラゲナーゼを用いて細胞塊をばらばらにし、セルソーターを用いてがん細胞と血管内皮細胞をそれぞれソーティングした。トランスクリプトーム解析を行い、がん―腫瘍血管内皮細胞塊がん悪性化に関わる分子機構について検討した。血管内皮細胞が発現する分子、ならびにそれらと細胞塊を形成することで影響を受けるがん細胞が発現する分子や活性化するパスウェイを IPA（オミックス解析などのデータをもとにして生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行うことができるソフトウェア）を用いて絞り込んだ（図 3）。

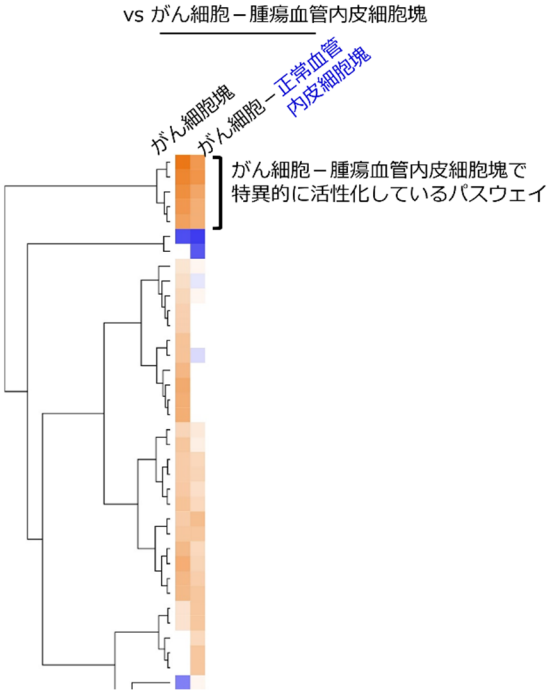


図 3. トランスクリプトーム解析・パスウェイ解析の結果
がん―腫瘍血管内皮細胞塊において特異的に活性化しているパスウェイ。

4. 標的分子の機能的解析と診断・治療への応用

項目 3 で絞り込んだ分子の機能について、siRNA を用いて発現抑制後に *in vitro* で評価したところ、分子の発現抑制によりがん―腫瘍血管内皮細胞塊の浸潤能が低下した。これらの腎癌組織における発現と予後との関連についてさらに検討する予定である。

考　察

本研究により、がん細胞が転移の初期のステップとして血管内侵入する際に、腫瘍血管内皮細胞と共に細胞塊を形成することが示された。さらに、腫瘍血管内皮細胞と細胞塊を形成することで転移先での浸潤能など転移形成を有利にしていることが示唆された。その分子機序として、腫瘍血管内皮細胞で高発現している分子の関与が示唆された。今後、それらの分子を発現するがん―腫瘍血管内皮細胞塊の有無と臨床病理学的因子との関連を評価し、予後予測因子としての可能性を探る予定である。本研究で得られた知見をもとに、がんの転移の予測診断、ならびに転移を抑制する治療薬の開発へとつなげていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院歯学研究院血管生物分子病理学教室の樋田京子教授と教室員の皆様、北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室の篠原信雄教授と教室員の皆様、北海道大学大学院工学研究院マイクロシステム化学研究室の渡慶次学教授、真栄城正寿准教授、藤田医科大学先端ロボット・内視鏡手術学教室の樋田泰浩教授、北海道大学病院病理部の松野吉宏教授である。ここに深謝の意を表します。

文　献

1） Hida K, Hida Y, Amin DN, Flint AF, Panigrahy D, Morton CC, Klagsbrun M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. Cancer Res. 2004 Nov 15;64(22):8249-55. PMID: 15548691 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1567

2） Ohga N, Ishikawa S, Maishi N, Akiyama K, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Ohmura H, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K. Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells: Comparison between Tumor Endothelial Cells Isolated from High- and Low-Metastatic Tumors. Am J Pathol. 2012 Mar;180(3):1294-1307. PMID: 22245217 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.035

3） Maishi N, Ohba Y, Akiyama K, Ohga N, Hamada J, Nagao-Kitamoto H, Alam MT, Yamamoto K, Kawamoto T, Inoue N, Taketomi A, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. Sci Rep 6, 28039 (2016). PMID: 27295191 DOI: 10.1038/srep28039

4） Fabisiewicz A, Grzybowska E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. Med Oncol 34, 12 (2017). PMID: 28012133 DOI: 10.1007/s12032-016-0875-0