

論文内容の要旨

論文題目

MMP-7 reactivates latent VEGF and promotes angiogenesis in the tumor environment

(MMP-7による VEGF 活性化に伴うがん特異的血管新生機構)

氏名 伊藤 孝

序論

成体において血管新生は非常に厳密に制御されており、女性の性周期に関わる器官を除き通常血管新生は起こっていない。一方がん組織では血管新生は継続的に亢進されており、がん悪性化の一因となっている。がん化により血管新生が起こるメカニズムに関して解明されていない疑問のひとつが、正常組織由来の種々の細胞が VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) を始めとする種々の血管新生因子を産生するにも関わらず、正常組織では血管新生を起こさない点である。また正常組織由来の細胞はがん組織中にも存在するが、これらの細胞ががん組織においてどのように血管新生に影響するかもよく分かっていなかった。本研究では、正常組織において血管新生因子 VEGF が不活性化される機構をいくつかのモデルを用いて見出した。さらにこの不活性化した VEGF ががん組織においてはがん細胞によって活性化され、がん組織内限局的に利用されることも見出した。VEGF を再活性化する因子として、がん細胞特異的に産生される細胞外タンパク分解酵素 MMP-7 (Matrix Metalloproteinase-7) を同定した。以下に VEGF 活性制御機構に関して、モデルとした 1. 線維芽細胞、2. 血管内皮細胞、3. 大腸組織の 3 点に分けて述べる。

結果

1. 線維芽細胞由来 VEGF の活性制御機構

線維芽細胞は正常組織にもがん組織にも多量に存在する細胞種である。線維芽細胞はいずれの組織においても VEGF を発現することが知られていたが、血管新生にどの程度影響するかはよくわかっていなかった。線維芽細胞由来 VEGF ががん組織選択的に利用される仕組みがあるかを以下のように検討した。

がん環境において線維芽細胞由来 VEGF が血管新生能を持つか解析するために、ヒト線維芽細胞 VA-13 をヒト膵がん細胞 Capan-1 とともにヌードマウス皮下に植え形成されたがん組織を評価した。その結果、線維芽細胞 VA-13 を加えたがんでは体積と組織内血管密度が増加した。siRNA により線維芽細胞 VA-13 の VEGF 発現を抑制することでこれらの効果が抑制された(図 1a)ことから、線維芽細胞 VA-13 由来 VEGF はがん環境において血管新生を亢進することを示した。

非がん環境における線維芽細胞 VA-13 由来 VEGF の血管新生能を評価するために、線維芽細胞 VA-13 を単独でヌードマウス皮下、ニワトリ胎児漿尿膜内に移植した。がん環境に植えた際とは対照的に、どちらの動物内においても血管新生を亢進しなかった。さらに線維芽細胞 VA-13 培養上清は血管新生を亢進しないことも管腔形成法により確認した。なお培養上清中には VEGF が分泌されていることを ELISA により確認した。これらの結果より、線維芽細胞 VA-13 由来 VEGF は不活性化した状態で分泌されている可能性を考えた。また上記段落の結果も合わせると、がん環境ではこの不活性化した VEGF が活性化される機構があると考えた。

上記の分子機構として、線維芽細胞 VA-13 由来の VEGF は CTGF により不活性化され正常組織では機能しないこと、がん組織ではがん細胞が産生する MMP-7 の作用で VEGF が再活性化されがん選択的に血管新生を亢進することを示した。線維芽細胞 VA-13 培養上清を MMP-7 で処理する事により培養上清の血管新生能が誘発され、その効果は抗 VEGF 中和抗体により抑制されることを管腔形成法で示した。このことから MMP-7 は線維芽細胞由来の不活性化した VEGF を活性化することが示された。また MMP-7 により誘発された血管新生能は CTGF 添加によっても抑制されたことから、CTGF が線維芽細胞由来の VEGF を不活性化することが示された。これらの分子機構ががん組織内においても働くか検討するために、siRNA によりがん細胞 Capan-1 の MMP-7、線維芽細胞 VA-13 の CTGF の発現を抑制した後にヌードマウスに植え、形成されたがん組織を解析した。その結果、がん細胞 Capan-1 の MMP-7 発現を抑制することで線維芽細胞 VA-13 由来の VEGF による血管新生効果が失われた(図 1b)。さらに線維芽細胞 VA-13 の CTGF 発現を抑制する事で、MMP-7 抑制によって失われた効果が再び現れた(図 1b)。これらの結果より、in vivo モデルでも同様の機構が働く可能性を示した。

さらにこの分子機構が VA-13 以外の線維芽細胞でも働くかを検討した。種々の肺がん患者、膵がん患者由来の初代培養線維芽細胞において、VEGF が線維芽細胞 VA-13 と同程度発現していることを定量性 PCR で確認した。さらに CTGF も高発現しており、MMP-7 は発現が見られず、これらの発現パターンは線維芽細胞 VA-13 に類似していた。このうちの膵がん患者由来初代培養線維芽細胞の培養上清を用いて線維芽細胞 VA-13 同様に MMP-7 処理により培養上清中 VEGF が活性化されること、CTGF により不活性化されることを管腔形成法で示した。

これらの結果より、今回の分子機構は線維芽細胞間である程度の共通性をもつと考えている。

以上、線維芽細胞由来 VEGF は CTGF により不活性化されており、がん細胞が産生する MMP-7 により再活性化されることで、がん環境内特異的に活性を持ち血管新生を亢進することを *in vivo*、*in vitro* 実験モデルにおいて示した。概要を図 2 に示す。

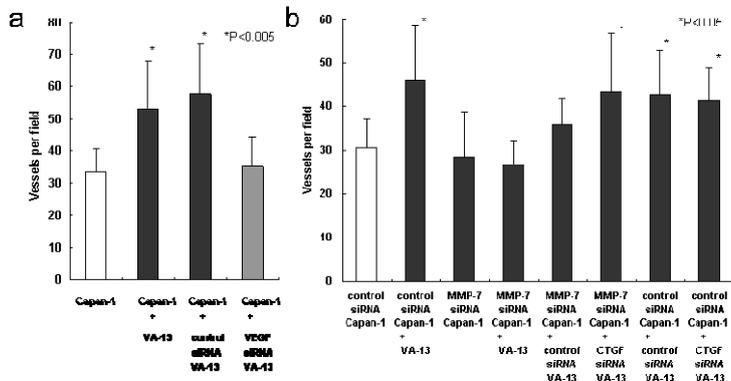


図1 線維芽細胞VA-13由来VEGFはCTGFにより不活性化され、腫瘍内でがん細胞の産生するMMP-7により再活性化される。種々のsiRNAで処理したがん細胞Capan-1と線維芽細胞VA-13をヌードマウス皮下に植え形成された腫瘍の血管密度を2週後に評価した。a. 線維芽細胞VA-13由来VEGFの腫瘍血管密度への影響 b. がん細胞Capan-1由来MMP-7と線維芽細胞VA-13由来CTGFの影響

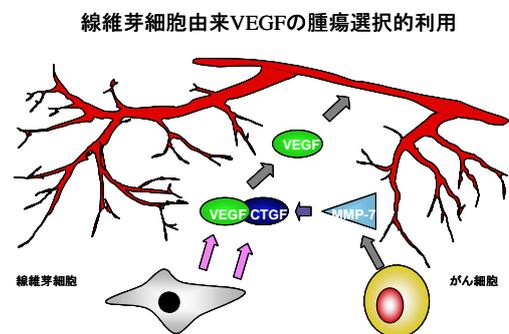


図2 線維芽細胞由来VEGFの活性制御に関するモデル。正常組織では線維芽細胞由来のVEGFはCTGFの作用により不活性化される。がん組織ではがん細胞由来のMMP-7の作用で再活性化され血管新生を亢進する。

2. 血管内皮細胞周囲における VEGF の活性制御機構

VEGF は血管新生を亢進する際に、血管の構成細胞である血管内皮細胞上のレセプターに結合する必要がある。しかし血管内皮細胞は、VEGF に結合しその機能を抑制することで知られる sVEGFR-1 (soluble VEGF Receptor-1) を大量に産生する。したがって血管内皮細胞周囲には sVEGFR-1 が存在しており、VEGF が近くにきたとしても機能が抑えられてしまうと考えられる。それにも関わらずがん組織において VEGF によって血管新生亢進が起こる機構は分かっていなかった。この際にも MMP-7 が sVEGFR-1 を分解することで VEGF を再活性化し血管新生を亢進することを示した。

始めに MMP-7 がヒトリコンビナント sVEGFR-1 を分解することをウェスタンブロットで検討した。時間依存的に sVEGFR-1 のバンドの減少とともに、分解断片と予想される低分子量のバンドの生成が見られた。さらにヒト血管内皮細胞 HUVEC 培養上清中の内因性の sVEGFR-1 も MMP-7 により分解されることも確認した。管腔形成法において sVEGFR-1 添加により VEGF の血管新生効果を抑制したが、MMP-7 処理により再び効果が表れた(図 3)。この効果は VEGF 中和抗体添加により抑制された(図 3)。同様の結果が別の *in vitro* の血管新生評価法である血管内皮細胞の遊走能測定に関しても得られた。これらの結果より、MMP-7 は sVEGFR-1 により不活性化された VEGF を再活性化することが示された。

血管内皮細胞の周囲において VEGF が血管内皮細胞由来の sVEGFR-1 に捕捉されるモデルとして、血管内皮細胞 HUVEC の培養上清に VEGF を外から添加し、共免疫沈降で複合体の形成を確認した。その結果、添加したフリーの VEGF に血管内皮細胞由来の sVEGFR-1 が結合した。さらに MMP-7 で処理することで、VEGF に結合する sVEGFR-1 が減少した。その一方で VEGF 量の減少や、分解断片の形成は見られなかった。以上の結果より、VEGF は血管内皮細胞の周囲で sVEGFR-1 により捕捉されるが、MMP-7 存在下では再び遊離し活性化されることが示唆された。MMP-7 の発現はがん組織内に限定されることから、この機構ががん環境でも起こる可能性があると考えている。図 4 にモデルを示す。

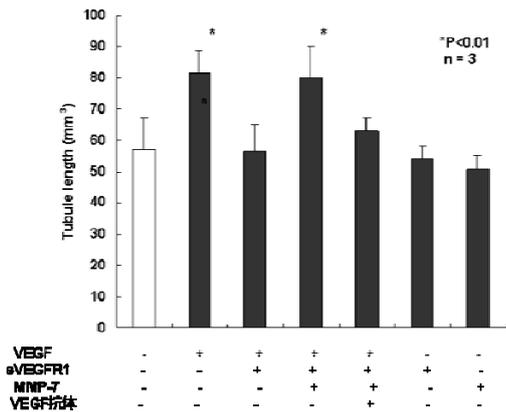


図3 sVEGFR-1によるVEGF抑制に対するMMP-7の影響の評価
ヒト血管内皮細胞HUVECを用いた管腔形成法により評価。
MMP+群はMMP-7で37度24時間処理した溶液

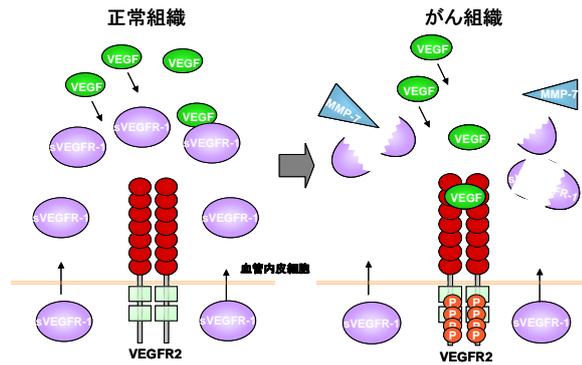


図4 血管内皮細胞周囲におけるVEGF活性制御に関するモデル
正常環境では血管内皮細胞の周囲に産生されるsVEGFR-1の作用によりVEGFは血管内皮細胞にアクセスできない。
がん環境ではMMP-7の作用によりsVEGFR-1が分解されることでVEGFが開放、血管内皮上のレセプターに結合し、血管新生を亢進する。

3. ヒト大腸組織における MMP-7、VEGF と血管新生の関係

上記実験モデルで示した、MMP-7によるVEGFの活性化が実際のヒトでも起こる可能性があるかを大腸がん患者37例の手術検体を用いて検討した。正常大腸組織、大腸がん組織におけるVEGF、CTGF、sVEGFR-1、MMP-7の発現を定量PCRにより調べた。VEGFはがん組織において発現が亢進したが、その一方で正常組織にも発現が見られた。CTGFとsVEGFR-1は両組織で同程度の発現が見られた。MMP-7は正常組織ではほとんど検出できず、がん組織で約140倍発現が亢進していた。この結果は、正常組織ががん化し血管新生が起こるようになる際に、VEGFの発現亢進だけではなく、MMP-7によるVEGF活性化がヒト組織においても必要な可能性を示唆する。

さらにがん組織における血管新生とMMP-7、VEGFの発現との相関も調べた。VEGF発現が高くMMP-7が低い症例では血管新生亢進は見られない一方で、VEGF、MMP-7をともに高発現する症例群では血管新生が有意に亢進していた。以上より、実際のヒト大腸がんにおいても本研究で示したようなMMP-7によるVEGFの活性化が起こる可能性が示唆される。

結論

ヒト線維芽細胞、ヒト血管内皮細胞、そしてヒト大腸組織を用いてMMP-7がVEGFを活性化することでVEGFががん環境選択的に利用される可能性を示した。この機構ががん組織と正常組織の血管新生制御の差を生む一因となる可能性があると考えている。この機構はがん細胞が種々の正常組織由来細胞を自身の成長のために利用する巧妙な戦略であるとも言える。