

論文の内容の要旨

論文題目 血管新生におけるテトラスパニン CD82 分子の生物学的及び臨床的意義

氏名 野村 さや香

<背景と目的> 近年の癌医療の流れは、従来の殺細胞型抗癌剤から分子標的薬の導入により、腫瘍縮小だけでなく、癌と共存しながら患者の生存期間を延長させるという方向に変わりつつある。癌の増大と転移には血管新生が必要不可欠であり、腫瘍局所の低酸素状態や癌抑制遺伝子の変異によって、癌細胞等の VEGF 産生が亢進することから、その中心的役割を担う VEGF/VEGFR 系を標的とした阻害剤の開発が進められている。また、血管新生が病態に大きく関与する疾患群が血管新生病として注目されており、癌の増殖に加え、糖尿病性網膜症などの眼内血管新生病や関節リウマチなどの慢性炎症性疾患、さらに粥状動脈硬化症などの生活習慣病も含まれ、病態特異的な血管治療の研究や臨床応用に大きな期待が集まっている。当研究室では、 $\beta 1$ インテグリンと平行して CD82 の研究が進められ、CD82 が $\beta 1$ インテグリンと相互作用し、 $\beta 1$ インテグリンと同様の作用を有することを明らかにし、この 2 つの分子が密接に関連することを報告してきた。さらに、 $\beta 1$ インテグリンは血管内皮細胞にも発現し、血管新生の様々な過程に関与していることが報告され、その中でも VLA-3、VLA-4、VLA-5、VLA-6 は CD82 と相互作用することが明らかにされ、CD82 は、 $\beta 1$ インテグリンとともに血管新生に関与する可能性があると思われた。

CD82 は、テトラスパニンファミリーに属する、4 回膜貫通型分子である。テトラスパニンは生体内に広く存在し、ヒトでは少なくとも 33 種類のファミリー分子が知られている。CD82 をはじめ、テトラスパニン分子の多くがインテグリンと複合体を形成することが知られており、このファミリー分子の機能の特徴として、細胞膜上で複数の蛋白質を会合させ、テトラスパニンウェブと呼ばれるような複合体を形成することが挙げられ、それによって蛋白質間の相互作用を促進し、細胞接着、遊走、増殖、分化などの細胞機能に関与し、さらに、生体レベルで様々な現象に関わっている。CD82 は当初、リンパ球表面分子としてクローニングされ、免疫系細胞における報告が多くなされたが、前立腺癌細胞転移株を用いた遺伝子解析やヒトの前立腺癌での発現レベルの検討から、CD82 の発現と遠隔転移・癌の進行度が逆相関していることが明らかとなり、転移抑制遺伝子 *KAI1* (kangai1) / CD82 として報告された。その後、様々な癌細胞株において CD82 の転移抑制効果が示されたが、癌の進行や転移に深く関与する血管新生における報告はされていない。本研究において、血管新生における CD82 の生物学的意義を明らかにするために、当研究室で樹立した抗 CD82 抗体 (4F9、6D7、8E4) を用いてヒト臍帯静脈内皮

細胞 (HUVEC) における CD82 の機能解析を行い、さらに、CD82 をノックダウンした HUVEC を用いて同様の検討を行い、そのメカニズムについて考察した。

<結果と考察> 当研究室で樹立した 3 種類の抗 CD82 抗体 (6D7,8E4,4F9) を用いて、HUVEC における CD82 の発現をフローサイトメトリーで検討し、各抗体による発現認識に差がないことを確認し、*in vitro* 2 次元血管新生アッセイを行った。その結果、3 種類の抗体のうち、4F9 で最も強い血管新生阻害効果が認められたため、HUVEC における CD82 の機能について、4F9 を用いて検討することとした。

まず、VEGF の最も基本的かつ重要な作用である細胞増殖について、CD82 の機能を検討するために、³H-TdR を行った。その結果、抗 CD82 抗体 (4F9) の刺激によって、48 時間の培養条件で VEGF に誘導される HUVEC の増殖はコントロール群と比較して有意に抑制され、CD82 は VEGF に誘導される HUVEC の増殖能に対し、何らかの作用があることが示唆された。次に、VEGF による細胞遊走の検討において、抗 CD82 抗体 (4F9) の刺激によって HUVEC の遊走能はコントロール群と比較して有意に抑制された。さらに、低濃度 (5-10 μ g/ml) においてはスラミン (血管新生阻害剤) の効果に匹敵し、高濃度 (20 μ g/ml) においてはスラミンを上回る抑制効果が認められた。この結果から、CD82 分子は、その抗体処理によって、HUVEC の遊走能に対しスラミンと同等以上の作用があることが示唆された。また、マトリゲル上での HUVEC の管腔形成能の検討で、抗 CD82 抗体 (4F9) で刺激した HUVEC では、網目状の配列が寸断され、管腔形成能の阻害作用が認められた。この結果から、抗 CD82 抗体 (4F9) による処理は、HUVEC の管腔形成能に対しても阻害作用として働くことが示された。これらの検討で、HUVEC の増殖能、遊走能、管腔形成能において、CD82 の抗体処理によって有意な抑制効果が認められ、CD82 は HUVEC の生物学的機能に深く関与していると考えられ、さらに、それらを総合的に評価するために、線維芽細胞と HUVEC の共培養系である *in vitro* 2 次元血管新生モデルによる検討を行った。免疫染色後の標本では、抗 CD82 抗体 (4F9) の刺激によって、血管長や分岐が減少し血管径の狭小化も確認され、明らかな血管新生阻害効果が認められた。さらに、この標本の画像処理によって血管面積の総和を数値化すると、抗 CD82 抗体 (4F9) の濃度依存的に血管面積が減少し、その抑制効果は低濃度でスラミンに匹敵し、高濃度でスラミン以上の作用が認められた。この結果から、*in vitro* 血管新生モデルにおいても、CD82 が関与する可能性が示唆された。

さらに、抗 CD82 抗体 (4F9) の VEGF に対する阻害作用について分子レベルの解析を行うために、VEGF に対する主要なシグナル伝達を担う VEGFR-2 の活性化について、VEGFR-2 の細胞内チロシン残基を認識する抗体を用いて、イムノブロッティング法で検討した。抗体処理した HUVEC を VEGF で刺激し、各時間で whole cell lysate を作製した。この結果、コントロール群では VEGF 刺激後 5 分で VEGFR-2 のリン酸化のピークを認め、抗 CD82 抗体 (4F9)

処理では、そのピークとなるリン酸化を有意に抑制することが示され、CD82 分子は血管内皮細胞上で VEGFR-2 と相互作用し、そのキナーゼ活性を抑制することで、VEGF 依存的な血管新生を阻害するというメカニズムの一端が示唆された。

次に、HUVEC における CD82 本来の機能を確認するために、CD82 を標的にした shRNA を作成し、CD82 の発現を抑制した HUVEC : shCD82-HUVEC を用いて、細胞増殖、細胞遊走、in vitro 2次元血管新生モデルによる検討を前述した抗 CD82 抗体 (4F9) による方法と同様に行った。その結果、shCD82-HUVEC は、control - HUVEC と比較して、細胞増殖能の著明な低下を認め、細胞遊走能も有意に低下した。さらに、in vitro 血管新生アッセイにおいても、血管面積の著明な減少を認め、CD82 が HUVEC の生物学的機能の維持に重要な役割を持つ可能性が示唆された。

<結論>本研究において、当研究室で樹立された抗 CD82 抗体 (4F9) を用いて、HUVEC における CD82 の機能解析を行い、その結果、(1) 抗 CD82 抗体 (4F9) の刺激により HUVEC の増殖、遊走及び管腔形成が阻害され、血管新生抑制効果が導かれる、(2) 抗 CD82 抗体 (4F9) の刺激により VEGFR-2 のチロシンリン酸化が抑制される、さらに、(3) CD82 の発現を抑制した HUVEC : shCD82-HUVEC の検討において、増殖能・遊走能・血管新生能が著明に低下する、などを明らかにし、CD82 が血管内皮細胞の種々の機能において、重要な生物学的意義を持つ分子であることが示唆された。これまで、血管内皮細胞における CD82 の生物学的意義を示した報告はなく、本研究において初めて、CD82 の血管新生への関与が示されたといえる興味深い知見である。さらに、本研究によって明らかにされた知見は、CD82 が癌をはじめ、糖尿病性網膜症や関節リウマチなどの血管新生が深く関与する疾患への新たな治療標的分子としての可能性を十分に示唆するものであり、臨床応用を視野に入れた研究の発展が期待できるものである。