

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612004

研究課題名(和文)細胞外マトリックスによるがん血管新生、リンパ管新生制御のメカノバイオロジー

研究課題名(英文)ADAMTS1 metalloproteinase inhibits lymphangiogenesis and mechanobiology of lymphangiogenesis

研究代表者

稲垣 純子 (Inagaki, Junko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90271056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ADAMTS1はマトリックス分解酵素であり強力な血管新生抑制作用を持つ。ADAMTS1のリンパ管新生への効果と、担がんマウスモデルにおけるがん組織中の内圧と腫瘍増殖、リンパ管新生の関係について検討した。リンパ管内皮細胞に強制発現させたADAMTS1は、VEGFCと複合体を形成しVEGFR3のシグナル伝達を阻害することでリンパ管新生を抑制することが明らかになった。また、内圧の増大する腫瘍にVEGFCを投与しリンパ管を形成させると、腫瘍の増大が抑制された。さらに、伸展刺激がADAMTS1やリンパ管新生関連遺伝子の発現に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：ADAMTS1 is a matrix metalloproteinase and inhibits angiogenesis. We investigated the effect of ADAMTS1 on lymphangiogenesis. We further examined the relationship between tumor interstitial fluid pressure (TIFP) and tumor growth. We demonstrated that overexpressed-ADAMTS1 transfectants bind to VEGFC and made a complex and dampened the phosphorylation of VEGFR3, inhibiting lymphangiogenesis. Moreover, when VEGFC was injected to enhance lymphangiogenesis in a xenograft mouse model, TIFP was reduced and tumor growth was also attenuated. Finally, we stretched HMVEC-dLys and examined lymphangiogenesis-related genes. Mechanical stress may be involved in the regulation of lymphangiogenesis-related gene expressions in lymphatic endothelial cells.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：ADAMTS1 細胞外マトリックス がん内圧 リンパ管新生

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

がんの増大や浸潤・転移にとって血管新生やリンパ管新生は重要である。がん組織における血管は、未熟で透過性が亢進し、血管壁の厚みも不規則で無秩序な走行をしている。そのため、腫瘍の組織間圧が高くなりやすい。さらに静脈系も伴っておらず、かつリンパ管も一般に小さく、機能的でない。結果的に、がん組織の内圧 (interstitial fluid pressure: IFP) は容易に上昇する。IFPの増大が、腫瘍血管やリンパ管を含むがん組織および周囲に作用することが明らかになって来た。これまでマトリックス分解酵素であり、かつ最も強力な血管新生抑制作用を持つ ADAMTS1 (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs 1) に着目し (*J Biol Chem.* 1999; 274: 23349-57)、ADAMTS1が、がんの血管新生を阻害する遺伝子治療として利用できる事を発見した。ADAMTS1のがん血管新生阻害作用は、血管内皮細胞特異的な細胞増殖抑制効果により引き起こされることを明らかにした (*Cancer Sci.* 2012; 103: 1889-97)。さらに最近、ADAMTS1は血管新生のみならずリンパ管新生も抑制することを発見した (図1)。

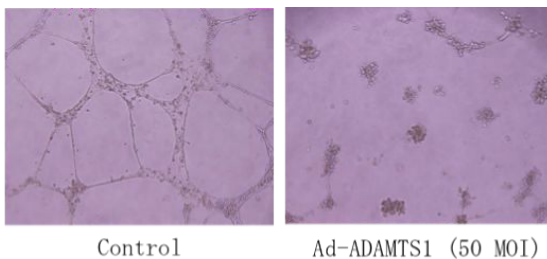


図1: リンパ管内皮細胞のチューブ形成に及ぼすADAMTS1の効果

また、ADAMTS1の発現が、血流により調節されているとする報告もあり (*J Cell Physiol.* 2011; 226: 350-61)。今回、腫瘍のIFP上昇と基底膜の破壊および血管新生・リンパ管新生との関連に着目するに至った。

### 2. 研究の目的

(1) 細胞外マトリックス分解酵素であるADAMTS1に着目し、その血管新生・リンパ管新生への効果について、*in vitro*で検討する。  
(2) がん組織中の内圧上昇に対する血管新生・リンパ管新生関連遺伝子の発現を培養細胞

およびマウス背部に移植した腫瘍片の二つの系で解析する。

(3) マウス背部に移植した腫瘍において内圧上昇と基底膜の破綻の関連を検討し、がん周囲のマトリックスによる圧負荷感受機構について、基底膜から細胞への情報伝達系、さらには血管新生・リンパ管新生の制御メカニズムについて解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 全長ヒトADAMTS1遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製して、ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-dLy) に遺伝子導入を行った。HMVEC-dLyの増殖能への効果を検討すると共に、管腔形成への効果をコントロールアデノウイルス (Adeo-LacZ) と比較した。さらに、リンパ管新生の中心的な分子機構である VEGFC/VEGFR3のシグナル伝達経路に及ぼす影響について検討した。

(2) ノードマウス背部に被膜を形成するがんと形成しないがんおよび血管新生の盛んな転移能の高いがんの3種類を移植し、基底膜の破壊の有無と血管新生・リンパ管新生の関連をCD31およびLYBE-1などそれぞれ血管内皮・リンパ管内皮細胞特異的なマーカーを用いた免疫染色で解析した。

(3) IFPの増大する腫瘍に血管新生あるいはリンパ管新生促進因子であるVEGFAあるいはVEGFCを投与し、腫瘍の増大に及ぼす効果を検討した。

(4) 培養細胞伸展システムを用いて、HMVEC-dLyに伸展刺激を与えた場合のリンパ管新生関連遺伝子およびメカノセンサーと考えられているintegrinなどの発現を定量的リアルタイムRT-PCRにて検討した。

### 4. 研究成果

(1) ADAMTS1を導入したHMVEC-dLy細胞では細胞増殖および管腔形成が抑制されるとともに、ADAMTS1を過剰発現させた乳がん細胞 (MDA-MB-231) へのHMVEC-dLyの遊走能も有意に抑制された。

また、培養上清中に分泌されたADAMTS1はVEGFCと結合することが確認され、VEGFCとADAMTS1との免疫沈降で、ADAMTS1がVEGFCと複合体を形成していることが示された。

ADAMTS1のVEGFR3のリン酸化への効果を検討したところ、ADAMTS1発現HMVEC-dLy細胞ではコントロール細胞と比べ、VEGFR3およびその下流のAkt、Erk1/2のリン酸化が有意に抑制された。さらに、ADAMTS1によるVEGFR3やAkt、Erk1/2のリン酸化抑制効果は、通常培地での希釈、あるいは過剰量のVEGFC添加により解除されることが分かった。

(2) ヒト上皮様細胞がん由来細胞(A431)、ヒト肺基底上皮腺がん細胞(A549)あるいはヒト乳腺がん細胞(MDA-MB-231)を移植したヌードマウスより得られた腫瘍組織片を血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞特異的マーカーであるCD31やLYVE-1抗体を用いて、免疫組織化学的に解析した。3種類の腫瘍組織片を比較すると、最もIFPが増大するA431における平均血管密度は0.8%、平均リンパ管密度は0.12%と最も低いことが分かった。

また、ADAMTS1の発現は、免疫染色、ウエスタンブロット等でこれらすべての腫瘍組織に認められたが、発現量の違いや血管内皮あるいはリンパ管内皮細胞との共局在は確認されなかった。一部、腫瘍辺縁部においてCD68との共局在が見られることから、ADAMTS1は、マクロファージから産生されているものもあることが分かった。さらに、A431、A549の腫瘍組織では間質液がたまりやすくネクローシスを起こしていると思われる腫瘍中心部にもその発現が多く確認された。ADAMTS1と腫瘍のIFPとの関係は、今後IFPを人工的に下げてその前後でADAMTS1の発現量および局在を検討する必要がある。

(3) IFPが増大するA431腫瘍にVEGFCを投与しリンパ管新生を促した結果、腫瘍増大が抑制される結果を得た。VEGFAでは抗腫瘍効果は認められず、むしろ腫瘍は増大した。つまり、VEGFCにより形成されたリンパ管網がIFPを低下させるドレナージ効果を発揮したと見え、IFPを低下させるドレナージ療法は、がんの新たな治療法となり得る可能性を示している。

(4) IFP自体が血管新生・リンパ管新生への作用、さらには、細胞外マトリックスに対しても作用している可能性があると考え、まずこれらの効果を*in vitro*の実験系において検証した。培養細胞伸展システムを用いて、ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞(HMVEC-dLy)に

伸展刺激(10%伸張1, 3, 6, 24h)を与えた場合のリンパ管新生関連遺伝子の発現を定量的リアルタイムRT-PCR法にて検討した。

まずは、代表的なリンパ管新生関連遺伝子であるVEGFA, VEGFC, VEGFR3, Prox1, LYVE-1, HB-EGF, さらにメカノセンサーと考えられているβ1 integrinなどの発現をmRNAレベルにて測定した。さらに、血管新生・リンパ管新生に関連するADAMTS1の発現量についても検討した。その結果、10%伸展刺激、24hでADAMTS1のmRNA発現量は約2倍に増加することが分かった。Prox1, β1 integrin, HB-EGFの発現量にほとんど変動は見られなかったが、LYVE-1とVEGFR3のmRNAの発現量は減少する傾向にあった。VEGFCは元々発現量がかなり低く、伸展刺激によりさらに低下する傾向が見られた。今後、タンパクレベルでのβ1 integrinの活性化の有無、またその下流のMAPKやAktなどのリン酸化を介した情報伝達経路について解析を進める計画である。IFP自体が血管新生・リンパ管新生、さらには、細胞外マトリックスに対しても作用している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Inagaki J., Takahashi K., Ogawa H., Asano K., Hatipoglu O.F., Zeynel Cilek M., Obika M., Ohtsuki T., Hofmann M., Kusachi S., Ninomiya Y., Hirohata S. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. *Exp. Cell Res.* 2014 May 1; 323(2): 263-75. 査読有、DOI:10.1016/j.yexcr.2014.03.002  
Hofmann M., Pflanzner R., Zoller N.N., Bernd A., Kaufmann R., Thaci D., Bereiter-Hahn J., Hirohata S., Kippenberger S. Vascular endothelial growth factor C-induced lymphangiogenesis decreases tumor interstitial fluid pressure and tumor. *Transl Oncol.* 2013 Aug 1; 6(4): 398-404. 査読有、DOI:10.1593/tlo.13274  
Obika M., Ogawa H., Takahashi K., Li J.,

Hatipoglu O.F., Cilek M.Z., Miyoshi T., Inagaki J., Ohtsuki T., Kusachi S., Ninomiya Y., Hirohata S. The tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Sci.* 2012; 103(10): 1889-97. 査読有、DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02381.x.

Cilek M.Z., Hirohata S., Hatipoglu O.F., Ogawa H., Miyoshi T., Inagaki J., Ohtsuki T., Harada H., Kamikawa S., Kusachi S., Ninomiya Y. AHR, a novel acute hypoxia-response sequence, drives reporter gene under hypoxia in vitro and in vivo. *Cell Biol Int.* 2011; 35: 1-8. 査読有、DOI: 10.1042/CBI20100290.

Inagaki J., Hao L., Nakatsuka M., Yasuda T., Hiramatsu Y., Shoenfeld Y., Matsuura E. A Possible Mechanism of Autoimmune-Mediated infertility in Women with Endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011; 66(2): 90-9. 査読有、DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00956.x.

[学会発表](計 18 件)

浅野 恵一、稲垣 純子、マティアス ホフマン、川地 輝幸、平田 彩、大月 孝志、二宮 善文、廣畑 聡、担がんマウスモデルにおけるパーシカン分解の解析、第46回日本結合組織学会、第61回マトリックス研究会 合同学術集会、名古屋(ウインクあいち) 2014.6.5-7

大月 孝志、廣畑 聡、障子 友理、浅野 恵一、平田 彩、川地 輝幸、稲垣 純子、熊岸 加苗、西田 圭一郎、二宮 善文、ヒアルロン酸短期投与によるラット変形性関節症モデルの関節軟骨保護効果の検討、第61回マトリックス研究会 合同学術集会、名古屋(ウインクあいち) 2014.6.5-7

稲垣 純子、高橋 克之、小川 弘子、浅野 恵一、Omer Faruk Hatipoglu, Mehmet Zeynel Cilek, 小比賀 真就、大月 孝志、Matthias Hofmann、草地 省蔵、二宮 善文、廣畑 聡、ADAMTS1はVEGFCと結合して

リンパ管新生を抑制する、第46回日本結合組織学会、第61回マトリックス研究会 合同学術集会、名古屋(ウインクあいち) 2014.6.5-7

Ohtsuki T., Kawadi T., Hirata A., Asano K., Kusunoki E., Inagaki J., Kumagishi K., Nishida K., Ninomiya Y., Hirohata S. Inflammatory cytokine induced Hyaluronan synthases under hyaluronan treatment in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 cells. The 2nd International Symposium on Mechanobiology (ISMB 2014)、岡山(岡山大学 Junko Fukutake Hall) 2014.5.20-23

Inagaki J., Takahashi K., Ogawa H., Hatipoglu O.F., Cilek M.Z., Obika M., Ohtsuki T., Kusachi S., Ninomiya Y., Hirohata S. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014)、京都(京都みやこめっせ) 2014.4.14-17

大月 孝志、廣畑 聡、平田 彩、浅野 恵一、楠 絵里子、稲垣 純子、西田 圭一郎、二宮 善文、ヒアルロン酸の炎症性サイトカイン誘導性ヒアルロン酸合成酵素分子種への影響、第27回日本軟骨代謝学会、京都(京都府医師会館) 2014.2.28-3.1

Asano K., Hirohata S., Cilek M.Z., Hatipoglu O.F., Ohtsuki T., Inagaki J., Ninomiya Y. ADAMTS1 was differently regulated in breast cancer cells. 第7回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、岡山(岡山大学) 2014.2.7

大月 孝志、川地 輝幸、平田 彩、浅野 恵一、楠 絵理子、稲垣 純子、熊岸 加苗、西田 圭一郎、二宮 善文、廣畑 聡、Cyclic tensile strain (CTS) による炎症性サイトカイン誘導性細胞応答に対する抑制機構 micro RNA array による解析、第36回日本分子生物学会、神戸(神戸国際会議場) 2013.12.3-6

大月 孝志、廣畑 聡、浅野 恵一、楠 絵里子、稲垣 純子、西田 圭一郎、二宮 善文、

ヒアルロン酸(HA)分子量と関節軟骨保護効果の解析 (in vitro & in vivo) 第45回日本結合組織学会学術大会 第60回マトリックス研究会大会、和歌山(和歌山県立医科大学) 2013.6.28-29

Hirohata S., Hatipoglu O.F., Kusunoki E., Ohtsuki T., Inagaki J., Kusachi S., Ninomiya Y. ADAMTS1 null mice demonstrated omphalocele phenotype. ゴードンカンファレンス matrix metalloproteinase、イタリア・バルガ市、2013.5.18-24

Asano K., Hirohata S., Cilek M.Z., Hatipoglu O.F., Ohtsuki T., Inagaki J., Ninomiya Y. Novel vector construct driven under acute hypoxia. 第6回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、岡山(岡山大学) 2013.2.7-8

Hirohata S., Asano K., Cilek M.Z., Hatipoglu O.F., Ogawa H., Obika M., Ohtsuki T., Inagaki J., Kusachi S., Ninomiya Y. ADAMTS1 プロモーターを利用した低酸素感受性発現ベクター、第10回がんとハイポキシア研究会、横浜(横浜市開港記念館) 2012.12.6-7

稲垣 純子、高橋 克之、小川 弘子、Hatipoglu O.F.、Cilek M.Z.、小比賀 真就、廣畑 聡、二宮 善文、リンパ管内皮細胞に対する ADAMTS1 の作用とシグナル伝達、第85回日本生化学会大会、福岡(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡) 2012.12.14-16

Hirohata S., Ohtsuki T., Obika M., Ogawa H., Inagaki J., Kusachi S., Ninomiya Y. The tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. ASMB 2012 Joint Meeting of the American Society for Matrix Biology and the Society for Glycobiology, 米国、(San Diego, CA) 2012.11.11-14

廣畑 聡、ハティポール・オメル・ファルク、楠 絵理子、メフメット・ゼイネル・

チレッキ、大月 孝志、稲垣 純子、草地 省蔵、二宮 善文、ADAMTS1ノックアウトマウスの解析、第44回日本結合組織学会学術大会 第59回マトリックス研究会大会、東京(日本青年館) 2012.6.7-8

稲垣 純子、高橋 克之、小川 弘子、Omer F. Hatipoglu, M. Zeynel Cilek, 小比賀 真就、米澤 朋子、大橋 俊孝、廣畑 聡、二宮 善文、ADAMTS1のin vitroでのリンパ管新生阻害効果、第84回日本生化学会大会、京都(京都国際会館) 2011.9.21-24

廣畑 聡、小比賀 真就、オメル・ファルク・ハティポール、小川 弘子、メフメット・ゼイネル・チレッキ、稲垣 純子、大月 孝志、石井 裕子、幡中 邦彦、草地 省蔵、米澤 朋子、大橋 俊孝、二宮 善文、ADAMTS1は血管新生を阻害しアポトーシスを誘導する、第43回日本結合組織学会学術大会・第58回マトリックス研究会大会 合同学術集会、別府(別府ビーコンプラザ) 2011.6.10-11

オメル・ファルク・ハティポール、小比賀 真就、廣畑 聡、小川 弘子、メフメット・ゼイネル・チレッキ、稲垣 純子、大月 孝志、石井 裕子、幡中 邦彦、草地 省蔵、米澤 朋子、大橋 俊孝、二宮 善文、ADAMTS1は腫瘍壊死因子刺激下の内皮細胞におけるアポトーシスに関連する、第43回日本結合組織学会学術大会・第58回マトリックス研究会大会 合同学術集会、別府(別府ビーコンプラザ) 2011.6.10-11

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

稲垣 純子 (INAGAKI JUNKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90271056

### (2)研究分担者

廣畑 聡 (HIROHATA SATOSHI)

岡山大学・国際センター・准教授

研究者番号：90332791

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIHUMI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70126241

(3)連携研究者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233