

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14626

研究課題名(和文)悪性中皮腫におけるVEGF非依存性の新規血管新生因子の探索

研究課題名(英文)Exploration of novel VEGF-independent angiogenic factors in malignant mesothelioma

研究代表者

江口 良二 (Eguchi, Ryoji)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00461088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は胸膜等の中皮細胞から発症する悪性腫瘍であり、腫瘍の進展に必須な血管新生を伴う。血管内皮増殖因子(VEGF)、特にVEGF-Aが腫瘍血管新生において重要な役割を担っており、VEGF-Aの抗体製剤が中皮腫患者の全生存期間の延長を改善することが最近報告された。その一方で、同様のケースでは無増悪生存期間の延長を改善しないことも報告されていることから、悪性中皮腫においてVEGF以外の血管新生因子の存在が示唆されるが、その因子は不明であった。本研究では、悪性中皮腫における新規血管新生因子を探索した結果、グランユリン遺伝子産物がVEGF非依存性の血管新生因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is an aggressive tumor arising from the mesothelial cells of serous membranes including pleura, and is associated with tumor angiogenesis, which is prerequisite for tumor progression. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), one of VEGF family, plays a pivotal role in tumor angiogenesis. Bevacizumab, a monoclonal antibody to VEGF-A, has recently been reported to improve the overall survival of patients with malignant mesothelioma, but not the progression-free survival of them. These studies suggest VEGF-independent angiogenic factors in malignant mesothelioma, but the factors remained unknown. In the present study, we clarified that progranulin and granulin-like protein derived from granulin gene are novel VEGF-independent angiogenic factors in malignant mesothelioma.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 悪性中皮腫 血管内皮増殖因子(VEGF) granulin (GRN) progranulin (PGRN)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は発症後2年で約7割の患者が死亡する極めて予後不良の悪性腫瘍である。腫瘍の完全な切除は困難で、本疾患で認可されているシスプラチン/ペメトレキセド併用化学療法はシスプラチン単剤と比べて生存期間を延長するものの、その期間は短く、新たな治療法の開発が急務である。

悪性中皮腫では既存の血管から腫瘍自身に向かって新たな血管を誘導する血管新生を伴う(腫瘍血管新生)。中皮腫を含む様々な腫瘍細胞で発現・分泌される血管内皮増殖因子(VEGF)ファミリー、中でも特に VEGF-A が腫瘍血管新生において重要な役割を担う。しかし、VEGF-A に対するモノクローナル抗体製剤を上述の併用化学療法に追加しても中皮腫患者の全生存期間の有意な延長は見られるものの、同様のケースで無増悪生存期間の有意な延長は見られないことが報告された。この報告から、悪性中皮腫では VEGF とは異なる因子が血管新生を制御することが示唆されるが、その因子は不明であった。

### 2. 研究の目的

悪性中皮腫における VEGF 非依存性の新規血管新生因子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 悪性中皮腫が分泌する新規血管新生因子を同定するために中皮腫細胞株に対して無血清培養を行った。細胞培養には血清などの細胞外因子が用いられるが、それらを排除しなければ、腫瘍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、無血清培地で中皮腫細胞を培養することで培養上清中の液性因子が全て中皮腫細胞由来となり、中皮腫細胞が分泌する液性因子の網羅的解析が可能となった。

(2) 血管新生の解析には、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた *in vitro* 3次元血管モデルを実験モデルとして使用した。*in vitro* 3次元血管モデルとは、ウシ由来I型コラーゲン中でHUVECに毛細血管様の管腔構造を形成させる3次元培養法を指す。コラーゲン等の細胞外基質中の3次元細胞培養では、単層培養に比べて生体内における血管内皮細胞の遺伝子発現をより正確に反映することが知られている。

### 4. 研究成果

中皮腫を含む様々な腫瘍が分泌する血管新生因子の中で、VEGF-A 以外に腫瘍由来の血管新生作用を有する明らかなタンパク質はこれまで同定されていなかった。その理由として血清や成長因子の組換え体など様々な細胞外タンパク成分が細胞培養時に加えられた場合、それらが培養上清中の腫瘍細胞由来の未知のタンパク因子と混合される結果、その後のタンパク解析による未知因子の

検出が困難になることが挙げられる。ほとんどの正常細胞では、それら細胞外タンパク成分の非存在下で培養することは不可能である一方、腫瘍細胞の場合、自身の高い生存・増殖能によってそれら細胞外タンパク成分が無くても培養可能な細胞が稀に存在する。そこで、無血清条件下でも中皮腫細胞が培養可能か否かを確かめるため、3つのヒト中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2452、NCI-H2052 を用いて無血清培養を試みた。NCI-H28 及び NCI-H2452 細胞は無血清培養によって細胞塊様の凝集と死細胞様の細胞縮小が位相差顕微鏡画像から観察された。一方で NCI-H2052 細胞では、それらの形態変化は観察されず、フローサイトメトリーを用いた解析から無血清培養下の NCI-H2052 細胞には細胞死は誘導されていないことが判明した。以上の結果から、NCI-H2052 細胞のみ無血清培養下でも生存可能であることが確かめられ、NCI-H2052 細胞の無血清培養上清(H2052 上清と略す)を以後の血管新生解析に用いた。

次に、研究代表者が以前開発した3次元血管モデルを用いて、H2052 上清による血管新生の誘導を試みた。H2052 上清のタンパク濃度をブラッドフォード法により定量し、規定濃度となるように H2052 上清を希釈して3次元血管モデルに添加したところ、濃度依存的に血管新生が誘導された(図1)。

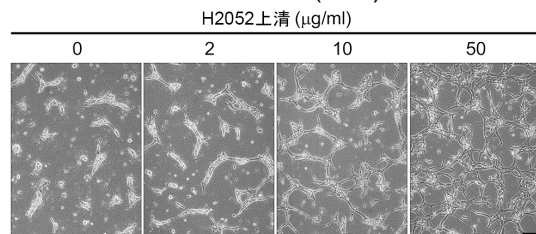


図1. H2052上清は濃度依存的に血管新生を誘導する

VEGF を介した腫瘍血管新生において、VEGF-A は VEGF 受容体(VEGFR)、特に VEGFR2 に結合することで受容体の細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化される。そのリン酸化がトリガー刺激となって、VEGFR2 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(ERK)をリン酸化する。これら一連のリン酸化カスケードによって血管新生は誘導される。H2052 上清による血管新生と VEGF-A の関連を明らかにするため、H2052 上清を HUVEC の培養液に添加した際の VEGFR2 および ERK のリン酸化をウェスタンブロット法により検討した。その結果、H2052 上清は VEGFR2 のリン酸化を誘導しない一方で、ERK のリン酸化を顕著に誘導することが示された(図2)。

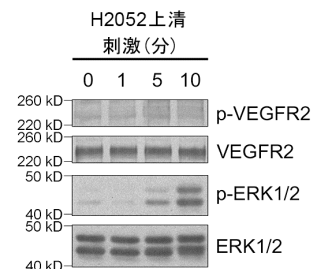


図2. H2052上清はVEGFR2をリン酸化しない

また、H2052 上清と VEGF-A の組換え体の両方に VEGF-A に対する中和抗体をそれぞれ加えて 3 次元血管モデルに添加したところ、抗 VEGF-A 抗体は組換え体 VEGF-A による血管新生を顕著に阻害したが、H2052 上清による血管新生を全く抑制しなかった(図 3)。

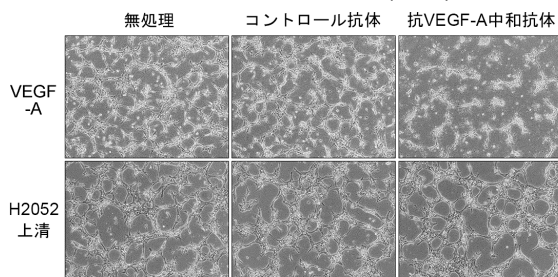


図3. 抗VEGF中和抗体はH2052上清による血管新生を抑制できない。さらに、エレクトロポレーション法を用いた RNA 干渉によって HUVEC の VEGFR2 をノックダウンさせ、その HUVEC による 3 次元血管モデルに H2052 上清と組換え体 VEGF-A を添加した。VEGF-A 中和抗体を用いた実験と同様に、組換え体 VEGF-A による血管新生は VEGFR2 のノックダウンによって顕著に抑制されたが、H2052 上清による血管新生は全く抑制されなかった(図 4)。

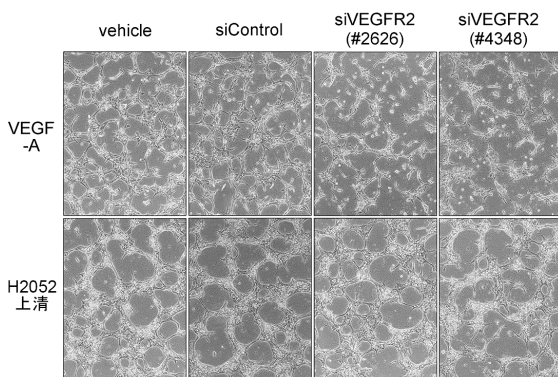


図4. VEGFR2のノックダウンではH2052上清による血管新生を抑制できない

以上の結果から、H2052 上清による血管新生は VEGF 非依存性の血管新生因子を介して誘導されることが示唆された。

H2052 上清中に含まれる血管新生作用を有する液性タンパク質を同定するため、LC/MS-MS を用いた網羅的タンパク解析を試みた。2 回の解析を行った結果、399 個のタンパク質が同定され、その中から血管新生に関連するとこれまでに報告されている因子として、インターロイキン-8(IL-8)、成長制御アルファタンパク質(GRO $\alpha$ )、IL-6、ミドカイン(MK)、IL-18、肝癌細胞増殖因子(HDGF)、クラスチリン(CLU)、グラニューリン(GRN)の 8 つのタンパク質に着目した。IL-8、GRO $\alpha$  及び IL-6 にはそれぞれに対する中和抗体が、IL-18 にはその受容体に対する中和抗体が購入可能であった。そこで、それらの中和抗体を H2052 上清に加え、血管新生解析を行ったが、いずれの中和抗体によっても H2052 上清による血管新生を抑制できなかった。残り 4 つのタンパク質には中和抗体が入手不可能であったので、それぞれに対する低分子干渉

RNA(siRNA)を処理した NCI-H2052 細胞に無血清培養を行い、その培養上清を回収して血管新生解析を行った。その結果、MK、HDGF、CLU に対する RNA 干渉をそれぞれ施した H2052 上清では血管新生は抑制されなかったが、GRN に対する siRNA を処理した H2052 上清では有意に血管新生が抑制された(図 5)。

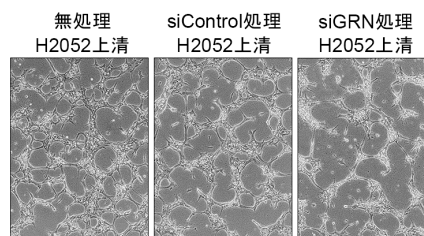


図5. GRNがH2052上清による血管新生に関与する。これらの結果から、NCI-H2052 細胞において GRN が血管新生に直接的に関与することが示唆された。

また、GRN の発現が無血清培養によって強く誘導された可能性があるため、血清有無の条件下で GRN の伝令 RNA (mRNA)量をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法(PCR 法)によって比較したところ、血清を含む培地を用いた培養と比べて無血清培養の方が GRN の mRNA を多く発現していたが、その比は約 2 倍程度だったため、H2052 上清による血管新生は無血清培養が GRN の発現を強く誘導した結果ではないと考えられた。加えて、NCI-H2052 細胞以外の他の中皮腫細胞株においても GRN が発現しているかをリアルタイム PCR 法により検討したところ、NCI-H28 及び NCI-H2452 細胞のいずれにおいても NCI-H2052 細胞と同等以上に GRN の mRNA を発現していることが示された。以上のリアルタイム PCR 法を用いた実験結果から、どの中皮腫細胞株でも血管新生を誘導するのに十分な GRN を発現していることが示唆された。

GRN は 17 番染色体長腕の領域 2 の 1 番目の縞(17q21)に存在する遺伝子で、タンパク質としてはその前駆体のプログランニューリン(PGRN、分子量約 68 kDa)の形で糖鎖付加(分子量約 88 kDa)をつけて分泌される。PGRN には神経保護・損傷治療といった修復因子としての役割のほかに、乳癌や卵巣癌の細胞株を用いた研究から腫瘍形成や血管新生において腫瘍の増大・進展に関わる働きも報告されている。PGRN の組換え体を 3 次元血管モデルに添加したところ、300 ng/ml で血管新生を誘導したが、その血管新生は H2052 上清による場合と比べて半分以下と弱く、一方で酵素結合免疫測定法(ELISA 法)による H2052 上清中の PGRN 濃度は約 300 pg/ml であった。

GRN の血管新生の関与についてより詳細に解析するため、GRN に対する別の 3 つの siRNA をそれぞれ処理した H2052 上清を用いて PGRN に対するウェスタンブロット法を行った。GRN の siRNA をそれぞれ処理された H2052 上清において PGRN は全てノックダウ

ンされていたが、約 52 kDa の位置にタンパクバンドが存在する上清が2つ存在した(図6)。

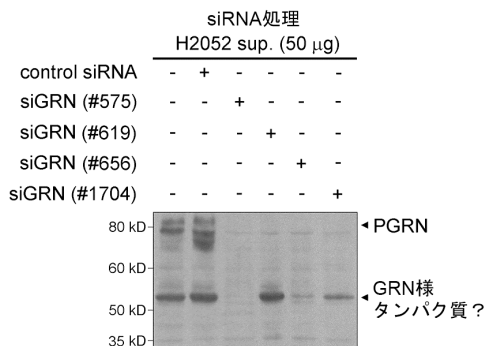


図6. NCI-H2052細胞はPGRNとは異なるGRN由来タンパク質を発現する

このバンドがPGRN由来であることを調べるため、PGRNとこの52 kDaの両方をノックダウンしているH2052上清に組換え体PGRNを加えて37で48時間静置した。H2052上清単独の場合、PGRNは52 kDaのバンドを除いてその上清中に存在するプロテアーゼによって完全に分解されたが、PGRNと52 kDaを両方ノックダウンしたH2052上清とともに組換え体PGRNを静置していたサンプルでは、組換え体PGRN由来と思われる約52 kDaと32 kDaのバンドが現れた(図7)。

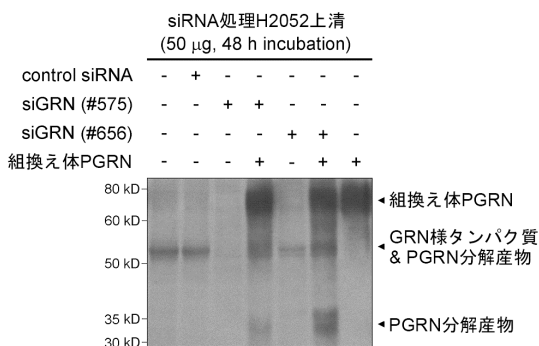


図7. NCI-H2052細胞はPGRNとGRN様タンパク質を発現するこれらの結果から、PGRNはH2052上清に存在するタンパク質分解酵素によって52 kDaと32 kDaの大きさに分解されるが、PGRN由来ではない52 kDaのGRN由来のタンパク質も存在することが示唆された。さらに、GRNに対するこれら4つのsiRNAをそれぞれ処理したH2052上清を用いて血管新生実験を行った結果、全ての上清で血管新生が抑制され、PGRNとGRN様タンパク質の両方をノックダウンした上清の方がPGRNのみをノックダウンした上清に比べ血管新生がより強く抑制されることが示された(図8)。

以上の結果から、悪性中皮腫においてGRN遺伝子由来のPGRNとGRN様タンパク質がVEGF非依存性の血管新生因子であることを初めて明らかにした。

脳神経変性疾患、特に前頭側頭型認知症やアルツハイマー病でGRN遺伝子における多数のエキソン変異が報告されている。本研究においてもNCI-H2052細胞のゲノムDNAを用いて全エクソーム解析を行ったが、GRNの全エクソンには欠失、転座などの欠損変異は

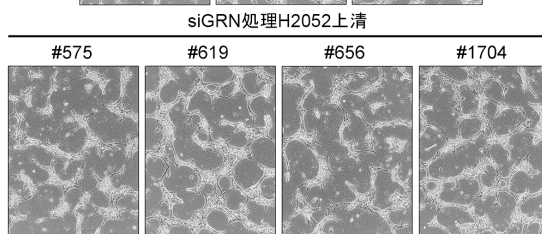
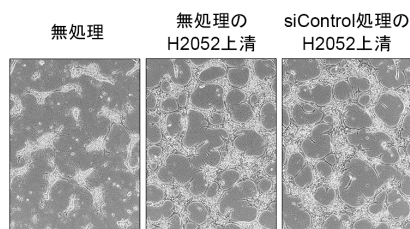


図8. PGRNとGRN様タンパク質がH2052上清による血管新生を誘導する

見られなかった。H2052上清中にはPGRN(88 kDa)とGRN様タンパク質(52 kDa)の両方が存在することから、NCI-H2052細胞の17q21はおそらくアレル染色体(一方の染色体のGRN遺伝子からは転写時のmRNAのエキソンが全長で発現し、もう一方の染色体のGRN遺伝子からはそのイントロンもしくは非翻訳領域に何らかの変異が入ったために転写時のmRNAのエキソンが短い形で発現する)であることが推測される。PGRNは血液などの臨床検体を用いたELISA法によって定量することが可能である。しかし、GRN様タンパク質ではその全貌(どのエキソン部位が消失していて、且つ三次構造がPGRNと比べてどのように変化しているか)が明らかにならない限り、GRN様タンパク質を認識する抗体が作製できないので上記のような定量解析は行えない。将来的には、本研究で使用した中皮腫細胞株のように悪性中皮腫患者の腫瘍組織でGRN遺伝子が発現しているかについてリアルタイムPCR法を用いて調べる必要がある。

## 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1件)

Eguchi R, Nakano T, Wakabayashi I, Progranulin and granulin-like protein as novel VEGF-independent angiogenic factors derived from human mesothelioma cells, *Oncogene*, 査読有、Vol.36, No.5, 2017, 714-722.  
Doi: 10.1038/onc.2016.226.

〔学会発表〕(計4件)

江口良二、中野孝司、若林一郎、プログランニューリンとグラニューリン様タンパク質はヒト中皮腫細胞由来の新規血管新生因子である、第89回日本生化学会、2016年9月25日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

江口良二、Novel VEGF-independent angiogenic factors derived from human

mesothelioma cells、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

江口良二、中野孝司、若林一郎、Progranulin and granulin-like protein as novel angiogenic factors derived from human mesothelioma cells、第 24 回日本血管生物医学会学術集会、2016 年 12 月 10 日、長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）

江口良二、若林一郎、悪性中皮腫において progranulin と granulin 様タンパク質は VEGF 非依存性の新規血管新生因子である、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年 6 月 13 日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

悪性中皮腫の腫瘍を増大させる新たな原因物質を特定

[http://www.hyo-med.ac.jp/research\\_facilities/output/gyoseki/20170302-01.html](http://www.hyo-med.ac.jp/research_facilities/output/gyoseki/20170302-01.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江口 良二 (EGUCHI, Ryoji)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00461088

### (2) 研究分担者

若林 一郎 (WAKABAYASHI, Ichiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70220829