

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07278

研究課題名(和文)非小細胞肺癌におけるVEGF非依存性の新規血管新生因子の同定

研究課題名(英文)Identification of VEGF-independent angiogenic factors in non-small cell lung cancer

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では非小細胞肺癌が分泌する血管新生因子を同定することを目的に実験を行った。非小細胞肺癌細胞株EBC-1を無血清培養し、その上清の網羅的タンパク解析を行い、11個の候補タンパクを明らかにした。その中の血管内皮増殖因子(VEGF)と肝細胞癌由来増殖因子(HDGF)がEBC-1による血管新生を制御することを見出した。しかし、別の細胞株Lu99による血管新生にはVEGFとHDGFは関与しなかったため、EBC-1では発現せずLu99で発現する遺伝子を網羅的解析で調べた結果、3つの候補因子を同定した。その中の繊維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)がLu99による血管新生を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で承認されている非小細胞肺癌の抗血管新生療法は、奏効率、無増悪生存期間、全生存期間の延長が報告されているが、それでもその平均生存期間は1年半と短いことから、他の血管新生因子の関与が考えられる。これまでも非小細胞肺癌のVEGFとは異なる血管新生因子としてHDGFやFGF-2は報告されていたが、本研究の成果はそれらの報告を裏付ける研究結果となった。HDGFやFGF-2をターゲットとした抗血管新生療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I aimed at identification of angiogenic factors derived from non-small cell lung cancer (NSCLC). EBC-1, a NSCLC cell line, was incubated in serum-free culture, in which eleven candidates were found by mass spectrometry. Among the eleven proteins, vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatoma-derived growth factor (HDGF) regulated angiogenesis induced by EBC-1 cells. However, VEGF and HDGF were not involved in angiogenesis induced by another NSCLC cell line, Lu99. By gene microarray in EBC-1 and Lu99 cells, three candidates were expressed in only Lu99 cells. Among the three genes, fibroblast growth factor-2 (FGF-2) regulated angiogenesis induced by Lu99 cells. These results suggest that HDGF enhances VEGF-dependent angiogenesis and FGF-2 is a VEGF-independent angiogenic factor in human NSCLC cells.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 非小細胞肺癌 無血清培養 3次元培養 VEGF HDGF FGF-2

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦の癌関連死の第 1 位の病因疾患であり、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)はその約 8 割を占める極めて予後不良の悪性腫瘍である。NSCLC は他の悪性腫瘍と同様に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(腫瘍血管新生)を伴う。血管新生において血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)とその受容体である VEGF 受容体(VEGF receptor, VEGFR)を介する経路(特に VEGF-A/VEGFR2)が重要な役割を担っており、VEGF-A/VEGFR2 を阻害する抗血管新生療法が多くの悪性腫瘍の治療に選択される。本邦の NSCLC 治療においても既存の化学療法にこの抗血管新生療法が併用されており、NSCLC の臨床試験の結果から、この併用は化学療法単独と比べて NSCLC 患者の奏効率、無増悪生存期間及び全生存期間を延長させることが報告された。しかし、その平均全生存期間は約 1 年半であったことから、VEGF-A/VEGFR2 経路を介さない血管新生因子の存在が予想されるが、その因子は不明であった。

2. 研究の目的

NSCLC 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) NSCLC が分泌する新規血管新生因子を同定するために NSCLC 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。無血清培地で NSCLC 細胞を培養することで培養上清中の液性因子が全て NSCLC 細胞由来となり、NSCLC 細胞が分泌する液性因子の網羅的解析が可能となった。この無血清培養上清を限外ろ過によってさらに濃縮したサンプルを実験に使用した。

(2) 血管新生の解析には、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, 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 次元培養法である。コラーゲン等の細胞外基質中の 3 次元培養は、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

NSCLC を含む悪性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。その理由として細胞培養時に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、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ためである。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 NSCLC 細胞が培養可能かを確かめるため、3 つのヒト NSCLC 細胞株 A549、Lu99、EBC-1 を用いて無血清培養を試みた。A549 及び Lu99 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 EBC-1 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 EBC-1 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、EBC-1 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、EBC-1 細胞の無血清培養上清(EBC-1 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、EBC-1 上清による血管新生の誘導を試みた。EBC-1 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、EBC-1 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)。

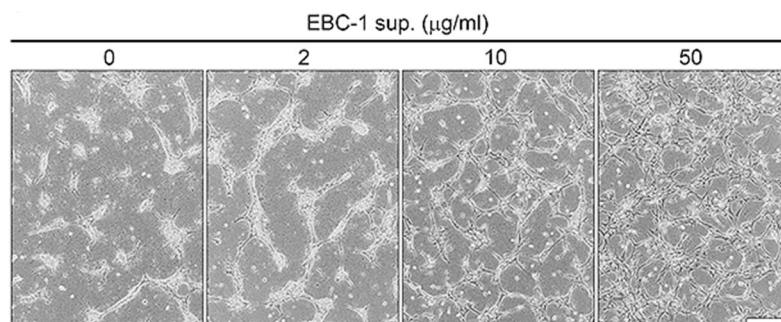


図1. EBC-1上清は濃度依存的に血管新生を誘導する

VEGF/VEGFR 経路を介した腫瘍血管新生において、VEGF-A は 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(extracellular signal-regulated kinase, 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。EBC-1上清による血管新生とVEGF-Aの関連を明らかにするため、EBC-1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、EBC-1上清はVEGFR2及びERKのリン酸化を顕著に誘導することが示された(図2)。

そこで、EBC-1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、EBC-1上清による血管新生を部分的に抑制した(図3)。さらに、VEGF-Aに対する低分子干渉RNA(small interfering RNA, siRNA)を施したEBC-1の無血清培養上清を3次元血管モデルに添加したところ、VEGF-A中和抗体を用いた実験と同様に、EBC-1上清による血管新生は部分的に抑制された(図4)。以上の結果から、EBC-1上清による血管新生はVEGF-AとVEGF非依存的血管新生を介して誘導されることが示唆された。

EBC-1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、VEGF-Aを含めた1007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(interleukin-8, IL-8)、マクロファージ遊走阻害因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)、ガレクチン-1、ミドカイン(midkine, MK)、インターロイキン-18(IL-18)、ガレクチン-3、肝癌細胞由来増殖因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)、オステオポンチン(osteopontin, OPN)、結合組織増殖因子(connective tissue growth factor, CTGF)、グラニューリン(granulin, GRN)の10個のタンパク質に着目した。IL-8、MIF、ガレクチン-1、ガレクチン-3、OPN及びCTGF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入手可能であった。そこで、それらの中和抗体をEBC-1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EBC-1上清による血管新生を抑制できなかった。残り3つのタンパク質に対する中和抗体は入手不可能であったので、それぞれに対するsiRNAを処理したEBC-1細胞の無血清培養上清を用いて血管新生解析を行った。その結果、MK及びGRNに対するRNA干渉をそれぞれ施したEBC-1上清では血管新生は抑制されなかったが、HDGFに対するsiRNAを処理したEBC-1上清では血管新生が部分的に抑制された。さらに、HDGFをノックダウンしたEBC-1上清にVEGF-A中和抗体を処理したところ、顕著にEBC-1上清による血管新生が抑制された(図5)。これらの結果から、EBC-1細胞においてHDGFがVEGF依存的血管新生を直接的に促進させることが示唆された。

ただし、HDGF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、HDGFの伝令RNA(messenger RNA, mRNA)量を半定量的ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR)によって血清有無の条件下で比較したところ、HDGF mRNAの発現量は血清の有無では変わらなかった。また、他のNSCLC細胞株A549及びLu99はEBC-1細胞よりもHDGF mRNAを多く発現していることが示された。以上の実験結果から、どのNSCLC細胞株でもVEGF依存的血管新生を促進させるのに十分量のHDGFを発現していることが示唆された。

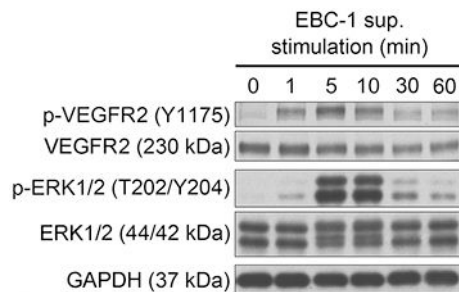


図2. EBC-1上清はVEGFR2をリン酸化する

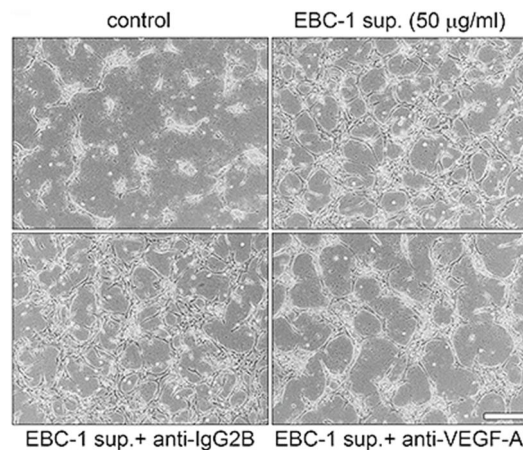


図3. 抗VEGF中和抗体はEBC-1上清による血管新生を部分的に抑制する

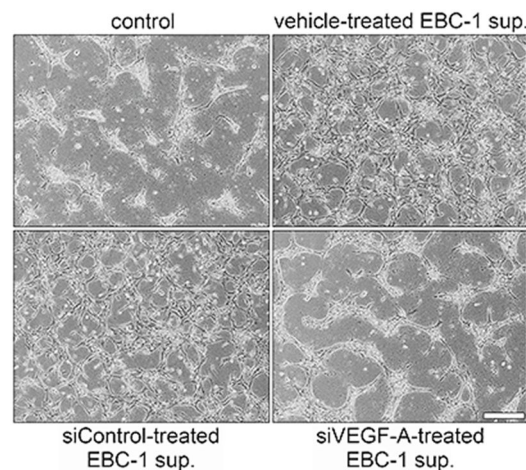


図4. VEGF-AのノックダウンはEBC-1上清による血管新生を部分的に抑制する

他の NSCLC 細胞株においても HDGF が VEGF 依存的血管新生を促進させるかを調べるため、NSCLC 細胞の 3 次元培養を試みた。無血清培養では生存できない Lu99 のような NSCLC 細胞株に対してシャーレを用いた血清存在下の単層培養を行うと、多くの体積を要する培地が必要となり、例えばシャーレ底を密に NSCLC 細胞が存在できたとしても培地中の NSCLC 細胞由来のタンパク濃度は

低くなるのが危惧された。これに対して 3 次元培養では、少ない体積で上述のシャーレ底を密にする細胞数以上の細胞をコラーゲンのような細胞外基質中に 3 次元的に集約することが可能となり、3 次元培養に必要な培地の体積を少なくすることで、結果として高濃度の NSCLC 細胞由来のタンパクを含んだ培地を回収することができると考えられた。まず、NSCLC 細胞の 3 次元培養に Lu99 細胞を用いてどの程度の細胞密度であれば 3 次元培養上清が 3 次元血管モデルに血管新生を誘導するかを調べた。その結果、 2×10^6 の 6 乗 (2 百万) 程度の細胞がコラーゲン内に存在すれば、その 3 次元培養上清によって十分な血管新生を誘導することが示された(図 6)。次に、HDGF に対する siRNA を Lu99 細胞に処理して 3 次元培養を行い、その培養上清を 3 次元血管モデルに処理したところ、興味深いことに血管新生の阻害が見られなかった(図 7)。また、HDGF の酵素結合免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を行ったところ、HDGF の siRNA が処理された Lu99 では顕著に HDGF の発現が抑制されていたことから、Lu99 細胞の 3 次元培養上清による血管新生は HDGF を介さないことが示唆された。加えて、EBC-1 上清と同様に Lu99 細胞の 3 次元培養上清に抗 VEGF 抗体を用いたが、Lu99 細胞の 3 次元培養上清による血管新生を抗 VEGF 抗体では抑制することができなかった(図 8)。以上の結果から、Lu99 細胞の 3 次元培養上清による血管新生には HDGF と VEGF は関与しないことが示唆された。Lu99 細胞の血管新生因子が何かを調べる

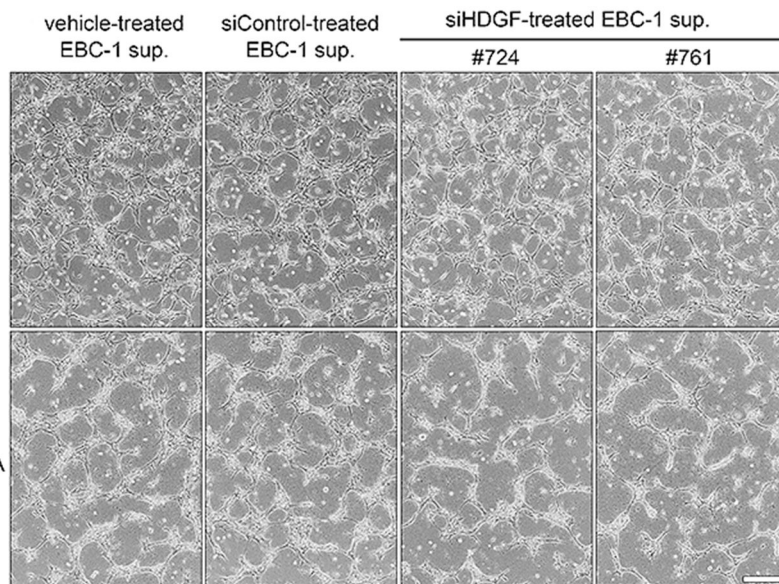


図5. HDGFはEBC-1上清によるVEGF依存的血管新生を促進させる

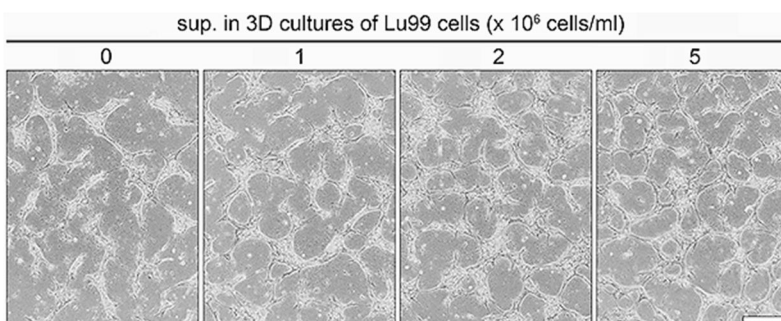


図6. Lu99細胞の3次元培養上清は血管新生を誘導する

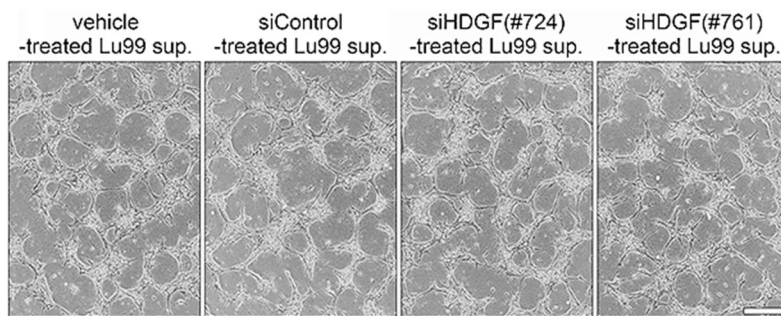


図7. Lu99細胞の3次元培養上清による血管新生にHDGFは関与しない

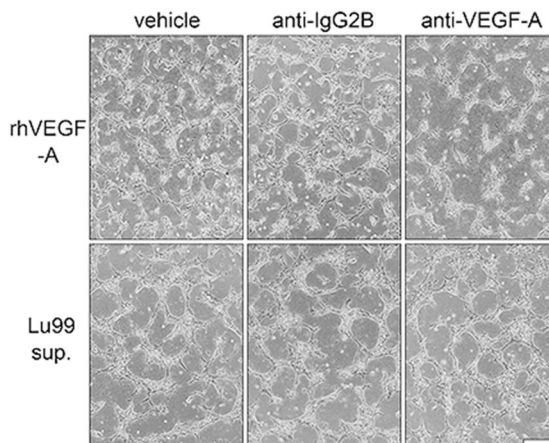


図8. Lu99細胞の3次元培養上清による血管新生に VEGFは関与しない

ために、EBC-1 細胞と Lu99 細胞のマイクロアレイを行った。Lu99 細胞のみで発現する 61 の遺伝子が同定され、その中から血管新生に関与するとこれまでに報告のある因子として、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2)、FGF-5 の 3 つの遺伝子に着目した。さらに、3 つの遺伝子に相当するタンパク質の中和抗体が入手可能であったので、それらの中和抗体を Lu99 細胞の 3 次元培養上清に加え、血管新生解析を行った。その結果、FGF-2 の中和抗体が Lu99 細胞の 3 次元培養上清による血管新生を顕著に阻害した (図 9)。以上の結果から、NSCLC において HDGF が VEGF 依存的血管新生を促進させ、FGF-2 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。

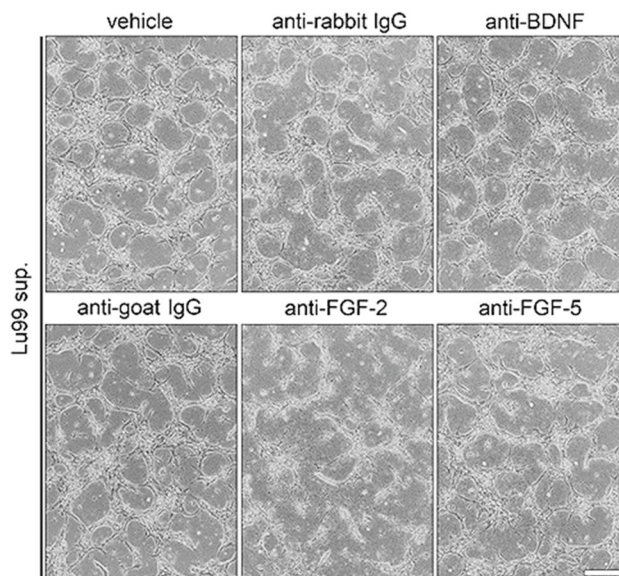


図9. FGF-2がLu99細胞の3次元培養上清による VEGF非依存血管新生を制御する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eguchi R and Wakabayashi I	4. 巻 44
2. 論文標題 HDGF enhances VEGF-dependent angiogenesis and FGF-2 is a VEGF-independent angiogenic factor in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 14-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口良二、若林一郎
2. 発表標題 ヒト非小細胞肺癌細胞株EBC-1において 血管内皮増殖因子と肝癌由来増殖因子は相乗的に血管新生を誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口良二
2. 発表標題 非小細胞肺癌においてHDGFはVEGFによる血管新生を促進し、FGF-2はVEGF非依存的な血管新生を制御する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	若林 一郎 (Wakabayashi Ichiro) (70220829)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------