

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350500

研究課題名(和文) 腫瘍内圧とがん血管、リンパ管、細胞外マトリックスのメカノバイオロジー

研究課題名(英文) Mechanobiology of tumor interstitial fluid pressure, angiogenesis, lymphangiogenesis, and Extracellular Matrix (ECM)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マトリックス分解酵素で血管・リンパ管新生抑制作用を持つADAMTS1は、低酸素や血流等のメカニカルストレスでも発現誘導される。今回は腫瘍組織における腫瘍内圧変化によるADAMTS1の発現制御メカニズムを解析し腫瘍内圧との関連性を検討した。宿主由来のADAMTS1は、主に新生血管内皮細胞から発現されていることが明らかになった。腫瘍血管の脆弱性、希薄化、腫瘍内圧の変化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 1 (ADAMTS1), a member of the matrix metalloproteinase family, inhibits angiogenesis and lymphangiogenesis. ADAMTS1 in endothelial cells is induced by hypoxia and mechanical stress such as blood wall shear stress. We investigated the effects of tumor interstitial fluid pressure (TIFP) on the expression of ADAMTS1 in the tumor tissues. Stromal ADAMTS1 was mainly expressed in neovascular endothelial cells. It was suggested that stromal ADAMTS1 might implicate in vascular fragility and rarefaction, and elevation of TIFP.

研究分野：生化学

キーワード：ADAMTS1 腫瘍内圧 細胞外マトリックス 血管新生 リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織では、血管新生は活発であるが血管は未熟で透過性が亢進している。またリンパ系の発達が悪く機能的でないため、腫瘍間質の内圧 (Interstitial fluid pressure: IFP) は容易に増大する。その腫瘍内圧の増大は、腫瘍組織内部に効果的に治療薬を送り込むことに対して妨げとなるばかりでなく、腫瘍血管やリンパ管を含む腫瘍組織および周囲に作用して腫瘍の進展に関与していると考えられている。最近、マトリックス分解酵素であり、かつ強力な血管・リンパ管新生抑制作用を持つ ADAMTS1 (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs 1) が、血流の強い動脈や高い壁面せん断応力下でその発現が増加し成熟血管の安定化や拡張性の動脈リモデリングに関与するとの報告がなされたが、腫瘍組織における ADAMTS1 の血管・リンパ管新生への制御メカニズムや腫瘍内圧との関連性については良く分かっていない。本研究では、ADAMTS1 が腫瘍においても血管・リンパ管新生を制御する重要な分子の一つであると捉え、血管・リンパ管新生の制御を介して腫瘍の IFP の変化に及ぼす影響、あるいは IFP 変化によるメカニカルストレスによる ADAMTS1 の発現制御メカニズムを解析することで腫瘍間質における ADAMTS1 と腫瘍内圧との関連性を探る。

2. 研究の目的

本研究の目的は腫瘍組織における ADAMTS1 の血管・リンパ管新生への制御メカニズムや腫瘍内圧に及ぼす影響あるいは腫瘍間質における ADAMTS1 発現制御メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 血管・リンパ管の形成が不良で容易にがん間質液が溜まり IFP が上昇しやすいヒト皮膚がん細胞 A431 と、高転移能を有し血管・リンパ管が比較的豊富なヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 を用いて担がんマウスモデルを作製し CD31 (血管内皮細胞マーカー) 及び LYVE-1 (リンパ管内皮特異的マーカー) に対する抗体を用いた免疫染色で血管・リンパ管密度を解析する。また、ADAMTS1 および関連分子の発現・局在も検討する。

- (2) IFP が増大したがん組織から 15 ゲージの中空針を用いて間質液の排出を行い、IFP を一時的に減少させた場合と、24 時間以上連続的に排出を続けた場合、または 10% あるいは 20% アルブミン処理 6 時間後最も IFP が低下した時の腫瘍組織を用い、ADAMTS1 の発現・局在を解析する。
- (3) リンパ管内皮細胞および A431 がん細胞に 10% および 20% の進展刺激をかけ ADAMTS1 を始めとするリンパ管新生関連分子やメカノセンサーと考えられている $\beta 1$ integrin などの分子の発現レベルを real-time PCR およびウエスタンブロット法にて解析する。
- (4) 宿主由来のがん間質から ADAMTS1 を発現していると思われる細胞を同定し、がん細胞との共培養から ADAMTS1 を始めとした血管・リンパ管新生関連分子およびメカニカルストレス関連分子の発現変化を real-time PCR およびウエスタンブロット法にて解析する。

4. 研究成果

- (1) 間質液が溜まり IFP が上昇しやすい A431 腫瘍組織と、MDA-MB-231 腫瘍組織とで血管およびリンパ管密度を比較したところ、血管密度は A431 に比べ MDA-MB-231 では約 9 倍、リンパ管密度は約 18 倍も高いことが分かった。また、市販の抗 ADAMTS1 抗体を用いた免疫染色の結果から、IFP が増大した腫瘍組織では、がん細胞や腫瘍間質内で ADAMTS1 が高発現していることや、逆に IFP を低下させると ADAMTS1 の発現量は減少することが分かった。
- (2) *in vitro* でリンパ管内皮細胞に 10% あるいは 20% の進展刺激をかけると ADAMTS1 の mRNA 発現量は約 2~2.5 倍に増加したが、リンパ管内皮細胞のマーカーであるリンパ管ヒアルロン酸レセプター LYVE-1 の発現量は 1/2 から 1/3 に減少し、VEGFR3 の発現量も約 6~7 割に低下することが分かった。しかし、リンパ管形成 (発生) に必須のホメオボックス遺伝子の Prox1 やメカノセンサーの一つと考えられている $\beta 1$ integrin の発現にはほとんど変動は見られなかった。
- (3) A431 がん細胞に 10% あるいは 20% の進

展刺激をかけるとリンパ管内皮細胞と同じように ADAMTS1 の mRNA 発現量が約 2 倍に増加することが分かった。他の ADAMTS4 や ADAMTS5 の発現量には大きな変動は認められなかった。

- (4) 市販の抗ADAMTS1抗体を用いた免疫染色の結果から、A431はADAMTS1を高発現するがん細胞であるが、がん細胞のみならず宿主由来の腫瘍間質にもADAMTS1を発現する細胞が認められ、IFPの増大に伴い発現が上昇することが分かった。一方、MDA-MB-231腫瘍組織では、がん細胞以外にADAMTS1を発現している細胞は主にがん関連マクロファージ(Tumor-associated macrophage: TAM: M2マクロファージ)であることが明らかになった。ADAMTS1は、がん組織周縁部のみならずがん組織内に浸潤しているTAMにも高発現していることが確認された。
- (5) そこで、ヒト急性単球性白血病由来細胞 (THP-1) を用い、A431 細胞あるいは MDA-MB-231 細胞と共培養し、THP-1 のマクロファージへの分化マーカーおよび血管・リンパ管新生に関与するサイトカインを始め、VEGFA, VEGFC, MMP9, ADAMTS1 等の mRNA、タンパク質発現レベルの解析を行った。THP-1 細胞は MDA-MB-231 細胞と共培養するとそのほとんどががん細胞に接着しマクロファージ様細胞に分化したが、A431 細胞との共培養ではそのほとんどが浮遊のまま単球からの分化は確認されなかった。M1、M2 マクロファージへの分化マーカーや MMP9、血管新生促進に関与する IL-8 の発現においても mRNA、タンパクレベル共に MDA-MB-231 細胞と共培養した場合はそれらの発現は有意に増加したが A431 細胞との共培養では大きな変化は認められなかった。また、ADAMTS1 の発現レベルは MDA-MB-231 細胞との共培養で約 1.5~2 倍程度の上昇しか認められず、A431 細胞との共培養では発現増加は全く認められなかった。
- (6) 市販の ADAMTS1 抗体を用いた免疫染色の結果と共培養の結果が大きく食い違うため、マウス ADAMTS1 プローブおよびマクロファージのマーカーである CD11b や M2 マクロファージのマーカーである

CD163 のプローブを用いた in situ hybridization に切替えて局在の解析を行った。その結果、MDA-MB-231 および A431 腫瘍組織において、ADAMTS1 は、がんの辺縁部に特異的に発現を認めたが、CD11b や CD163 とはほとんど共局在しなかった。そこで、血管内皮細胞のマーカーである CD31 のプローブを用いて解析したところ、ADAMTS1 は CD31 とほぼ全て共局在することが分かった。宿主由来の ADAMTS1 は、腫瘍間質の中でも主に新生血管の内皮細胞から発現されており、腫瘍血管の脆弱性、希薄化に関与している可能性が示唆された。おそらく腫瘍内圧の上昇にも関与している可能性があると考えられた。

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 3 件)

廣畑 聡、稲垣 純子、大月 孝志、細胞外マトリックス分解酵素ADAMTS1の多様性 薬学雑誌 誌上シンポジウム総説137巻7号(2017年7月1日発行)

Hayashi M, Okada A, Yamamoto K, Okugochi T, Kusaka C, Kudou D, Nemoto M, Inagaki J, Hirose Yuu, Okajima T, Tamura T, Soda K, Inagaki K. Gene cloning, recombinant expression, purification and characterization of L-methionine decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590. *J Biochem.*2017; 161: 389-398. 査読有, DOI: 10.1093/jb/mvv012

Amano M, Mizuguchi H, Sano T, Kondo H, Shinyashiki K, Inagaki J, Tamura T, Kawaguchi T, Kusakabe H, Imada K, Inagaki K. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. *J Biochem.* 2015; 157(6): 549-59. 査読有, DOI: 10.1093/jb/mvv012

[学会発表](計 18 件)

大月孝志、吉田浩之、品岡 玲、熊岸品岡加苗、チレッキ メフメットゼイネル、ハティポール オメルファルク、稲垣純子、西田圭一郎、岡田保典、廣畑 聡、Molecular and biochemical analysis of HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) gene

expression 第30回日本軟骨代謝学会
2017年3月3-4日、勸業館みやこめっせ
(京都市)

大月孝志、品岡 玲、熊岸香苗、河野真優
美、篠原真歩、浅野恵一、稲垣純子、大
橋俊孝、西田圭一郎、廣畑 聡、変形性関
節症へのヒアルロン酸投与、いつ投与す
べきか? ~動物モデルからの知見~ 第48
回日本結合組織学会学術大会 2016年6
月24-25日、良順会館・記念講堂(長崎
市)

Satoshi Hirohata, Keiichi Asano, Junko
Inagaki, Takashi Ohtsuki, Nao Yamanokuchi,
Shogo Watanabe, Toshitaka Oohashi
Distribution of versican and its degradation by
ADAMTS protease in the tumor
microenvironment. KSBMB International
Conference 2016 2016年5月18-20日、ソウ
ル市(韓国)

廣畑 聡、大月孝志、稲垣純子、シンポジ
ウム S54「ダウン症遺伝子 21 番染色体か
ら創薬標的を探す」細胞外マトリックス
分解酵素 ADAMTS1 の多様性
日本薬学会第136年会 2016年3月27-29
日、パシフィコ横浜(横浜市)

大月孝志、品岡 玲、熊岸加苗、佐藤美來、
金道幸子、長谷川みさ、海原弘貴、浅野恵
一、障子友理、稲垣純子、大橋俊孝、西田
圭一郎、廣畑 聡、ラット変形性関節症モ
デルへのヒアルロン酸投与による軟骨保
護効果の解析

第29回日本軟骨代謝学会 2016年2月
19-20日、広仁会館(広島市)

Keiichi Asano, Junko Inagaki, Yuri Shoji,
Takashi Ohtsuki, Toshitaka Oohashi and
Satoshi Hirohata

Association of Extracellular Matrix Cleavage
and Tumor Vasculature Formation 第9回高
度医療都市を創出する未来技術国際シン
ポジウム 2016年2月5日、岡山大学(岡山
市)

大月孝志、金道幸子、長谷川みさ、稲垣純
子、浅野恵一、障子友理、熊岸加苗、西
田圭一郎、大橋俊孝、廣畑 聡、伸展刺激
の強度による細胞外マトリックスタン
パクおよびマトリックス分解酵素発現への
影響 BMB 2015(第38回日本分子生物学
学会年会 第88回日本生化学会大会) 2015

年12月1-4日、神戸ポートアイランド(神
戸市)

Keiichi Asano, Junko Inagaki, Yuri Shoji,
Matthias Hofmann, Takashi Ohtsuki,
Toshitaka Oohashi, Satoshi Hirohata Impact
of Versicanolysis in Tumor Angiogenesis. ゴ
ードンカンファレンス matrix
metalloproteinase 2015年8月2-7日、メイ
ン州・サンデーリバー(米国)

Satoshi Hirohata, Omer Faruk Hatipoglu,
Eriko Kusunoki, Takashi Ohtsuki, Junko
Inagaki, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya.
ADAMTS1 null mice demonstrated
omphalocele phenotype. ゴードンカンファ
レンス matrix metalloproteinase 2015
年8月2-7日、メイン州・サンデーリバー(米
国)

Takashi Ohtsuki, Yuri Shoji, Keiichi Asano,
Aya Hirata, Teruyuki Kawadi, Junko Inagaki,
Kanae Kumagishi, Keiichiro Nishida,
Toshitaka Oohashi, Satoshi Hirohata.
HYALURONAN TREATMENT REDUCED
MATRIX DEGRADATION BOTH IN
VITRO AND IN VIVO RAT
OSTEOARTHRITIS MODEL. 10th
International conference HYALURONAN
2015 2015年6月7-11日、フィレンツェ(イ
タリア)

浅野恵一、稲垣純子、障子友理、Matthias
Hofmann、大月孝志、大橋俊孝、廣畑 聡、
腫瘍血管新生における細胞外マトリク
ス分解の意義、第13回がんとハイポキシア
研究会2015年6月5、6日、国立遺伝学研
究所(静岡県三島市)

稲垣純子、浅野恵一、障子友理、Matthias
Hofmann、大月孝志、大橋俊孝、廣畑 聡
低酸素により誘導されるADAMTS1のリン
パ管新生への作用、第13回がんとハイポ
キシア研究会 2015年6月5、6日、国立遺
伝学研究所(静岡県三島市)

廣畑 聡、稲垣純子、大月孝志、浅野恵一、
川地輝幸、障子友理、平田 彩、シーズ発
表:急性低酸素をターゲットにした診断・
治療用分子の研究、中央西日本メディカル
イノベーション2015 2015年2月17、18日、
(岡山市)

Keiichi Asano, Junko Inagaki, Yuri Shoji,
Matthias Hofmann, Takashi Ohtsuki, Aya

Hirata, Teruyuki Kawadi, Yoshifumi
Ninomiya, Satoshi Hirohata, Toshitaka Ohashi
Is Versicanolysis associated with tumor
angiogenesis? 第8回高度医療都市を創出
する未来技術国際シンポジウム がん治
療と診断のための分子標的研究最前線
2015年2月6日(岡山市)
平田 彩、大月孝志、稲垣純子、浅野恵一、
川地輝幸、障子友理、廣畑 聡、大橋俊孝、
メカニカルストレスが細胞外基質および
マトリックス分解酵素へ与える影響第37
回日本分子生物学会 2014年11月25-27
日、パシフィコ横浜(横浜市)
Satoshi Hirohata, Omer F Hatipoglu, Eriko
Kusunoki, Takashi Ohtsuki, Junko Inagaki,
Keiichi Asano, Yuri Shoji, Teruyuki Kawadi,
Aya Hirata, Mehmet Z Cilek, Yoshifumi
Ninomiya Perinatal Lethality in ADAMTS1
Deficient Mouse. American Society for
Matrix Biology Biennial Meeting (ASMB)
2014 2014年10月12-15日、オハイオ州
クリーブランド(米国)
Takashi Ohtsuki, Satoshi Hirohata, Yuri Shoji,
Keiichi Asano, Aya Hirata, Teruyuki Kawadi,
Junko Inagaki, Kanae Kumagishi, Keiichiro
Nishida, Toshitaka Oohashi, Aiji Ohtsuka
Decreased Sox9 mRNA Expression by
Cytokine Stimulation Was Ameliorated by
Hyaluronan in Chondrosarcoma Cells.
American Society for Matrix Biology Biennial
Meeting (ASMB) 2014 2014年10月
12-15日、オハイオ州クリーブランド(米
国)
Keiichi Asano, Junko Inagaki, Matthias
Hofmann, Teruyuki Kawadi, Aya Hirata, Yuri
Shoji, Takashi Ohtsuki, Yoshifumi Ninomiya,
Satoshi Hirohata ADAMTS cleaved versican
in tumor angiogenic area American Society
for Matrix Biology Biennial Meeting (ASMB)
2014 2014年10月12-15日、オハイオ州
クリーブランド(米国)

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・保健学研究科・教授
研究者番号: 90332791

(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