シンポジウム

「口腔癌の浸潤：マクロ・ミクロ・モレキュラー」

腫瘍血管内皮細胞の異常と癌の悪性化との関連

樋田 京子 秋山 廣輔
大賀 則孝 間石 奈湖

要旨：腫瘍血管新生はがんの浸潤転移に深く関与していることは広く理解されている。がん組織を養う血管を標的とし、がんを兵糧攻めにできる血管新生阻害療法は全てのがんに共通する血管新生を標的としているため、多くの癌腫で抗癌剤との併用で上乗せ効果が認められており、がんの新しい治療法として近年注目されている。本法の標的である腫瘍血管内皮細胞に関して、この血管新生阻害療法が提唱された当時、「血管内皮は遺伝学的に安定な正常細胞であるので薬剤抵抗性を獲得しないはずである。」と考えられてきた。しかし近年、本治療法に対しても薬剤耐性などの問題点があることがわかってきた。腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と比較して特異的な遺伝子の発現が亢進していること、サイトカインや薬剤への感受性が異なること、高い生存能と遊走能を有するなどの特徴がある。さらに腫瘍血管内皮の一部には、染色体異常があることも知られてきた。腫瘍血管内皮細胞の特性を理解することは、腫瘍血管新生のメカニズムの解明、癌の浸潤・転移の新たな制御をめざす、新規血管新生阻害療法の開発に寄与するものと期待される。

本章では、われわれの研究を含め癌の悪性化に関わる腫瘍血管内皮細胞の特異性を中心に、最近の研究結果を概説する。

キーワード：腫瘍血管新生、腫瘍血管内皮細胞、浸潤、転移、薬剤耐性

1. 腫瘍血管新生

血管新生：Angiogenesis とは既存の血管から新たに血管分岐が発芽して伸長することをいい、脈管形成：vasculogenesis は血管前駆細胞からの分化によって血管内皮細胞が発生し管腔を形成する過程である¹⁾。これらは成体でも起こるが、主に発生期にみられる現象である²⁾。内皮細胞だけで形成された血管は不安定で周囲に壁細胞とよばれる血管平滑筋やペリサイトの裏打ちができて成熟化し、大中小の径が異なる血管によって階層ができる。発生期のみならず成体においても酸素や栄養の需要に応じて血管の階層性変化や退縮といった血管リモデリングはおこっている。これも広義の血管新生であるが、一般的には既存の血管から発芽して新たな血管ができることを血管新生という。成体でおこる血管新生は、がんや創傷治癒の際など虚血に陥った組織において低酸素や増殖因子の影響などでがん細胞が血管新生因子を放出することで誘導される。

がんにとって腫瘍血管は酸素や栄養を供給するばかりで

はなく、遠隔臓器に転移をする際の関門になっている。

血管新生因子には vascular endothelial growth factor (VEGF) のほか、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), angiopoietins, hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF), placental-derived growth factor (PlGF) なども存在する³⁾。がんではこのような血管新生因子が過剰になっている。

2. 血管新生阻害療法

血管新生阻害療法は、がん組織を養う血管を標的にし、がんを兵糧攻めにする治療法で、Dr. Judah Folkman によって 1971 年に提唱された。実際には、ヒト VEGF 中和抗体、ベバシズマブの認可により、さらに広く知られるようになった。この治療法の根底には、「血管内皮は正常細胞で遺伝学的に安定である。したがって、がん細胞のように薬剤抵抗性を獲得することはない。」という概念が存在していた。血管新生阻害療法は、全てのがんに共通する血管新生を標的としているため、多くの癌腫で抗癌剤との併用で上乗せ効果が認められている。しかし、ベバシズマブを代表とした既存の血管新生阻害剤は正常血管にも必須の VEGF シグナルを遮断するため、高血圧や出血などの副

腫瘍血管	腫瘍血管内皮細胞
1) 周皮細胞との関係が疎で透過性が亢進している	1) 増殖能と遊走能が高い
2) 走行が不規則	2) 細胞成長因子に対するレセプターの発現が亢進している。
	3) 特異マーカーを発現している (EGFR, TEMs, CD13など)
	4) 染色体異常をもつ
	5) 薬剤抵抗性がある

図 1 腫瘍血管内皮細胞の特異性
正常血管に比較した腫瘍血管の特異性ならびに、腫瘍血管内皮細胞の特異性。

作用の問題も明らかになっている。これらの血管新生阻害剤の多くは分離培養の比較的平易な正常血管内皮細胞 (Normal endothelial cell: NEC) を用いて開発されたものであるが、実際の腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) は正常部位の血管とはかなり異なる環境に存在する。そこは低酸素、低栄養、さらにはがん細胞やがん間質細胞から分泌されるサイトカインに暴露された環境にある。がん細胞に薬剤抵抗性をもたらすような腫瘍微小環境が TEC にも遺伝学的な変化をもたらすことも考えられ、TEC の性質はこれまでの概念よりもはるかに複雑なものであることが最近の研究で示唆され始めている。一方、腫瘍血管は、がん組織を養うばかりではなく、がん幹細胞のニッチ (住みか) を形成していることや、がんの転移にも重要な役割を担っていることがわかってきた。以上より腫瘍血管を標的とした新しい治療法の開発の重要性は依然高いと考えられる。

3. 腫瘍血管の形態学的な特徴

腫瘍血管は正常血管と比較して病理組織学的に異なり、未熟である。TEC 同士の接着が正常に比べて疎であり、血管の壁細胞は存在するが血管内皮細胞との接着も疎であるため血管の透過性が亢進している⁴⁾。

また、血管基底膜も異常であることが知られている。IV 型コラーゲンの厚みが血管の部位によって異なり不規則である⁵⁾。このようなことから腫瘍の組織間圧は高くなり、血管の屈曲や湾曲などがあちこちにみられ、血流のよどみが生じている。その結果、正常血管では動脈、静脈、毛細血管が秩序をもった階層構造をとっているのに対し、腫瘍血管では不均等な径をもつ血管が乱雑に走行している⁶⁾。そのため血管が豊富であるにもかかわらず血流が少なく、がん組織は低酸素状態になっている。そして、放射線療法が効きにくい原因のひとつがこの低酸素状態であることが知られている⁷⁾ (図 1)。

4. 腫瘍血管内皮細胞の分離培養

腫瘍血管内皮細胞の分離と培養が技術的に平易ではないため、腫瘍血管新生の *in vitro* 研究の多くは正常組織由来の細胞であるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) やヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC) が主に用いられてきた。しかし、上述のようにがん組織の中では血管も正常組織と異なる形態を持つことが知られるようになり、近年、腫瘍組織中のわずかな割合を占める (約 2% 前後) TEC を分離し、それらを用いた研究もなされるようになってきた。そのことにより腫瘍血管の構成要素である内皮細胞そのものが正常と異なることが知られてきた⁸⁾。

腫瘍血管内皮細胞の分離については、研究グループによって用いる血管内皮マーカー (CD31, CD105, VEGFR2, Tie2 など) が若干異なるが、磁気ビーズ細胞分離法⁹⁾、フローサイトメトリーによる細胞分離法など現在一般的になった手法によって行われている。しかし分離後の培養に関しては他の細胞の成長や混入をさせずに僅かな数の腫瘍血管内皮細胞の純度を保って生かし続けるという初代培養特有の難しさがつきまとい、分離した腫瘍血管内皮細胞を用いて生物学的な性質を検討する試みは未だ多いとはいえない。しかし、今後は培養の技術の向上に伴い腫瘍血管内皮細胞を用いた研究の増加が望まれる。

われわれはこれまで TEC の特性を解析するために TEC を分離し、それらを培養して様々な特異性を見出してきた (図 1)¹⁰⁾。

5. 腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現解析

TEC 特異遺伝子に関する報告はこれまでいくつかある。Tumor endothelial marker (TEMs) は前述の St. Croix らによって同定され⁸⁾、そのうちもっとも腫瘍血管に特異的とした TEM8 がメラノーマの増殖に関与していること

が最近報告されている。Dickkopf-homolog 3 (Dkk-3), CD13, Collagen 2a, integrin $\alpha V\beta 3$ などが腫瘍血管で発現が亢進していることや、卵巣がんや大腸癌の TEC マーカーに関して複数の報告があることから¹¹⁾、腫瘍血管が形態だけではなく遺伝子発現レベルでも正常血管とは異なることが示されている。また、これまで腫瘍組織内ではがん細胞に高く発現していると知られていた遺伝子が最近、TEC においても発現亢進していることが報告されている。例えば、われわれは上皮細胞増殖因子 (EGFR: epidermal growth factor receptor)¹²⁾ やシクロオキシゲナーゼ (COX-2)¹³⁾、VEGF¹⁴⁾、CXCR7¹⁵⁾、Biglycan¹⁶⁾、PTGIR (Osawa Cancer Sci in press) などが TEC で発現が高いことを報告している (図 1)。

6. 腫瘍血管の生物学的な特性

われわれは、TEC の遺伝子発現解析に加え、それらを培養して NEC と生物学的性質を比較する研究も行ってきた。分離後数か月を経たあとにおいても、培養腫瘍血管内皮は汎血管内皮マーカーの他に腫瘍血管に特異的と報告されている Tumor endothelial marker (TEM8), CD13 などの分子の発現が確認できた¹⁷⁾。このことにより少なくとも一部の TEC 特異性は培養条件下でも保たれるということが示唆された。また、TEC は NEC と比較して増殖能と遊走能が高く、VEGF、FGF-2 などの血管新生因子に対する感受性が高いことがわかった¹⁷⁾。また、EGFR 阻害剤や polyphenol epigallocatechin-3 gallate (EGCG) に対する感受性も高いことがわかった¹⁸⁾。さらに、TEC における COX-2 や VEGF の発現亢進は Hu antigen R (HuR) によってこれらの mRNA が細胞質内で安定化していることがわかり、低酸素・低栄養に陥ったがん細胞においてみられる同じ機構を TEC も使ってその高い生存性を保っていることが示唆された¹⁴⁾。さらに、TEC には幹細胞のマーカー Sca-1, CD90 が発現しており^{17, 19)}、このことは TEC の一部は血管内皮前駆細胞であるというこれまでの見解を裏付けるものと思われる。また 2008 年には TEC が骨や軟骨への分化能をもっており、幹細胞様の性質をもっているという報告もなされている²⁰⁾ (図 1)。

7. 腫瘍血管内皮細胞の染色体異常

われわれは TEC の異常性として、染色体異常 (核型異常) があることを見出した¹⁰⁾。分離直後の未培養の血管内皮細胞に抗 CD31 の免疫染色と FISH を行った検討では、TEC には 16-54% の異数体 (aneuploidy) が認められ、これらの aneuploidy は継代後の TEC ではさらに増悪することもわかった。核異型については肝細胞や筋細胞などの正

常細胞においても 4 倍体 (tetraploidy) がみられることはある。しかし TEC には単なる染色体の数が多い (polyploidy) だけではなく、由来の不明な marker chromosome, translocation, double minute, missing chromosome などの染色体の構造異常があることが multi-color fluorescent in situ hybridization FISH (M-FISH) によって認められたことから、単なる tetraploidy を超えて TEC には染色体不安定性: chromosomal instability (CIN) があることが示唆された。

正常な細胞周期チェック機構が働いている細胞に染色体数異常が起こるとそれ以降の細胞分裂はおこらない。すなわち、TEC においては、それらが aneuploid のまま増殖を続けていることから細胞周期チェック機構がもはや正常に働いていないことが示唆される。

ちなみに、核異型のある TEC の所見は混入した腫瘍細胞によるものではないということは、われわれのマウス TEC では既に証明済みである^{10, 21)}。また FISH や M-FISH のプローブはマウス細胞に特異的でありヒト細胞にはハイブリダイズしないことも確認した。よってマウス TEC における染色体異常を示した細胞は混入した腫瘍細胞ではない。

われわれは、ヒト悪性腫瘍の切除検体の切片と分離したヒト TEC の FISH を行い、ヒト TEC においても染色体異常があることを見出した²²⁾。なお、TEC が aneuploidy を獲得する機序については未だ不明である。文献的には、このような染色体異常をもつ TEC はマウスのヒト腫瘍移植モデルにおいてのみならず、ヒトの悪性腫瘍、例えば、腎がん、神経膠芽腫、悪性リンパ腫においても報告されている。特にリンパ腫²³⁾ などの造血系腫瘍においてはがん細胞と同じ染色体異常が TEC にも認められていることから、がん細胞または前駆細胞が脱分化して腫瘍血管を構成した可能性が示唆されている²⁴⁾。

8. 腫瘍血管内皮細胞と薬剤抵抗性

TEC は長年にわたり腫瘍細胞と異なって遺伝学的に正常だと考えられてきた。しかし、これらが chromosomal instability を獲得しているとする、もはや腫瘍の間質に属する細胞も遺伝子の不安定性を持ちうることが示唆され、TEC が腫瘍細胞のように薬剤耐性を獲得する可能性を考慮しなければならない。

実際にわれわれは TEC が MDR1 遺伝子の発現亢進をとらない、paclitaxel などいくつかの抗癌剤に対して抵抗性ともつことを見出した (図 2)。さらに血管内皮の薬剤耐性獲得のメカニズムに少なくともがん細胞が分泌する VEGF そして VEGFR2 を介したシグナル伝達によって MDR1 遺伝子の発現が亢進し (図 3)、その転写産物であ

図 2 腫瘍血管内皮細胞の薬剤耐性 (文献 25 より転載)

正常血管内皮と腫瘍血管内皮におけるパクリタキセルに対する感受性 (A)。腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞に比較して薬剤に対する抵抗性がある。薬剤抵抗性関連遺伝子の発現, Multidrug resistance gene (MDR1) をリアルタイム PCR 法で確認した (B)。腫瘍血管内皮細胞では MDR1 の発現が亢進していた。

図 3 腫瘍培養上清による正常血管内皮細胞における薬剤耐性の誘導 (文献 25 より転載)
腫瘍培養上清処理により, ヒト正常血管内皮細胞 (HMVEC) に MDR1 の発現亢進とパクリタキセルに対する抵抗性が誘発された。

る ABC トランスポーター, P-glycoprotein (P-gp) によってこれらの薬剤排出が進むことが関与することを初めて示した (図 4)²⁵⁾。血管新生阻害療法が提唱されたときには想像されなかったが, 近年, VEGF 阻害などによる腫瘍血管新生阻害療法に対しても薬剤耐性獲得が生じるということが報告されている¹⁾。その機序としては, 抗 VEGF 療法で VEGF を遮断し続けると腫瘍細胞が VEGF 以外の血管新生因子を多く代償性に分泌するようになるという, 主に腫瘍側に生じる抵抗性が考えられている¹⁾。しかし, TEC ががん微小環境において薬剤耐性を獲得するというわれわれの発見は, がんの治療には腫瘍細胞のみならず間質細胞も含めて治療のターゲットとして視野に入れる必要

性があることを裏付けている。

9. がんの浸潤転移と腫瘍血管内皮

われわれは上述のような腫瘍血管内皮細胞の薬剤耐性や染色体異常は決してすべての腫瘍血管内皮細胞に見られるものではなく, 一部の細胞に起こっていることを見出していた。そこで, 腫瘍血管内皮細胞には多様性があるのではないかと考え, 最近, 悪性度が異なる癌における血管内皮の性質の比較を行った¹⁹⁾。転移能の異なるがんを用いて, そこから分離・培養された腫瘍血管内皮細胞の性質を比較した。転移能が高い腫瘍の血管内皮細胞は, 転移能の低い

図 4 腫瘍血管内皮細胞における薬剤耐性の獲得機構 (文献 25 より転載)

われわれが明らかにした血管内皮におけるパクリタキセルに対する抵抗性獲得のメカニズムとして、がん細胞由来の VEGF により血管内皮で Akt の活性化がおこる。その後 MDR1 の転写因子である YB-1 がリン酸化され、核内移行することにより MDR1 遺伝子の転写が起き、その産物である P-gp の発現が亢進して血管内皮細胞が薬剤を排出するようになり薬剤耐性となる。詳細は文献 25 に記載。

腫瘍の血管に比べ、薬剤抵抗性があり血管新生能が旺盛で¹⁹⁾、がんの転移にも深く関与している可能性が示唆された (Maishi 投稿中)。このように、がんの悪性度 (転移能) の違いによる腫瘍血管内皮細胞の多様性を発見したことは、血管標的を介したがんの転移制御の可能性を示唆し、新たな標的分子の開発の必要性を明らかにした。

抗がん剤の個別化選択や血管新生の程度をモニタリングするためのバイオマーカーの発見のためにもさらなる腫瘍血管内皮の生物像解明が望まれる。

おわりに

TEC を分離培養することにより、特異的遺伝子の発現とその意義、染色体の異常、抗癌剤への耐性などを明らかにすることができた。TEC を含めた間質の細胞の多様なバイオロジーに対する理解が進み、それらも治療のターゲットとして視野に入れた新たな腫瘍治療戦略が今後期待される。

文 献

- 1) Folkman, J.: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6 : 273-286, 2007.
- 2) Tepper, O.M., Capla, J.M., et al.: Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 105 : 1068-1077, 2005.
- 3) Bergers, G., Benjamin, L.E.: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3 : 401-410, 2003.
- 4) Hashizume, H., Baluk, P., et al.: Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156 : 1363-1380, 2000.
- 5) Baluk, P., Morikawa, S., et al.: Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 163 : 1801-1815, 2003.
- 6) McDonald, D.M., Choyke, P.L.: Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9 : 713-725, 2003.
- 7) Jain, R.K.: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307 : 58-62, 2005.
- 8) St Croix, B., Rago, C., et al.: Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289 : 1197-1202, 2000.
- 9) 樋田京子 ed.: 磁気ビーズを用いたがん組織からの細胞分離法. ledn : 金芳堂 2008.
- 10) Hida, K., Hida, Y., et al.: Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 64 : 8249-8255, 2004.
- 11) Hida, K., Hida, Y., et al.: Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies. *Cancer Sci* 99 : 459-466, 2008.
- 12) Amin, D.N., Hida, K., et al.: Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* 66 : 2173-2180, 2006.
- 13) Muraki, C., Ohga, N., et al.: Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. *Int J Cancer* 130 : 59-72, 2012.
- 14) Kurosu, T., Ohga, N., et al.: HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. *Br J Cancer* 104 : 819-829, 2011.
- 15) Maishi, N., Ohga, N., et al.: CXCR7: A novel tumor endothe-

- lial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int* 62 : 309-317, 2012.
- 16) Yamamoto, K., Ohga, N., et al.: Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. *Br J Cancer* 106 : 1214-1223, 2012.
- 17) Matsuda, K., Ohga, N., et al.: Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture. *Biochem Biophys Res Commun* 394 : 947-954, 2010.
- 18) Ohga, N., Hida, K., et al.: Inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Cancer Sci* 100 : 1963-1970, 2009.
- 19) Ohga, N., Ishikawa, S., et al.: Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol* 180 : 1294-1307, 2012.
- 20) Dudley, A.C., Khan, Z.A., et al.: Calcification of multipotent prostate tumor endothelium. *Cancer Cell* 14 : 201-211, 2008.
- 21) Hida, K., Klagsbrun, M.: A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res* 65 : 2507-2510, 2005.
- 22) Akino, T., Hida, K., et al.: Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am J Pathol* 175 : 2657-2667, 2009.
- 23) Streubel, B., Chott, A., et al.: Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 351 : 250-259, 2004.
- 24) Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., et al.: Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468 : 824-828, 2011.
- 25) Akiyama, K., Ohga, N., et al.: Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am J Pathol* 180 : 1283-1293, 2012.

Abnormality of tumor endothelial cells and cancer progression

Kyoko Hida, Kosuke Akiyama,
Noritaka Ohga and Nako Maishi

Vascular Biology, Hokkaido University
Graduate School of Dental Medicine
(Chief: Associate Prof. Kyoko Hida)

Abstract

Tumor blood vessels play an important role in tumor progression and metastasis. Thus, targeting the tumor blood vessels is an important strategy in cancer therapy. Tumor blood vessels generally arise from pre-existing vessels and have been thought to be genetically normal. However, they have been shown to differ from their normal counterparts e.g., with regard to morphological changes. We isolated tumor endothelial cells (TECs) from mouse tumor xenografts and showed that they were abnormal. TECs up-regulate many genes, proliferate more rapidly, and migrate more than normal endothelial cells (NECs). Furthermore, the TECs in our study were cytogenetically abnormal. TECs were drug resistant to paclitaxel with upregulation of multidrug resistance 1 (MDR1) mRNA, compared to NECs. Tumor-conditioned medium treatment caused drug resistance in NEC. We concluded that TECs can acquire cytogenetic abnormalities while in the tumor microenvironment.

In order to develop ideal antiangiogenic therapies, it is important to understand the crosstalk between blood vessels and the tumor microenvironment.

This review considers the current studies on TEC abnormalities, and discusses the possible mechanism by which the tumor microenvironment produces abnormal TECs.

Key words : Tumor angiogenesis, tumor endothelial cell, invasion, metastasis, drug resistance

Requests for reprints to: Dr. Hida K., Vascular Biology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13 Nishi 7 Kita-ku Sapporo, 060-8586, Japan