

主論文の要約

**A novel mechanism of neovascularization in
peritoneal dissemination via cancer-associated
mesothelial cells affected by TGF- β derived from
ovarian cancer**

〔 卵巣癌由来TGF- β にて活性化した癌関連中皮細胞による
腹膜播種内血管新生の新規メカニズム 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

藤掛 佳代

【緒言】

上皮性卵巣癌（EOC：epithelial ovarian cancer）は婦人科悪性腫瘍の中で主要な死亡原因の一つである。腹膜播種はEOCにおいて最もよく認められる転移経路であり、患者の予後は腹膜播種の程度に依存する。腹膜播種は遊離した腫瘍細胞が腹膜中皮に付着し腹膜下組織へ浸潤することで進行するが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、transforming growth factor- β （TGF- β ）の作用によって変化したヒト腹膜中皮細胞（HPMC：human peritoneal mesothelial cell）を癌関連中皮細胞（CAMC：cancer-associated mesothelial cell）と位置付け、その役割について、特に血管内皮増殖因子（VEGF：vascular endothelial growth factor）に着目し検討した。

【方法】

卵巣腫瘍患者から採取した大網よりHPMCを分離抽出し、EOC組織や悪性腹水と共培養しウエスタンブロット法で解析した。また高転移性卵巣癌細胞株ES-2細胞の培養上清（CM：conditioned medium）を添加しquantitative real-time PCR（RT-PCR）法にて上皮間葉転換（EMT：epithelial-mesenchymal transition）関連転写因子の発現を評価した。次にHPMCをTGF- β で刺激しウエスタンブロット法、RT-PCR法にて解析した。さらにHPMC、CAMCにおけるVEGF産生をELISA法、RT-PCR法にて解析した。最後にHPMC、CAMCのCMを用いヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC：human umbilical venous endothelial cell）のmigration assay、tube formation assayを行った。

【結果】

まず、EOC組織または悪性腹水の共存下でHPMCがどのように形態変化するか観察した。正常なHPMCは敷石状形態であったが、EOC組織や悪性腹水と共培養すると線維芽細胞様の紡錘形に変化した（Figure 1A-D）。ウエスタンブロット解析では、腹水添加の割合に応じてHPMCでの α -SMA発現亢進を認めた（Figure 1E）。次にES-2細胞のCMをHPMCに添加したところ、上皮系から間葉系への形態変化が認められた（Figure 2A,B）。この変化はTGF- β 受容体阻害剤（SB-431542）添加によって完全に阻害されたため（Figure 2C）、HPMCの形態変化は腫瘍由来のTGF- β に依存すると考えた。各種EMT関連転写因子は癌細胞のCMを添加したHPMCにおいて発現亢進しており、その作用はSB-431542によって阻害された（Figure 2D）。次にTGF- β がHPMCに与える影響を評価した。HPMCはTGF- β 刺激によって紡錘形へ変化した（Figure 3A-C）。またEMT関連転写因子であるVimentin、N-cadherinおよび α -SMAの発現は亢進し、E-cadherinの発現は低下した（Figure 3D,E）。このようにTGF- β によって形態変化し、EMT関連転写因子の発現亢進を示すHPMCをCAMCと定義した。

VEGFはHPMCおよびEOC細胞の両方から産生されるが、本研究ではHPMCおよびCAMCにおけるVEGF発現に焦点を当てた。VEGFの発現はTGF- β 刺激によって亢進し（Figure 4A,B）、SB-431542添加によって著明に低下した（Figure 4C）。またCM中VEGF濃度も同様の結果となった（Figure 4D）。

さらに、CAMCが血管新生に与える影響を調べるためHUVECの遊走能 (Figure 5A) と管腔形成能 (Figure 6A) を評価した。HUVECの遊走能はCAMCのCMで処理した場合に亢進したが、その効果はベバシズマブ (VEGF阻害剤) の添加により阻害された (Figure 5B-F)。またSB-431542、ベバシズマブの添加によりさらに抑制された (Figure 5G)。一方HUVECの管腔形成能もCAMCのCMで培養した際に亢進し、ベバシズマブを添加すると有意に低下した (Figure 6B-E)。

【考察】

本研究では、EOC 患者の悪性腹水や高転移性 EOC 細胞上清の存在下において、HPMC の形態が上皮系から間葉系パターンに著しく変化し、 α -SMA の発現が亢進することを示した。その変化は TGF- β 受容体阻害剤添加によって完全に阻害され、腫瘍由来の TGF- β は HPMC の形態変化に関与することが示唆された。実際に TGF- β は HPMC の形態変化を誘導し、EMT 関連転写因子の発現を亢進させた。このような HPMC の変化は「中皮間葉転換」として認識されている。我々は、EOC 細胞と HPMC の相互作用が腫瘍と癌関連線維芽細胞 (CAF : cancer-associated fibroblast) の相互作用に類似するという仮説を立て、TGF- β で刺激した HPMC を CAMC と位置付けた。

CAMC では VEGF 産生が著明に増加しており、また CAMC の CM 添加によって HUVEC の遊走能および管形成能が有意に亢進した。これらの結果は、EOC における血管新生、血管透過性が CAMC によって促進されるという仮説を支持する。CAMC が産生した VEGF は腹膜下組織の血管内皮細胞に作用し、それらの遊走および微小血管への発生を促し、最終的に腫瘍血管新生を促進すると考えられた。

VEGF のモノクローナル抗体であるベバシズマブでの治療は、悪性腹水をコントロールし患者の QOL 向上に寄与することが報告されている。しかしベバシズマブが腹水を制御する機構の詳細は不明である。おそらくベバシズマブは、腫瘍由来の VEGF だけでなく CAMC 由来の VEGF を抑制することができ、その結果腹膜透過性が著しく低下すると推測される。腹膜中皮は腹腔内腔の表面を広く覆っており、TGF- β などの腫瘍由来の生理活性物質は腹水を介して腹膜全域に広がり、徐々に HPMC から CAMC への変化を誘発する可能性がある。我々は以前、外因性 TGF- β の増加が HPMC からの内在性 TGF- β の追加産生を誘導し、TGF- β の相乗的産生を引き起こすことを報告した。したがって CAMC は TGF- β 、VEGF を順次分泌し、悪性腹水のさらなる産生をもたらすと考えられた。本研究では、CAMC による内皮細胞の遊走能促進作用が、TGF- β 受容体阻害剤、VEGF 阻害剤の存在下で抑制されたが、この結果により CAMC 由来の内因性 TGF- β の存在およびその内皮細胞遊走促進効果を裏付けることとなった。本研究における癌細胞、HPMC、CAMC の関係性のシェーマを示す (Figure 7)。この仮説は、EOC における腹膜播種、癌性腹膜炎の新規発症メカニズムである。

【結論】

腫瘍由来の TGF- β は正常な HPMC を CAMC へ変化させた。CAMC は VEGF 産生

を介して血管新生の促進および悪性腹水の産生増加を引き起こすことが示された。
EOCにおける癌細胞-腹膜中皮間のクロストークの解明は、EOCの新規治療戦略の開発さらにはEOC患者の予後改善につながる。