

# 悪性胸膜中皮腫における腫瘍血管新生

太田安彦・渡辺洋宇\*

## REVIEW ARTICLE

W'Waves

悪性胸膜中皮腫は近年増加傾向にありながら、未だ確立した治療手段はなく、治療にきわめて抵抗性の予後不良な悪性腫瘍である。腫瘍血管新生を標的とした治療は、癌の heterogeneity を克服しうる新たな抗癌治療法として期待されており、各種腫瘍における血管新生のネットワークの解析が臨床検体を用いて進められているが、悪性胸膜中皮腫における腫瘍血管新生に関する知見は乏しい。

多くの腫瘍で発現性が確認され、予後との相関が報告されている vascular endothelial growth factor (VEGF) 関連因子群の本腫瘍における発現性と血管新生抑制因子のひとつである thrombospondin-1 (以下 TSP-1) の発現意義に関するわれわれの知見<sup>1,2)</sup>を概説する。なお、本研究に用いた中皮腫サンプルは米国国立 Karmanos Cancer Institute, Harvey I Pass 教授より供与を賜ったものである。

### 悪性胸膜中皮腫における VEGF 関連因子群の発現性

近年、VEGF ファミリーとして、Type B, C, D および E が次々と同定され、うち Type C は Fms-like tyrosine kinase 4 (flt-4) の ligand としてリンパ管内皮の増生への関与が指摘されている<sup>3,4)</sup>。VEGF 関連因子群として VEGF, VEGF-C, VEGFRs について、悪性胸膜中皮腫 54 切除標本および非担癌正常胸膜 5 標本を用い半定量的

RT-PCR にて遺伝子発現を解析した結果を Table 1 に示した。平均 densitometry index (内部コントロールは  $\beta$ -actin を使用) で評価した場合、VEGF-C, flt-4 および kinase insert domain-containing receptor (KDR) の発現性が正常胸膜組織に比し腫瘍組織で高い傾向を認めた。また、腫瘍組織での各 VEGF 関連遺伝子群の発現頻度はいずれも高く、とりわけ VEGF-C, flt-4, KDR の陽性率は 80% 以上と高率であった。

正常胸膜での平均発現強度をこえた過剰発現例の占める割合は同様に、VEGF-C, flt-4 および KDR で高い傾向を示した。因子間における発現性の相関を検討した結果、VEGF-C と flt-4 ( $p=0.0018$ ,  $r=0.67$ )、VEGF と flt-1 ( $p=0.0089$ ,  $r=0.27$ )、VEGF と KDR ( $p=0.0002$ ,  $r=0.39$ ) に有意な正相関が確認された。

### 腫瘍内脈管密度およびリンパ管密度と VEGF 関連因子群との相関

5 $\mu$ m 幅の凍結切片を用いて、腫瘍組織内脈管密度を Factor VIII に対する免疫染色にて、またリンパ管密度を 5'-nucleotidase に対する酵素組織染色 (Wachstein) 法<sup>5)</sup>にて評価した。リンパ管内皮における 5'-nucleotidase 酵素活性は血管内皮のそれに比し高く、パラホルムアルデヒド固定により同酵素活性を適度に抑制し、リンパ管にのみ遺残した酵素活性を検出するものであり、この適切な条件を得るために 10~30 分まで 5 分間隔でアルデヒド固定による酵素活性の抑制を施行した (1 標本につき 6 枚の連続した cryosection を使用)。

\* 金沢大学医学部第一外科学教室

**Table 1** Expression of VEGF, VEGF-C, and VEGFRs in malignant pleural mesothelioma (MPM) tumors

	Percentage of positive tumors	*Percentage of overexpression	Mean densitometry index in MPM tumors	Mean densitometry index in normal pleural tissue
VEGF	75.9%	31.5%	1.80±0.41	1.80±0.60
VEGF-C	85.2%	66.7%	0.87±0.15	0.16±0.03
flt-1	74.1%	20.4%	0.50±0.11	0.95±0.46
KDR	90.7%	42.6%	1.73±0.38	1.08±0.23
flt-4	96.3%	59.3%	1.24±0.25	0.34±0.07

\* >each mean value of normal pleural tissue

**Table 2** Relationship between lymph node metastasis and angiogenesis associated factors

	Mean LVD* (×400)	Mean VD** (×200)	Mean densitometry index for VEGF	Mean densitometry index for VEGF-C
Node negative cases (n=17)	10.2±1.4	11.0±1.5	1.3±0.2	0.9±0.2
Node positive cases (n=30)	8.3±1.0	10.9±1.1	1.9±0.6	0.8±0.2

\* LVD: lymphatic vessel density, \*\* VD: microvessel density

**Table 3** Cox proportional hazard regression analysis using 46 malignant pleural mesothelioma patients with standardized resections

	Hazard ratio	p	95% CI
Gender	3.437	0.0067	1.409~8.384
Stage (I, II vs. III, IV)	3.729	0.0091	1.387~10.025
VD	2.247	0.0326	1.070~4.719
*COM-VEGF	0.400	0.0731	0.147~1.089

\* A combination factor of VEGF, flt-1, and KDR. It was defined as "positive" if two or more of the three associated variables are strongly expressed.

なお、酵素組織染色の sensitivity は 57.4% であり、腫瘍および間質部分での不特異な染色が認められた場所を避け、リンパ管を算定した。脈管密度は hot spot 3 カ所における平均値をとった。その結果、リンパ管密度は VEGF-C ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.63$ ) および flt-4 ( $p = 0.0164$ ,  $r = 0.64$ ) と強相関し、脈管密度と VEGF との間にも有意な正相関 ( $p = 0.0188$ ,  $r = 0.33$ ) が確認された。

悪性胸膜中皮腫における腫瘍血管新生における VEGF、とりわけ VEGF-KDR 系の重要性が示されるとともに、VEGF-C が中皮腫におけるリンパ管新生に関与する可能性が示された。腫瘍組織内におけるリンパ管密度はリンパ節転移形成に影響を及ぼす可能性が考慮されるが、悪性胸膜中皮腫を用いた今回の検討では、リンパ節転移と腫瘍内リンパ管密度あるいは VEGF-C 発現との間に有意な相関は確認されなかった (Table 2)。

### Thrombospondin-1 (TSP-1) の発現性

変異型 p53 は TSP-1 発現を down-regulate するとの報告がみられ<sup>6)</sup>、TSP-1 の発現性の減弱が腫瘍の進展とかかわる可能性が指摘されている。しかし、実際には腫瘍での TSP-1 の発現性の亢進が確認されており<sup>7-9)</sup>、またドメイン解析において、血管新生刺激因子である  $\alpha v \beta 3$  インテグリンや TGF- $\beta$  に対する binding site を有することが判明している<sup>10,11)</sup>。したがって、メディエーターによっては血管新生作用を発揮し、発現性の亢進が腫瘍の進展を促進する可能性が考慮され、その真の動態および発現意義の把握は本因子の治療への応用性を見極めるうえで重要な課題といえる。

悪性胸膜中皮腫 78 切除標本、担癌正常肺組織 43 標本および非担癌正常胸膜 5 標本を用いて TSP-1 遺伝子発現を RT-PCR 法にて判定量的に評価した結果、腫瘍組織での TSP-1 陽性率は

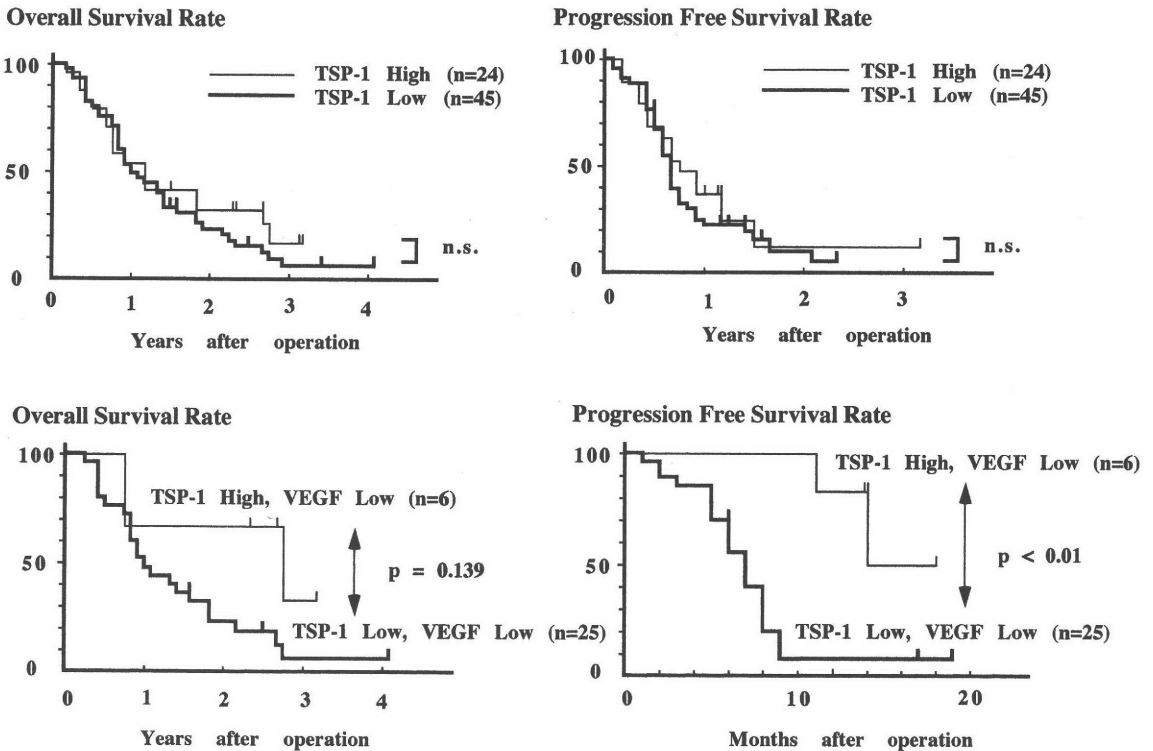


Fig. 1 Kaplan-Meier overall survival and disease free survival plots in malignant pleural mesothelioma patients who underwent standardized complete resections.

95% (74/78) と高率であり、腫瘍組織での平均発現強度は担癌正常肺および正常胸膜での平均発現強度に比し有意に高く、腫瘍組織での発現性の亢進が確認された。また、術後病期 I / II 期は III/IV 期より、リンパ節転移陰性群は陽性群に比し有意に TSP-1 発現レベルが高く、TSP-1 の発現性が悪性胸膜中皮腫の進展性と逆相関している可能性が示された。

**予後因子としての意義**

各血管新生関連因子群の予後因子としての意義を腫瘍組織における各因子の平均値を基準として高値群および低値群に分け検討した。単変量解析では、臨床病理学的因子として年齢、リンパ節転移の有無、組織亜型は予後と相関せず、血管新生関連因子群としてリンパ管密度、VEGF-C または flt-4、VEGF-C および flt-4 のいずれれもが高値を示した場合を陽性とするコンビネーション因子の予後因子としての意義は確認されなかった。多変

量解析にて、臨床病理学的因子として性と病期に加えて、腫瘍内脈管密度がおのおの独立した予後因子となることが判明した。また、VEGF 単独での予後因子としての意義は見出せなかったが、VEGF と VEGFRs (flt-1 と KDR) とのコンビネーション因子 (VEGF と VEGFRs のいずれか 2 つが高値を示した場合を陽性とするもの) が予後因子となる可能性が示唆された (Table 3)。

一方、TSP-1 の全体としての発現性は、overall survival および progression free survival を用いた検討では、ともに予後に影響を及ぼさなかった。しかし、TSP-1 の予後への影響を検討するうえで、VEGF の発現性を加味した解析の必要性が考慮された。なぜなら、VEGF 高値群での TSP-1 平均発現強度が VEGF 低値群のそれに比し有意に高いことが判明し、本腫瘍において両者が coordinate している可能性が示唆されたためである。そこで、VEGF 低値群において TSP-1 発現と予後との相関性を検討した結果、progression free sur-

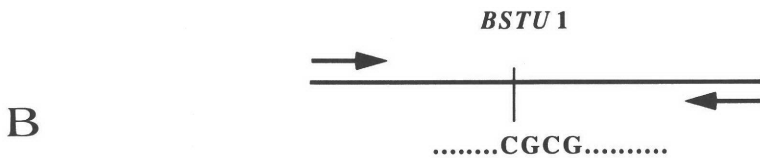
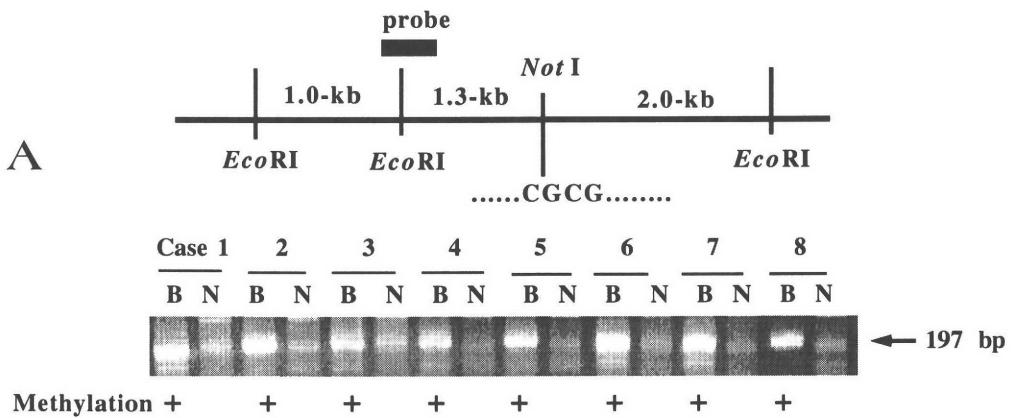
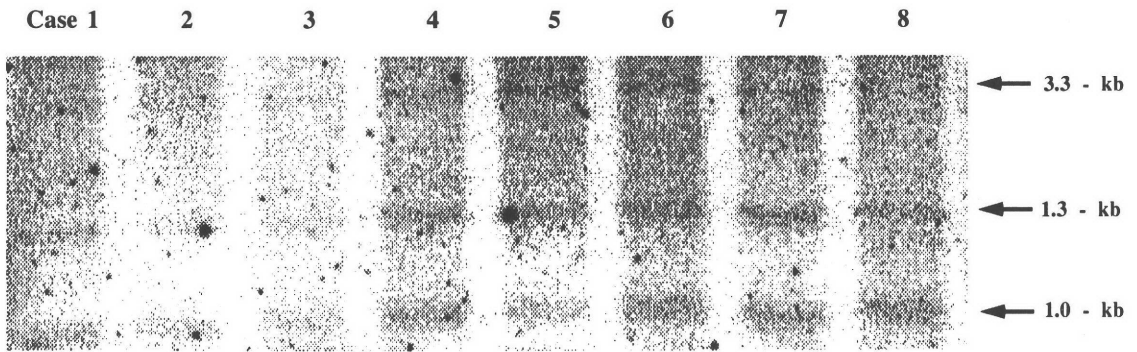


Fig. 2 Methylation of the TSP-1 associated CpG island. A) Digestion of genomic DNA with *EcoR* 1 and *Not* 1 results in 1.0 and 1.3-kb fragments if the TSP-1 associated CpG island is unmethylated and 1.0 and 3.3-kb fragments if the site is methylated. B) PCR amplification was done using specific primers flanking the methylation-sensitive *Bst* U 1 site. Digestion of genomic DNA with *Bst* U 1 results in a 197 bp fragment if the site is methylated. Lanes: B, genomic DNA after *Bst* U 1 digestion; N, genomic DNA without *Bst* U 1 digestion.

vival において TSP-1 高発現群の予後が低発現群に比し有意に良好であり, overall survival rate においてもその傾向が認められた (Fig. 1).

TSP-1 遺伝子座における LOH およびプロモーター領域における methylation と TSP-1 発現

Genetic な変化として, 腫瘍組織の TSP-1 遺伝子局在部位における LOH の有無を TSP-1 遺伝

子発現の認められなかった、または発現性の低かった18症例の腫瘍組織および担癌正常肺組織を用いて検討した。6種類のマーカーを用いたマイクロサテライト解析の結果、chromosome 15q15.1-21.1にLOHは確認できなかった。また、epigeneticな変化として、TSP-1プロモーター領域におけるCpG islandのmethylationの有無を2種類のassayを用いて解析し、TSP-1遺伝子発現との相関性を検討した。

対象としたサンプルは、TSP-1遺伝子発現の亢進していた8検体を用いて、第1のassay系では、methylation-sensitive restriction siteにおける*Not I* siteを*Eco R I* flank siteとともに酵素処理後、別途作成したプローブを用いてザンブロット法にて解析した<sup>12)</sup>。その結果全例において、同部位にmethylationの存在が確認された(Fig. 2A)。第2のassay系は、*Not I* siteよりも上流域に存在する*BSTU 1* methylation sensitive restriction siteを利用したものであり、同部を酵素処理後PCR増幅を行い、電気泳動後PCR産物を評価した。同様に、全例においてTSP-1プロモーターにおけるmethylationの存在が確認され(Fig. 2B)、TSP-1発現調節機序としてmethylationの関与の可能性は低いものと考えられた。

### まとめ

悪性胸膜中皮腫においてVEGFおよびVEGF-Cは腫瘍組織におけるangiogenesisおよびlymphangiogenesisに主要な役割を演じていると考えられた。Flt-4は中皮腫細胞に発現が認められ、VEGF-C-flt-4系は本腫瘍の増殖因子として作用している可能性が示唆されたが、VEGF-Cの予後因子としての意義は確認できなかった。ただし、今回用いたサンプルにおいて、リンパ節転移の有無は予後に影響を及ぼさず、リンパ節転移が重要な予後因子となる場合を含めた検討が必要と考える。

本腫瘍においては腫瘍内の血管密度が独立した予後因子となり、VEGFとりわけVEGF-KDR系がanti-angiogenic therapyを行ううえで、有効性の期待できる標的と考えられた。本腫瘍にお

けるTSP-1の発現性は亢進しており、本腫瘍の増殖進展に本因子は抑制的に作用すると考えられた。悪性胸膜中皮腫におけるTSP-1の発現調節には、TSP-1遺伝子座のchromosome deletion, rearrangement, methylation以外の機序が作用している可能性が高い。

### 文献

- Ohta Y, Shridhar V, Bright RK, et al. VEGF and VEGF type c play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours. *Br J Cancer*, (in press).
- Ohta Y, Shridhar V, Kalemkerian GP, et al. Thrombospondin-1 expression and clinical implications in malignant pleural mesothelioma. *Cancer*, (in press).
- Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 122: 3829-3837, 1996.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276: 1423-1425, 1997.
- Wachstein M, Meisel E. The histochemical distribution of 5'-nucleotidase and unspecific alkaline phosphatase in the testicle of various species and in two human seminomas. *J Histochem*, 2: 137-148, 1954.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p 53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265: 1582-1584, 1994.
- Varani J, Rister BL, Hughes LA, et al. Characterization of thrombospondin synthesis, secretion and cell surface expression by human tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, 7: 265-276, 1989.
- Roberts DD, Sherwood JA, Ginsburg V. Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. *J Cell Biol*, 104: 131-139, 1987.
- Pratt DA, Miller WR, Dawes J. Thrombospondin in malignant and non-malignant breast tissue. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25: 343-350, 1989.
- Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1. *Cell Biol*, 130: 503-506, 1995.
- Gao AG, Lindberg FP, Dimitry JM, et al. Thrombospondin modulates alpha V beta 3 function through integrin associated protein. *J Cell Biol*, 135: 533-544, 1996.
- Ahuja N, Mohan AL, Stolker JM, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 57: 3370-3374, 1997.