

## 論 文 要 旨

Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy.

血管新生における活性化血管内皮細胞のCD9を  
目標とした新たな血管新生抑制治療の検討

上 笹 貫 太 郎

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

Tetraspanin superfamily は、細胞膜4回貫通型タンパクであり、細胞外ループにCCG構造を持つものと定義され、現在約30種類が確認されている。そのファミリーに属するCD9は、1985年に血小板の抗原として発見されて以来、免疫系細胞や平滑筋細胞、血管内皮細胞など様々な細胞の表面に存在していることが報告されてきた。また1991年には、癌細胞の運動抑制抗原として単離された(MRP-1)。これまで癌細胞浸潤と転移の阻害、細胞接着、遊走、ジフテリアトキシン結合への関与が示唆されてきたが、近年新たにシグナル伝達、細胞死などへの関与が報告され、CD9ノックアウトマウスでは不妊以外の異常が見当たらないなど、未だ不明な点が多い。今回我々は、CD9の発現抑制による血管内皮細胞の運動抑制を検討し、CD9機能抑制による血管新生抑制効果の可能性を示す。

【材料および方法】

血管内皮細胞 HMVEC を対象に、アデノウイルスベクターを用いた CD9 強発現(Ad.CD9)、または RNA 干渉法(siRNA-CD9)による CD9 発現抑制を施行した。CD9 の発現の変化は、ウェスタンブロットおよび免疫染色にて確認した。これらの細胞の遊走能を、ボイデンチャンバーを用いた migration assay で評価した。また、ボイデンチャンバーにマトリゲルをコーティングしたもので同様の実験を行い、浸潤能を評価した。細胞運動促進因子として血管内皮増殖因子 VEGF および肝細胞増殖因子 HGF を用いた。生体内血管新生抑制の評価によく用いられているラット角膜血管新生モデルを作成し、増殖因子含有ペレットへの血管新生に対する CD9 発現抑制の効果を検討した。さらに、加齢黄斑変性や増殖糖尿病などの眼科血管新生疾患により近いモデルとしてマウス脈絡膜血管新生モデルを作成し、siRNA-CD9 または抗 CD9 抗体の硝子体腔内注入による血管新生抑制効果を評価した。CD9 発現抑制血管内皮細胞の生存率を WST-8 assay を用いて評価し、増殖抑制の原因として細胞毒性を TUNEL 染色で、増殖能抑制を Ki-67 染色によって評価した。CD9 発現抑制による血管内皮細胞の運動抑制のメカニズムとして、まず CD9 と同様に細胞膜表面に存在している増殖因子受容体のシグナル伝達阻害の可能性が考えられた。そこで CD9 発現抑制 HMVEC に対して増殖因子による刺激を行い、VEGF 受容体

VEGFR、HGF 受容体 c-Met、および integrin-増殖因子受容体間のクロストークの鍵である focal adhesion kinase (FAK)のリン酸化をウェスタンブロットで評価した。また他の機序として、CD9 発現抑制による細胞膜構造の変化が運動抑制をもたらした可能性を検討した。細胞運動における重要な膜表面タンパクで CD9 と相互作用のある integrin  $\alpha 3 \beta 1$  の発現量の変化を、ウェスタンブロットを用いて比較し、また細胞遊走時の integrin  $\alpha 3 \beta 1$  および MT1-MMP の膜表面の分布を、免疫染色を用いて評価した。

### 【結果】

RNA 干渉法(siRNA-CD9)による CD9 発現抑制は、HMVEC の遊走能および浸潤能を抑制した。この効果は、ラット角膜血管新生モデルおよびマウス脈絡膜血管新生モデルでも、siRNA-CD9 による血管新生抑制として評価された。また、臨床で実際に用いられている抗 VEGF 抗体製剤の硝子体腔内注入と同様の手技で行った、抗 CD9 抗体硝子体注入でも同様の結果が得られた。WST-8 assay では、siRNA-CD9 導入後 3 日目から有意に HMVEC の生存率が低下していた。TUNEL 染色では差は見られなかったが、Ki-67 染色では CD9 発現抑制細胞の増殖能抑制を認め、増殖能低下による生存率低下であることが示唆された。CD9 発現抑制による血管内皮細胞の運動能低下の原因として、増殖因子受容体のシグナル伝達阻害、または膜表面タンパクの局在変動を検討した結果、各増殖因子受容体および FAK のリン酸化は変化していないにも関わらず、CD9 発現抑制細胞のラメリポディアにおける integrin または MT1-MMP の局在に変化がみられた。

### 【結論及び考察】

CD9 発現抑制による血管新生を評価し、少なくとも眼科領域における血管新生疾患への新たな治療戦略となり得ることを示唆した。細胞刺激によって活性化された血管内皮細胞の遊走能および増殖能の抑制効果を認める一方、過去の報告にある CD9 ノックアウトマウスの正常発達を考慮すると、CD9 発現抑制の効果はアクティベートされた血管内皮細胞に優位な現象と考えられる。CD9 発現抑制は、VEGF をはじめとする増殖因子のシグナルを阻害することなく、integrin などの膜表面タンパクの異常な局在化の結果として血管新生を抑制する機序が考えられた。これらの結果は、正常血管の維持にも必要とされる増殖因子の働きを阻害しないだけでなく、血管新生の誘発因子を特定せずに、抑制効果を得られることを示している。さらにアポトーシス誘発などの細胞毒性も認められないことを考えると、現在臨床応用されている抗 VEGF 抗体製剤よりむしろ安全で優れているのかもしれない。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 155 号	学位申請者	上笹貫 太郎
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位
	副査	上村 裕一	副査
	副査	橋口 照人	副査
			博士 (医学)
			黒野 祐一
			三井 薫

**Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy.**

血管新生における活性化血管内皮細胞のCD9を目標とした

新たな血管新生抑制治療の検討

Tetraspanin superfamily に属する CD9 は、1985 年に発見されて以来、血管内皮細胞など様々な細胞への発現が報告された。癌の浸潤と転移、正常細胞の接着、遊走などとの関与が示唆される一方、ノックアウトマウスでは不妊以外の異常は認めていない。血管新生に関しては、抗 CD9 抗体による血管内皮細胞の運動能抑制が報告されてきたが未だ不明な点が多い。今回我々は、CD9 の発現抑制による血管内皮細胞の運動能への影響を検討し、病的動物モデルを用いた血管新生抑制効果を評価した。

*In vitro* では CD9 を強発現、または発現を抑制した血管内皮細胞 HMVEC を用いた運動能の評価を行った。強発現 HMVEC の遊走能実験ではウイルスベクターによる細胞傷害を認め、十分な検討が行えなかったが、CD9 を標的とした RNA 干渉法 (siRNA-CD9) によって CD9 の発現は十分に抑制され、遊走能、および浸潤能実験では有意な運動能低下を認めた。またこの結果は、血管内皮増殖因子 (VEGF) および肝細胞増殖因子 (HGF) のどちらの血管新生刺激においても同様の傾向であった。ラット角膜モデル、およびマウス脈絡膜新生血管モデルを用いた *In vivo* での検討では、siRNA-CD9 の投与によって有意に血管新生が抑制された。抗 CD9 抗体の投与でも同様の結果を得られた。CD9 の発現抑制によって HMVEC の Viability は低下したが、その原因として増殖能の低下が考えられた。一方、アポトーシスの誘導は認めなかった。よって、臨床応用において副作用が少ないという利点が考えられた。

運動能抑制について CD9 発現抑制による増殖因子受容体 Flk-1 および cMet のシグナル阻害を検討したが、どちらの受容体にも変化はなかった。CD9 と複合体を形成する Integrin や、MT1-MMP の細胞運動時の局在について検討した結果、CD9 発現抑制によって細胞膜表面での局在が変化した。CD9 は細胞内ドメインが短く、リン酸化部位があるとは考えにくい。受容体のシグナル伝達への影響も認めなかったことから、CD9 が直接リン酸化を受け、細胞内のシグナル伝達に関与している可能性は低いと考えられる。CD9 は Integrin 以外にも様々な分子と複合体を形成し、抗 CD9 抗体によるそれらの局在の変化も報告されていることから、膜上分子の適切な局在を制御していると考えられ、CD9 の発現抑制によって局在に変化が起こった結果、Integrin などへのシグナル伝達が阻害された可能性がある。

本研究は、CD9 という最近注目される分子について、血管新生への関与を検討した研究である。動物モデル、培養細胞と多方面からの検討を行っており、抗 VEGF 抗体製剤に続く血管新生抑制治療を考える意味でも重要な知見を提供している。今後の検討を進めることで、より良い治療法の確立に寄与する可能性のある有意義な研究と言える。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 155 号	学位申請者	上笹貫 太郎
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位
	副査	上村 裕一	副査
	副査	橋口 照人	副査
			博士 (医学)
			黒野 祐一
			三井 薫

主査および副査の5名は、平成23年11月21日、学位申請者 上笹貫 太郎君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) *in vitro* で HMVEC を用いた理由は？ また血清を2%とした理由は？

(回答) 当初は Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) と Human Dermal Microvascular Endothelial Cell (HMVEC) 両方で実験を行いましたが、培養中の HUVEC は形質転換しやすく、安定した実験結果が得られなかったため、今回は HMVEC のみで実験を行いました。また血清フリーでは細胞の遊走が全く認められず、各濃度で検討した結果、2%以上の濃度が必要でした。

質問2) *in vivo* での血管新生抑制は、運動能抑制によるものなのか、増殖能抑制によるものなのか？

(回答) *in vivo* の結果は、運動能抑制と増殖能抑制の両方によるものと考えています。しかし、*in vitro* では運動能抑制より増殖能抑制がややマイルドであった印象があり、運動能抑制の割合がやや高いかもしれません。

質問3) 角膜マイクロポケットアッセイでは、ポケット作成だけで角膜への刺激になるのではないかと？また、縫合刺激のみでのアッセイではどのような結果になると考えられるか？注射の刺激、siRNA 剤の効果の範囲はどの程度か？

(回答) 角膜のアッセイでは、他に縫合、アルカリ外傷の作成による血管新生の方法もあり、今回の実験でポケット作成による刺激も含まれると考えます。ペレット以外の刺激による血管新生に対しても、CD9 発現抑制の効果が複数の血管新生刺激因子に対して認められたことから刺激因子を限定しないものと考えられますので、同様の結果になると思います。製剤は注入部位周辺の角膜輪部血管に導入されたと考えます。注入時の刺激はあると思いますが、増殖因子による血管新生誘導のほうが強いと考えます。

質問4) 動物実験では、どれくらいの期間 siRNA の効果が期待できるのか？

(回答) siRNA は生体内では RNase によってすぐに分解されますが、ウサギの眼球を用いた局所投与(硝子体腔内注入)では、注入後1週間でも網膜において siRNA が十分に検出されたと報告されています。

質問5) 生体モデル実験での結果から、siRNA-CD9 よりも抗 CD9 抗体のほうが効果的ではないか？

(回答) 今回は抗体のほうがより効果的でした。しかし修飾を加えることで抗体を上回る効果をもつ可能性があります。

質問6) CD9 強発現の実験の意味付けはどう考えているか。

(回答) 過去の報告は抗体を用いた実験であり、CD9 の発現と細胞運動能との関係がはっきりしておりません。そこで、CD9 強発現と、発現抑制の両方でまずは検討する必要があると考えました。しかし、内皮細胞には CD9 が豊富に存在するため、明らかなさらなる強発現を得られず、遊走実験でもウイルスベクターによる傷害性が原因と思われる抑制効果が出てしまいました。今回の実験では、強発現による運動能への影響は確認できませんでした。

質問7) CD9 発現抑制による血管新生抑制効果は VEGF 活性抑制によるものと同様に思われるが違いはあるのか？

(回答) VEGF 阻害は VEGF 受容体のシグナルを直接阻害するのに対して、CD9 発現抑制は増殖因子受容体のシグナルへの影響は認めていません。CD9 はシグナルへの直接的な関与ではなくインテグリンなどの膜タンパクの局在を制御す

る役割を担っていると考え、CD9 抑制によって局在が変化した結果、膜タンパクのシグナルに変化が生じて運動能などに影響したのだと思います。よって、VEGF 阻害とは機序の違うものと考えます。

質問 8) CD9 ノックアウトマウスの不妊はどのようにして起こるのか？またヘテロでも起きるのか？

(回答) オスの生殖機能には異常はありません。メスの卵細胞に原因があります。通常、透明帯と卵細胞の間にエキソソームが存在し精子の膜融合を助けるが、ノックアウトマウスではエキソソームが発現せず、精子が卵細胞膜を通過できません。不妊はホモのメスでは認めますが、ヘテロでは正常に妊娠します。

質問 9) CD9 は lipid raft に存在すると考えて良いのか？ また、CD9 は細胞質内においても染色されているのか？

(回答) CD9 を含む Tetraspanin superfamily は lipid raft に存在すると考えられています。免疫染色で細胞質内においても確認できます。

質問 10) CD9 発現抑制による cell cycle への影響はあるのか？

(回答) 抗 CD9 抗体による Wnt タンパク発現抑制の報告もあり、cell cycle への影響はあると考えられます。

質問 11) CD9 発現の増減を制御する因子はどのようなものがあるのか？

(回答) CD9 発現の制御因子は報告されておられません。ただし、未分化な正常細胞ほど CD9 が強発現している傾向があり、また癌種によって発現量が全く異なることから、何かしらの制御機構はあると思います。

質問 12) 増殖能への影響として、cell cycle への影響はどうか？また接着能との関係はどうか？

顕微鏡下の観察では完全に増殖が止まった印象はありませんでした。今回は接着能との関連は検討していませんが、抗体によって接着能が低下したとの報告があります。

質問 13) メカニズムとして結局どのような経路が考えられるのか？またアクチンフィラメント細胞骨格の変化や ILK リン酸化に關与する FAK-Y861 のリン酸化の検討はどうか？

(回答) 過去の報告にもありますが、CD9 の構造から考えて、CD9 自体がシグナル経路を持っているとは考えにくく、本研究においても増殖因子受容体のシグナル経路に変化はなく、直接的な細胞内シグナルへの関与は認めませんでした。おそらく、膜内外で他の分子との相互作用により、それらの分子の適切なコンフォメーションなどを保つ役割ではないかと想像しています。また、癌細胞では癌種によって CD9 の発現に大きな差があります。CD9 を発現しない癌への強発現で運動能が抑制され、強発現している癌では抗体によって運動能が阻害されるという、相反する過去の報告からみましても、CD9 の存在が間接的に相互作用している分子の作用を阻害していると考えます。FAK-Y861 については今後の検討課題にさせていただきます。

質問 14) CD9 抑制剤の眼内投与法は抗 VEGF 抗体と同様か？また眼科領域以外での siRNA 製剤の研究はどうか？

(回答) 抗 CD9 抗体は同様の方法で問題ないと考えます。また siRNA 製剤も siRNA-VEGF 製剤が同様の方法で臨床試験が行われています。最近、肝癌に対するナノパーティクル修飾型の siRNA 製剤の臨床試験が開始されています。

質問 15) ターゲットとして CD9 のほうが、VEGF より副作用が少ないのか？また血管新生抑制効果の差はどうか？

(回答) 今回の実験ではアポトーシス誘導作用は認めず、CD9 ノックアウトマウスに不妊以外の異常を認めなかったことから、より安全な方法となり得ると考えます。ただし、長期投与による影響は検討が必要です。抑制効果の比較はできておりません。どの程度の差があるかは今後の検討課題であると思います。

質問 16) 局所への siRNA 投与は可能だと思うが、肝癌など直接注射できない疾患への投与についてはどうか？

(回答) siRNA はすぐに分解されてしまうので、いかに効率よく導入できるかが課題です。効果の持続、導入効率向上のために siRNA のコレステロール修飾などドラッグデリバリー法の研究が進められています。

質問 17) 加齢黄斑変性以外の眼科疾患に対する投与の適応はあるのか？

(回答) 増殖糖尿病網膜症などに対して手術時の出血を軽減するなどの補助的な目的で用いられることがあります。

質問 18) 抗 VEGF 抗体製剤の副作用として網膜委縮が報告されているがどうしてそのようなことが起こるのか？

(回答) VEGF は血管内皮細胞だけでなく、様々な細胞の維持に関わっていますので、網膜を構成する細胞への直接的な影響や、正常血管が退縮することによる循環障害も原因と考えられます。アポトーシス誘導の報告もあります。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。