

香川県立保健医療大学リポジトリ

上皮性卵巣癌におけるAngiopoietin/Tie2 signaling-Vascular endothelial growth factor systemの役割

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 秦, 幸吉 メールアドレス: 所属:
URL	https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/174

上皮性卵巣癌における Angiopoietin/Tie2 signaling - Vascular endothelial growth factor system の役割

秦 幸吉*

香川県立保健医療大学保健医療学部看護学科

The Roles of Angiopoietin/Tie2 Signaling - Vascular Endothelial Growth Factor System in Epithelial Ovarian Cancer

Kohkichi Hata*

*Department of Nursing, Faculty of Health Sciences,
Kagawa Prefectural College of Health Sciences*

Abstract

The recent discovery of angiopoietin-1 (Ang-1) and angiopoietin-2 (Ang-2) has provided novel and important insights into the molecular mechanisms of blood vessel formation. Ang-1 helps to maintain and stabilize mature vessels by promoting interaction between endothelial cells and surrounding support cells, e.g., pericytes. Ang-2 is expressed at sites of vascular remodeling and is believed to antagonize the stabilizing action of Ang-1. In the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF), vessel destabilization by Ang-2 has been hypothesized to induce an angiogenic response. However, in the absence of VEGF, Ang-2 leads to vessel regression. Although the exact role of the angiopoietin/Tie2 system remains enigmatic, the available evidence indicates that the angiopoietin/Tie2 system in the presence of VEGF is important for the initiation of angiogenesis and for vascular sprouting in tumor.

The role of angiopoietin/Tie2 system with VEGF in epithelial ovarian cancer has been revealed by molecular biological analysis. A new insight to understand the biology of epithelial ovarian cancer might lead to development of a new molecular target therapy for epithelial ovarian cancer.

Key Words: angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie2, vascular endothelial growth factor, 上皮性卵巣癌 (epithelial ovarian cancer)

*連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1 香川県立保健医療大学保健医療学部看護学科 秦 幸吉

*Correspondence to: Kohkichi Hata, MD, PhD, Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Murecho-hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123 Japan

緒 言

図1は1971年にFolkmanが報告した固形癌の増殖における血管新生関与に関するシエマである¹⁾。それによると、癌はある一定の大きさまでは拡散(diffusion)で新陳代謝を行い大きくすることができる。しかしながら、それ以上大きくなるためには、拡散では不可能であり灌流(perfusion)つまり血流が必要となる。そのため、癌は癌細胞から血管新生物質(tumor-angiogenesis factor: TAF)を分泌し、既存の血管から血管を新生し血流を獲得することにより盛んに新陳代謝を行い、増殖・進展することができるようになる¹⁾。

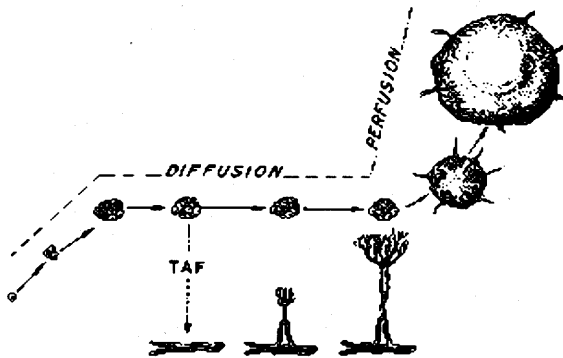


Fig.1 Schematic presentation of tumor angiogenesis. (quoted from reference 1)

近年、この腫瘍における血管新生に関与する様々なmoleculeが明らかとなってきた。Angiopoietin-1(Ang-1), Angiopoietin-2(Ang-2)は血管内皮細胞に特異

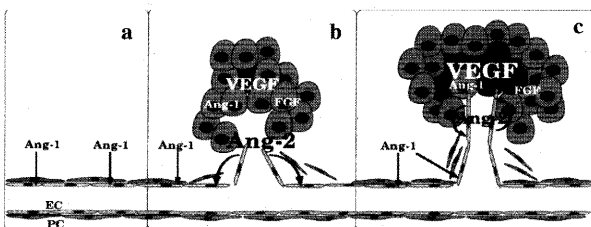


Fig.2 Hypothetical role of angiopoietin-1 (Ang-1), angiopoietin-2 (Ang-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor angiogenesis (EC: endothelial cell, PC: pericyte, FGF: fibrocyte growth factor). (quoted from reference 4)

的に存在するtyrosine kinase receptor Tie2のligandである。Ang-1がTie2に結合すると血管内皮細胞の周りにpericyteが密着して血管の安定化を来す(Fig. 2a)。逆にAng-2がTie2に結合した場合にはより血管内皮細胞からpericyteがはずれて、血管が不安定となり、vascular endothelial growth factor(VEGF)存在下では血管新生が促進され(Fig. 2bc), VEGF非存在下では血管新生が阻害されると報告されていて、Angiopoietin/Tie2 signaling-VEGF systemは腫瘍における血管新生のinitial stepであることが最近明らかとなっている²⁻⁵⁾。

本稿では筆者が行っている生化学的解析結果をもとにして上皮性卵巣癌におけるAngiopoietin/Tie2 signaling-VEGF systemの腫瘍生物学的役割について解説する。

I. 卵巣における生理的血管新生と病的血管新生でのAng-1, Ang-2およびTie2の遺伝子発現の違い

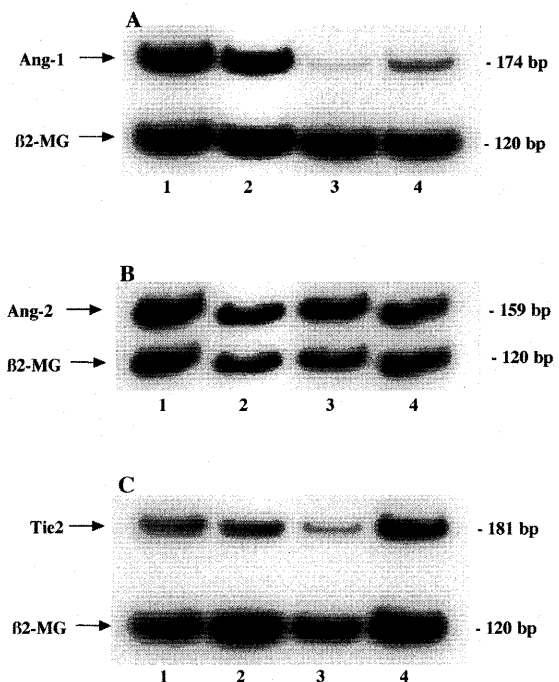


Fig. 3 The representative angiopoietin-1 (Ang-1)(A), angiopoietin-2 (Ang-2) (B), and Tie2 (C) gene expression by RT-PCR. (Lanes 1 and 2 : normal ovary with corpus luteum, Lanes 3 and 4 : ovarian cancer, β_2 -MG: β_2 -microglobulin) (quoted from reference 7)

Angiopoietin/Tie2 signaling- VEGF systemは生体内における生理的血管新生にも関与するとされている^{2,6)}。そこで、卵巣における生理的血管新生（黄体形成）と病的血管新生（上皮性卵巣癌）においてAng-1, Ang-2およびTie2の遺伝子発現に違いがあるか否かについて検討した。実際には、黄体を有する正常卵巣、卵巣癌組織を用

いてAng-1, Ang-2およびTie2のmRNA発現について β_2 -microglobulinをinner controlとするRT-PCRを行った(Fig. 3)。さらに、Ang-1, Ang-2のmRNAの産生部位、Tie2の局在に関しては *in situ* hybridization (Fig. 4)および免疫組織学的染色(Fig. 5)により評価した⁷⁾。

Ang-1mRNA発現は正常卵巣では卵巣癌に比

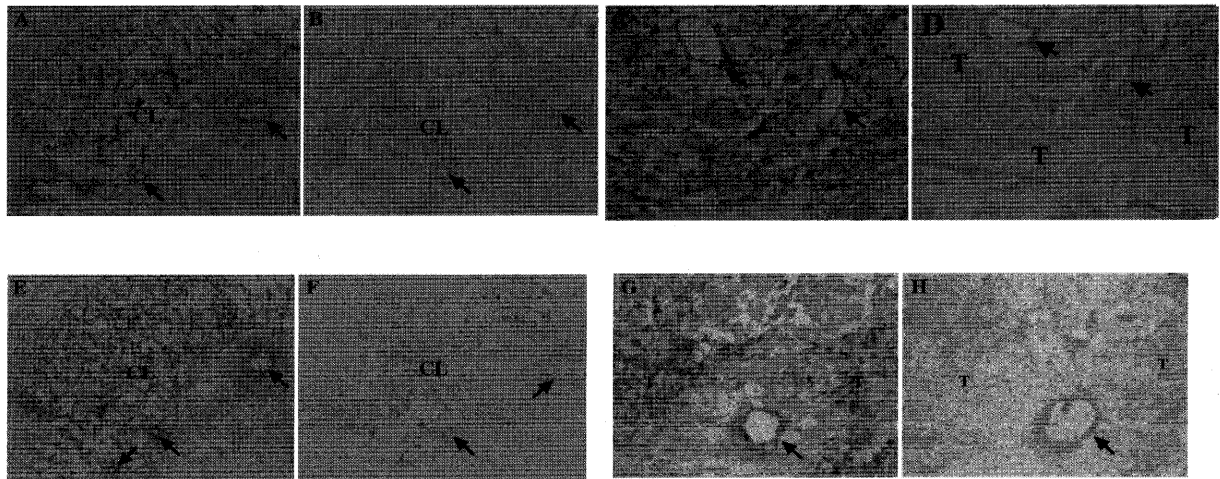


Fig.4 *In situ* hybridization analysis of angiopoietin-1 (Ang-1) and angiopoietin-2 (Ang-2) expression in a section of corpus luteum (CL) and of an ovarian cancer. Transcripts for Ang-1 were observed in corpus luteal cells and endothelial cells (arrows) around CL (A, original x 100), and in tumor (T) cells and endothelial cells (arrows) at the periphery of tumor (T) invasion (C, original x 400). Ang-2 transcripts were expressed in the same patterns (E, original x 100: in a section of CL, and G, original x 400: in a section of a ovarian cancer). (B, original x 100 and D, original x 400: Ang-1 sense-control hybridization, F, original x 100 and H, original x 400: Ang-2 sense-control hybridization). (quoted from reference 7)

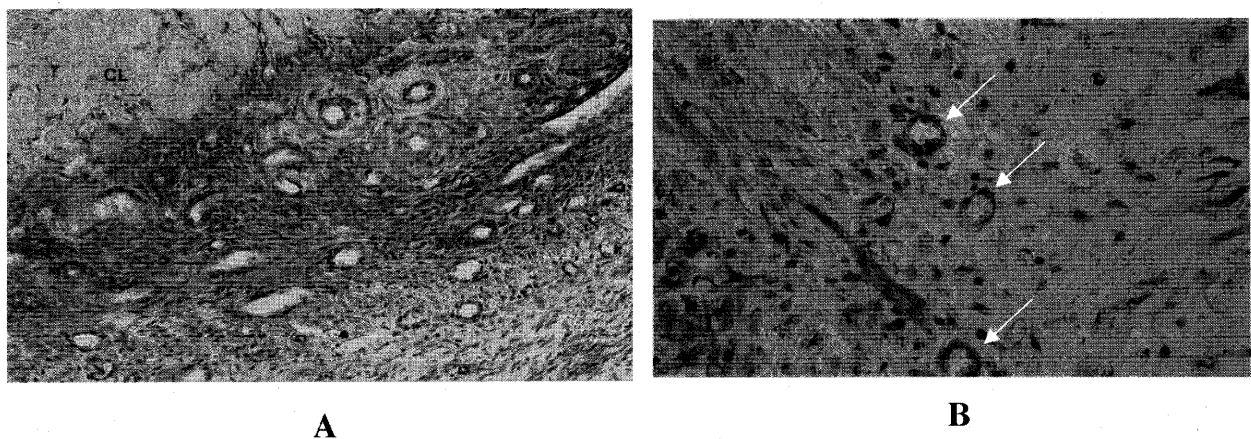


Fig.5 Immunohistochemical staining for Tie2 in a section of an corpus luteum (CL) (A) (original x 50) and of a ovarian cancer (B) (original x 100). Arrows indicate endothelial cells at the periphery of tumor (T) invasion. (quoted from reference 7)

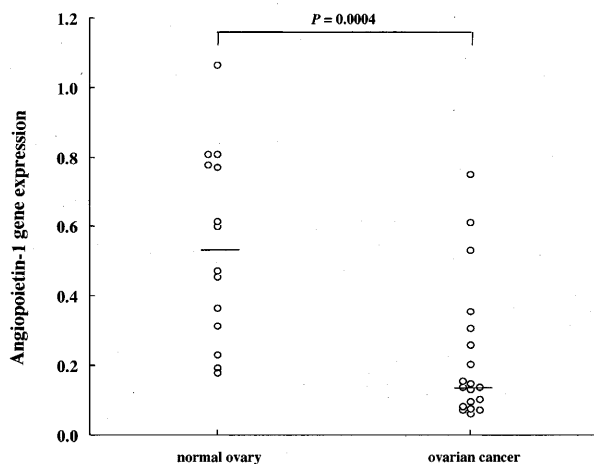


Fig.6 Angiopoietin-1 gene expression in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer. Horizontal line indicates the median value. (quoted from reference 7)

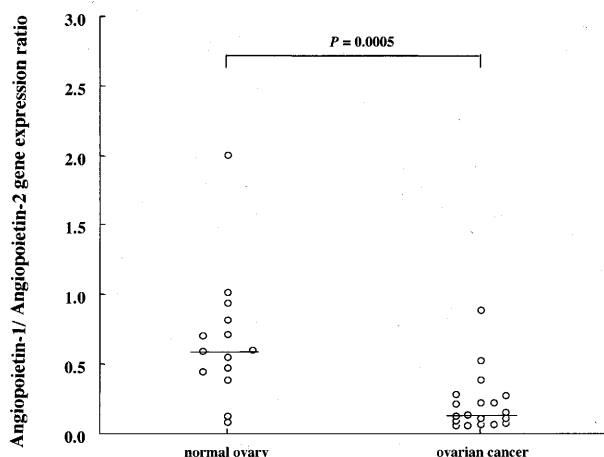


Fig.7 Angiopoietin-1/angiopoietin-2 gene expression ratio in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer. Horizontal line indicates the median value. (quoted from reference 7)

較して有意に高かったが(Fig. 6), Ang-2および Tie2mRNA発現にはそのような傾向は認められなかった。また, Ang-1mRNA/Ang-2mRNA ratioは卵巣癌が正常卵巣に比べて有意に低かった(Fig. 7)。さらに, 正常卵巣においてAng-1mRNA発現とTie2mRNA発現との間に有意な正の相関が示された(Fig. 8)が, 卵巣癌においては認められなかった。一方, 正常卵巣および卵巣癌ともにAng-2mRNA発現とTie2mRNA発現との間に有意な相関関係は認められなかった。

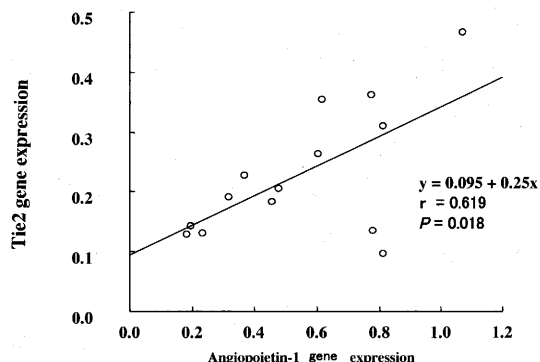


Fig.8 Correlation between angiopoietin-1 gene expression and Tie2 gene expression in normal ovary with corpus luteum. (quoted from reference 7)

Ang-1, Ang-2ともに黄体細胞, 黄体周囲の血管内皮細胞, 卵巣癌細胞, 腫瘍組織の間質に存在する血管内皮細胞で産生されていることが判明した(Fig. 4)。Tie2は黄体周囲の血管内皮細胞, 腫瘍組織の間質に存在する血管内皮細胞に局在することが明らかとなった(Fig. 5)。

以上より, 正常卵巣及び卵巣癌において, Ang-1, Ang-2は, 血管内皮細胞に存在するそのreceptorであるTie2にparacrine, autocrineに作用することが考えられる。また, 卵巣での黄体形成時の生理的血管新生ではAng-1の作用によりpericyteに裏打ちされた安定した血管が産生され, 上皮性卵巣癌の際の病的血管新生ではAng-2のAng-1に対する高発現のため, pericyte のはずれた不安定で未熟な血管が増殖すると推察された。

II. Paclitaxel (Taxol)のAngiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemへの薬理学的作用

Taxolは近年, 上皮性卵巣癌に対して最も有効的であるとされている抗癌剤の一つである^{8,9)}。その一方で, 基礎的研究においてTaxolは血管新生抑制作用を有することが明らかとなってきた¹⁰⁻¹²⁾。この血管新生抑制作用のメカニズムに関しては様々な報告があるが, TaxolのAngiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemへ及ぼす影響は明らかでない。そこで, 上皮性卵巣癌細胞株KF(菊池義公防衛医科大学校産婦人科前教授よりご提供)に対するTaxol接触がAng-1, Ang-2, VEGF発現に如何に影響するか

について検討した¹³⁾.

KFに2nM(IC₅₀; 4.65 ± 0.35 nMの約40%) Taxolを接触させたところ, 接触168h後で quantitative real-time RT-PCR (ABI PRISM 7000 sequence detection systemを用いた, GAPDHをinner controlとするmultiplex法) により評価したAng-1mRNA発現はcontrolに比較して有意に低下し(Fig. 9a), Western blotにおいても同様な結果であった(Fig 9b). Ang-2

発現についてはreal-time RT-PCR, Western blotともTaxol接触24-168h後で有意な変化は認められなかった. また, Taxol接触168h後において, Ang-1mRNA/Ang-2mRNA ratioはcontrolに比較して有意に低下した(Fig. 10). さらに, Taxol接触168h後において, VEGFmRNA発現はcontrolに比較して有意に低下し(Fig. 11a), ELISA(Quantikine Human VEGF Immunoassay; R & D Systems, Minneapolis,

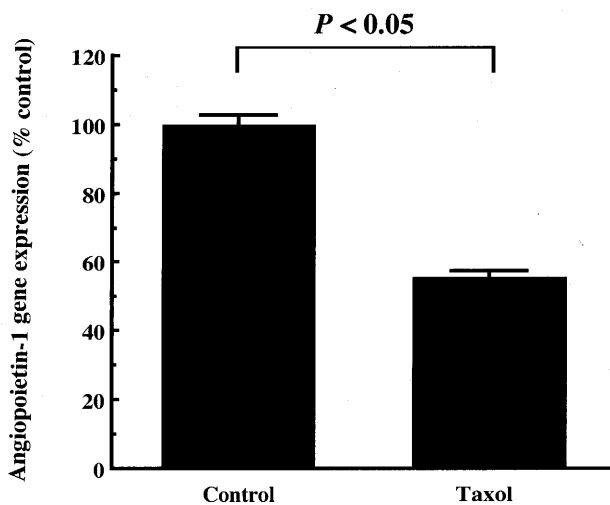


Fig.9a Angiopoietin-1 gene expression by quantitative real-time RT-PCR at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control. Values are expressed as means + SE (bars) (n=3). (quoted from reference 13)

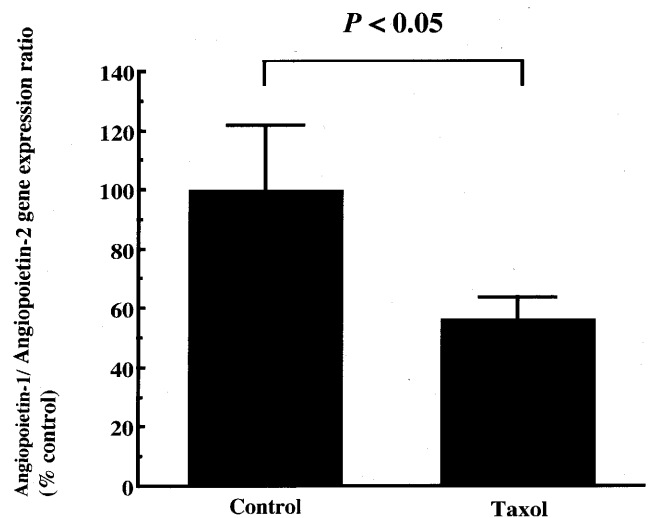


Fig.10 Angiopoietin-1/angiopoietin-2 gene expression ratio by quantitative real-time RT-PCR at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control. Values are expressed as means + SE (bars) (n=3). (quoted from reference 13)

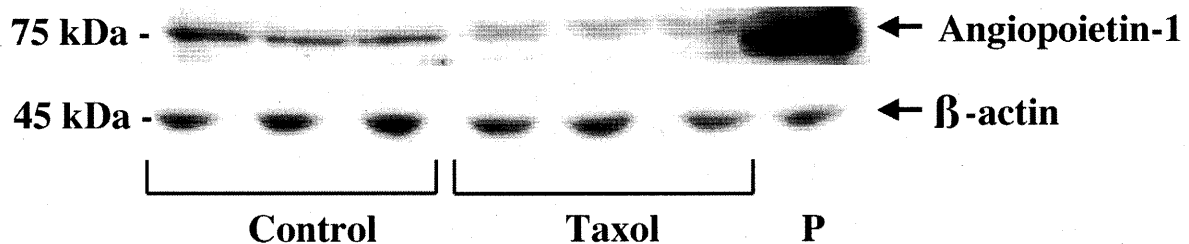


Fig.9b Western blot analysis for the expression of angiopoietin-1 at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control (P; human placenta at 38-week gestation). (quoted from reference 13)

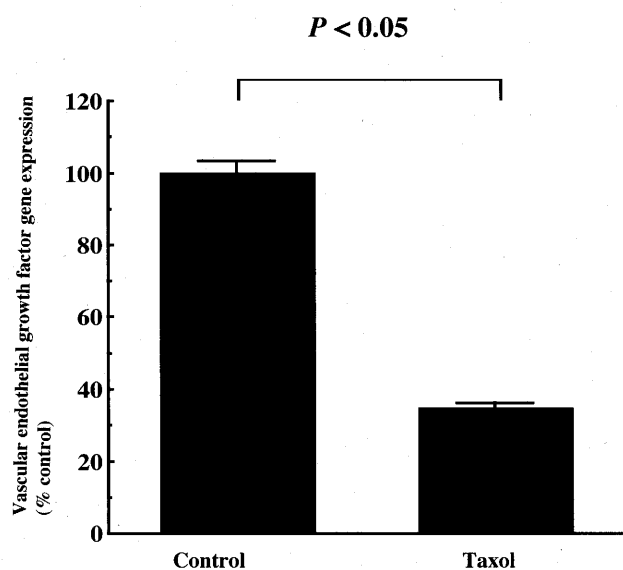


Fig.11a Vascular endothelial growth factor gene expression by quantitative real-time RT-PCR at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control. Values are expressed as means + SE (bars) (n=3). (quoted from reference 13)

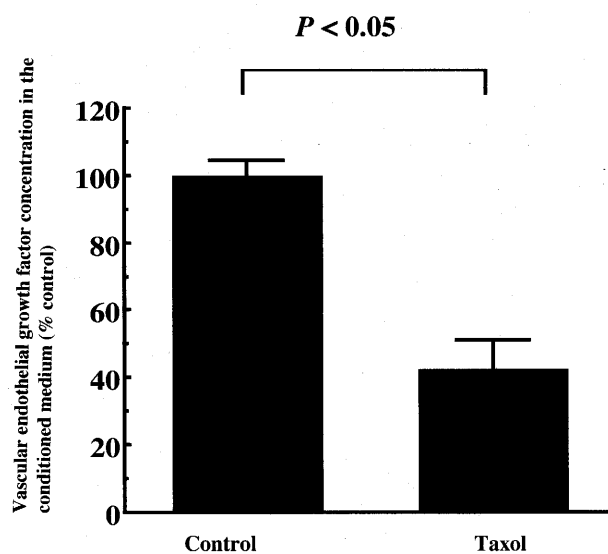
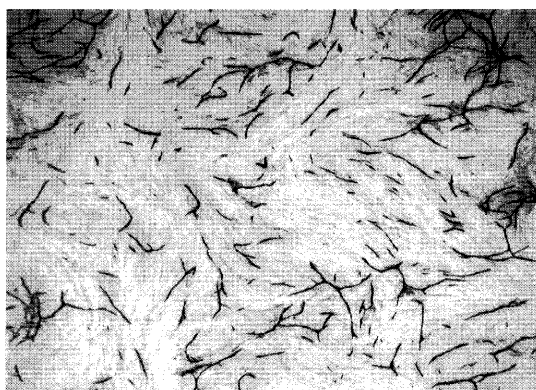


Fig.11b Vascular endothelial growth factor concentration in the conditioned medium at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control. Values are expressed as means + SE (bars) (n=3). (quoted from reference 13)



Control



Taxol

Fig.12a Representative photographs of tubule formation of conditioned medium at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control (magnification x 20). (quoted from reference 13)

MN)により測定した培養液中のVEGF濃度も有意に低下した(Fig. 11b). 一方, MTT assayで評価したcell growth rateはTaxol接触24-168h後で有意な変化は認められなかった. そこで, Taxol接触168h後の細胞培養液を用いて, *in vitro* angiogenesis assay kit (KZ-1000; KURABO, Osaka, Japan)により血管新生に及ぼす影響を検討した. その結果, Taxol接触168h後の細胞培養液はcontrolに比較して明らかに血管新生を抑制することが判明した(Fig. 12).

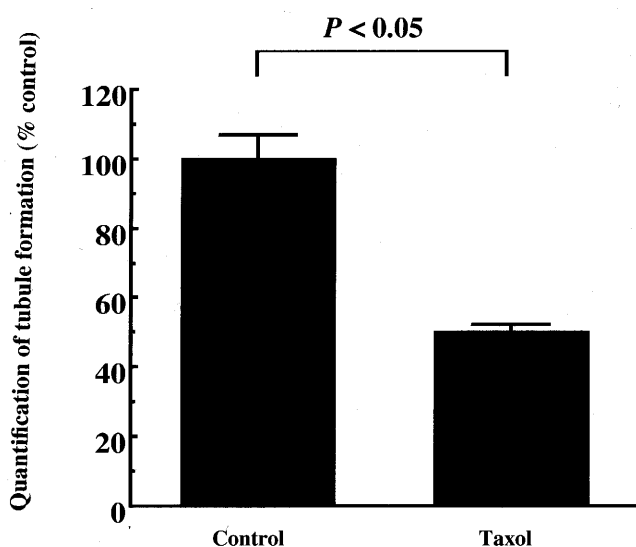


Fig.12b Quantification of tubule formation of conditioned medium at 168 h Taxol exposure (Taxol) compared to control. Values are expressed as means + SE (bars) (n=3). (quoted from reference 13)

この *in vitro* の検討から, 上皮性卵巢癌細胞株への低濃度Taxol接触はAng-1に対するAng-2の高発現, さらにVEGFの低発現をもたらすことにより, 血管新生を抑制することが示された. よって, 上皮性卵巢癌におけるTaxolによるantivascular therapyの可能性が示唆された.

III. Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemと上皮性卵巢癌の予後との関連

現在, 様々なmoleculeの遺伝子発現と上皮性卵巢癌の予後の関連が報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾が, 血管新生のinitial phaseに関与するとされている

Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemとその予後に関する報告は認められない. そこで, Ang-1, Ang-2, Tie2, VEGFのmRNA発現をquantitative real-time RT-PCRを行い測定し, さらに, 抗factor VIIIモノクローナル抗体を用いた免疫染色により腫瘍内の血管新生を評価して, その所見と上皮性卵巢癌の予後との関連について検討した¹⁸⁾. なお血管新生は200倍視野当たりの微小血管数(microvessel density; MVD)により算出した.

Ang-1mRNA/Ang-2mRNARatio, VEGFmRNA, Tie2mRNA発現それぞれの中央値をcutoffとして2つの群に分けた場合に, Ang-1mRNA/Ang-2mRNARatioが低く, Tie2mRNA, VEGFmRNAがともに高い症例は他の症例より有意にMVDが高値であった. 予後追跡期間は2-120カ月(median; 24カ月)で, univariate Cox regression analysisでは累積生存率はAng-1mRNA/Ang-2mRNARatioが低い群が高い群に比較して有意に低かった(Fig. 13, Table 1). また, Ang-1mRNA/Ang-2mRNARatioが低く, VEGFmRNA発現が高い群が他の群に比較して有意に予後が悪かった

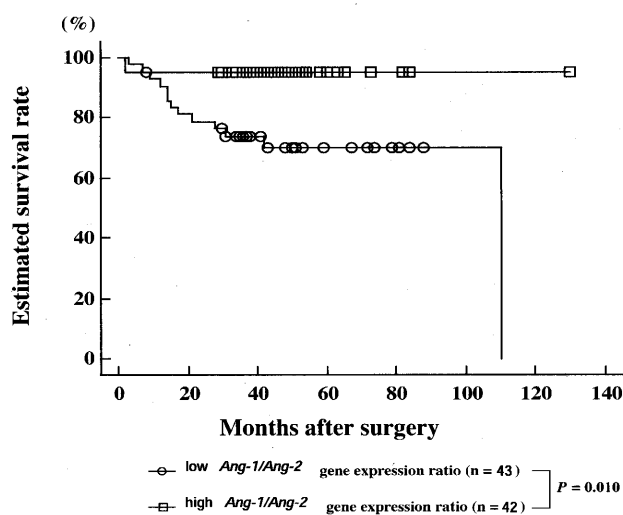


Fig.13 Comparison of survival between groups with low angiopoietin-1 (Ang-1) / angiopoietin-2 (Ang-2) gene expression ratio and groups with high Ang-1 / Ang-2 gene expression ratio according to univariate Cox regression analysis. (quoted from reference 18)

(Table 1). 臨床進行期, 初回手術時の残存腫瘍の有無, 組織学的分化度が有意に予後に影響したが, MVDは有意に予後に影響しなかった(Table 1). multivariate Cox regression analysisでは,

Table 1

The results of univariate Cox regression analysis
(quoted from reference 18)

Variables	Hazard ratio	95% confidence interval	P value
Age at the time of diagnosis			
≤ 50 (n = 36)	referent		
> 50 (n = 49)	2.16	0.69 - 6.79	0.187
FIGO stage			
I - II (n = 40)	referent		
III - IV (n = 45)	12.91	1.69 - 98.77	0.014
Residual disease			
negative (n = 64)	referent		
positive (n = 21)	2.90	1.04 - 8.11	0.042
Histological subtype			
others (n = 47)	referent		
serous (n = 38)	0.62	0.21 - 1.84	0.388
Histological grade			
others (n = 63)	referent		
poorly (n = 22)	3.24	1.14 - 9.25	0.028
Microvessel density			
low (n = 43)	referent		
high (n = 42)	2.04	0.68 - 6.09	0.203
Ang-1/Ang-2 gene expression ratio			
high (n = 42)	referent		
low (n = 43)	7.04	1.59 - 31.21	0.010
VEGF gene expression			
low (n = 42)	referent		
high (n = 43)	2.60	0.82 - 8.30	0.106
Tie2 gene expression			
low (n = 42)	referent		
high (n = 43)	0.46	0.16 - 1.34	0.458
Combination of Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and VEGF gene expression			
others (n = 59)	referent		
low Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and high VEGF gene expression (n = 26)	3.47	1.23 - 9.79	0.019
Combination of Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and VEGF gene expression and Tie2 gene expression			
others (n = 66)	referent		
low Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and high VEGF gene expression and high Tie2 gene expression (n = 19)	1.14	0.36 - 3.65	0.820

Ang-1: Angiopoietin-1, Ang-2: Angiopoietin-2, VEGF: vascular endothelial growth factor

Table 2

The results of multivariate Cox regression analysis
(quoted from reference 18)

Variables	Hazard ratio	95% confidence interval	P value
FIGO stage			
I - II (n = 40)	referent		
III - IV (n = 45)	9.62	1.17 - 79.16	0.035
Histological grade			
others (n = 63)	referent		
poorly (n = 22)	2.22	0.74 - 6.70	0.155
Residual disease			
negative (n = 64)	referent		
positive (n = 21)	2.16	0.72 - 6.54	0.172
Ang-1/Ang-2 gene expression ratio			
high (n = 42)	referent		
low (n = 43)	5.2	0.93 - 29.04	0.061
Combination of Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and VEGF gene expression			
others (n = 59)	referent		
low Ang-1/Ang-2 gene expression ratio and high VEGF gene expression (n = 26)	2.02	0.60 - 6.81	0.258

Ang-1: Angiopoietin-1, Ang-2: Angiopoietin-2, VEGF: vascular endothelial growth factor

臨床進行期のみが独立した予後因子で, Ang-1mRNA/ Ang-2mRNAratioは独立した予後因子である傾向が認められた(Table 2).

したがって, 上皮性卵巣癌においても Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemは血管新生に関与することが明らかとなった. しかしながら, このsystemは血管新生を介さない, まだ明らかとなっていない別のシグナル伝達経路を介して上皮性卵巣癌の予後に影響するものと考えられる.

IV. 今後の展望

上皮性卵巣癌におけるAng-2のAng-1に対する高発現, Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemの血管新生への関与が明らかとなった. さらに, *in vitro*でのTaxolのAngiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemを介する血管新生阻害作用も判明した. その一方で, Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemの血管新生とは別のシグナル伝達経路を介する上皮性卵巣癌の予後への関与が示された. いずれにしても, Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemを標的とした治療が上皮性卵巣癌に対する新たな分子標的治療として有効ではないかと考えられる.

おわりに

Angiopoietin/Tie2 signaling - VEGF systemの分子生物学的解析をもとにした, 上皮性卵巣癌の病態解析について紹介した. 今後, 更なる基礎的・臨床的検討が行われ, 個々の上皮性卵巣癌で生じている生物学的変化が客観的に評価されることにより, 個々の症例に適した治療法が開発されることを期待する.

(本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金(基盤研究C) (課題番号: 15591747) によって行われた.)

文 献

- 1) Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 285: 1182-1186.
- 2) Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S,

- Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60.
- 3) Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD (1998) Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282: 468-471.
- 4) Lauren J, Gunji Y, Alitalo K (1998) Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 153: 1333-1339.
- 5) Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC (1999) Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 79: 213-223.
- 6) Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG (1998) Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 78: 1385-1394.
- 7) Hata K, Udagawa J, Fujiwaki R, Nakayama K, Otani H, Miyazaki K (2002) Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie2 genes in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer. *Oncology* 62: 340-348.
- 8) Neijt JP (1995) Optimum chemotherapy regimen, dose intensity, and new drugs. "Epithelial cancer of the ovary" (ed. By Lawton FG, Neijt JP, Swenerton KD), BMJ Publishing Group, London, p186-208.
- 9) McGuire WP, Ozols RF (1998) Chemotherapy of advanced ovarian cancer. *Semin Oncol* 25: 340-348.
- 10) Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Tarabozetti G (1996) The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2: 1843-1849.
- 11) Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and Taxol. *Cancer Res* 57: 81-86.
- 12) Dordunoo SK, Jackson JK, Arsenault LA, Oktaba AM, Hunter WL, Burt HM (1995) Taxol encapsulation in poly (epsilon-caprolactone) microspheres. *Cancer Chemother Pharmacol* 36: 279-282.
- 13) Hata K, Osaki M, Dhar DK, Nakayama K, Fujiwaki R, Ito H, Nagasue N, Miyazaki K (2004) Evaluation of the antiangiogenic effect of Taxol in a human epithelial ovarian carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 68-74.
- 14) Hata K, Kamikawa S, Arao S, Tashiro H, Katabuchi H, Okamura H, Fujiwaki R, Miyazaki K, Fukumoto M (1999) Expression of the thymidine phosphorylase gene in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 79: 1848-1854.
- 15) Hata K, Takebayashi Y, Akiba S, Fujiwaki R, Iida K, Nakayama K, Nakayama S, Fukumoto M, Miyazaki K (2000) Expression of the adrenomedullin gene in epithelial ovarian cancer. *Mol Hum Reprod* 6: 867-872.
- 16) Fujiwaki R, Hata K, Nakayama K, Fukumoto M, Miyazaki K (2000) Gene expression for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase influences outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 18: 3946-3951.
- 17) Hata K, Fujiwaki R, Nakayama K, Miyazaki K (2001) Expression of the endostatin gene in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7: 2405-2409.
- 18) Hata K, Nakayama K, Fujiwaki R, Katabuchi H, Okamura H, Miyazaki K (2004) Expression of the angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 93: 215-222.

受付日 2005年8月8日