



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Human Colorectal Cancer Infrastructure Constructed by the Glycocalyx( 内容と審査の要旨(Summary) )
Author(s)	館, 正仁
Report No.(Doctoral Degree)	博士(医学) 医博甲第1125号
Issue Date	2020-03-25
Type	博士論文
Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/79319">http://hdl.handle.net/20.500.12099/79319</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	館 正 仁	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1125 号	
学位授与日付	令和 2 年 3 月 25 日	
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Human Colorectal Cancer Infrastructure Constructed by the Glycocalyx	
審査委員	（主査）教授	清水 雅仁
	（副査）教授	山口 瞬 教授 國貞 隆弘

### 論文内容の要旨

固形腫瘍が増大するには、癌細胞増殖のための血流システムが不可欠である。癌組織においてその栄養や血流を維持する構造として、癌細胞が Vascular Endothelial Growth Factor（血管内皮増殖因子）を放出し血管を新たに伸長させ血管構築を促進する「血管新生（Angiogenesis）」や、血管内皮細胞で覆われた血管が無くとも癌細胞自身が血管様の構造を呈することで血流を維持する「血管擬態（Vasculogenic Mimicry）」が考えられている。しかし、前者については Angiogenesis を抑制する抗 VEGF 阻害剤が期待されたほど効果を示しておらず、後者については *in vitro* の検討に基づくものであり、ヒト癌組織における Vasculogenic Mimicry の具体的な形態や、Vasculogenic Mimicry と既存血管との関係性は未だ明らかではない。つまり、固形腫瘍が増大する際の供給路に関しては十分に解明されていない。

近年、グリコカリックス（Glycocalyx）が血管内皮の保護や調節において、重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで我々は、癌組織の脈管形成にグリコカリックスが関わっているのではないかと仮説をたて、ヒト大腸癌組織および *Apc* 遺伝子変異大腸癌発生マウス（*Apc*<sup>Min/+</sup> マウス）の大腸癌組織におけるグリコカリックスの形態を硝酸ランタンによる電子染色で視覚化し、電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。

#### 【対象と方法】

岐阜大学医学部附属病院にて切除されたヒト大腸癌手術材料（5 検体）より、新鮮大腸癌組織および周囲正常組織を採取した。新鮮凍結固定、ホルマリン固定、グルタル固定を行い、硝酸ランタンによる電子染色下で走査型（Scanning Electron Microscope : SEM）ならびに透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope : TEM）を用いてグリコカリックスの形態を視覚化し、大腸癌の構造を観察した。また、30 週齢の *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの大腸癌組織に関しても同様の手法を用いて検討した。

#### 【結果】

はじめに、ヒト大腸癌において Vasculogenic Mimicry が存在するかどうかについて検証を行った。Vasculogenic Mimicry の定義とされる PAS 染色陽性、CD31 免疫染色陰性の構造物は、ヒト大腸癌においてほとんど確認されなかった。

硝酸ランタンによる電子染色をおこない SEM と TEM を用いて大腸癌のグリコカリックスを描出したところ、大腸癌の毛細血管の血管内皮細胞間に赤血球が通過できないほど小さな孔（径 1~2  $\mu\text{m}$  未満）が開いており癌細胞間隙に通じていた。癌細胞間隙は正常組織間隙より広く、また前者にはグリコカリックスで構成された網目状のトンネル構造が観察された。間隙の変化に関しては固定法によるアーチファクトも考えられたため新鮮凍結法、ホルマリン法でも検討したが、いずれの固定法でも正常組織と比較して癌組織の間隙が広いことが確認できた。細胞接着分子である E-cadherin は、正常組織

より癌組織において発現が低下しており、癌組織の間隙を広くしている機序の一つと考えられた。

次に SEM を用いて反跳電子の検出を行ったところ、網目構造に一致して反跳電子が認められた。硝酸ランタンで染色されたグリコカリックスは高エネルギー分子となり、反跳電子として観察されることより、網目構造はグリコカリックスによって構築されていると考えられた。また、糖と結合する種々のレクチンを用いて染色を行ったところ、癌細胞間隙は UEA-I（正常組織では内皮細胞特異的に結合するレクチン）や VVL（癌細胞に結合するレクチン）によって染まり、癌組織内の細胞間隙には内皮細胞的性質をもつグリコカリックスが存在することが示された。

以上より、大腸癌細胞は豊富なグリコカリックスからなる網目構造を有していることが、形態的にも構成成分からも確認できた。この構造は、癌細胞が生存するために絶えず栄養や伝達物質を受け渡すことを可能とする、癌細胞・組織にとって極めて合理的な形態であると考えられた。我々は、この新たに発見した形態を「Cancer Infrastructure（癌のインフラ）」と名付けた。

また、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスの大腸癌組織において同様の検討を行ったところ、同腫瘍においても癌細胞間隙は広く、網目状に広がったグリコカリックスが観察された。つまり、同マウスにおける大腸癌でもヒトの大腸癌組織と同様の「Cancer Infrastructure」が存在しており、本構造は種を越えて存在する構造である可能性が示唆された。

#### 【考察】

ヒト大腸癌組織は、グリコカリックスによりインフラを構築することで効率的に栄養を取り入れ、自身の増殖を促進している可能性がある。また、この構造によって免疫細胞による抗腫瘍免疫作用が低下する可能性や、腫瘍組織へのドラッグデリバリーが修飾される可能性が考えられる。したがって、我々が本研究で明らかにした「Cancer Infrastructure」は、薬剤や各種治療に対する抵抗性獲得に深く関与している可能性がある。これらの可能性を明らかにするためには、各臓器や各組織・微小環境に存在する様々な異なるグリコカリックスで構築された「Cancer Infrastructure」を明らかにし、抗がん剤等のドラッグデリバリーシステムを中心に研究を進める必要がある。特に *Apc* 変異マウスは、グリコカリックスで覆われた「Cancer Infrastructure」の研究を進めるための前臨床モデルとして有用であるため、同モデルを用いた基礎実験や臨床検体に関する詳細な検討は、癌組織内インフラの構造的・機能的メカニズムの解明、さらには同構造を標的とする薬物療法の開発に繋がる可能性がある。

#### 【結論】

大腸癌は増殖のために、グリコカリックスにより“インフラ”を形成・構築している可能性がある。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 館 正仁は、ヒト大腸癌および *Apc* 変異マウスの大腸癌組織におけるグリコカリックスの形態を、硝酸ランタンによる電子染色下で電子顕微鏡を用いて詳細に観察し、癌細胞間隙にグリコカリックスで構築された網目構造（「Cancer Infrastructure」）が存在することを世界で初めて明らかにした。本研究結果は、癌の微小環境・脈管形成に関する研究に対し新たな概念を提唱するものであり、腫瘍学の発展・進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

#### 【主論文公表誌】

Masahito Tachi, Hideshi Okada, Nobuhisa Matsushashi, Genzou Takemura, Kodai Suzuki, Hirotsugu Fukuda, Ayumi Niwa, Takuji Tanaka, Hideki Mori, Akira Hara, Kazuhiro Yoshida, Shinji Ogura and Hiroyuki Tomita: Human Colorectal Cancer Infrastructure Constructed by the Glycocalyx

Journal of Clinical Medicine 1270, doi:10.3390/jcm8091270 (2019)