
Et kollagen XVIII-fragment hemmer angiogenese

KLINIKK OG FORSKNING

ULF K. ZÄTTERSTRÖM

NAOMI FUKAI

BJØRN R. OLSEN

Email: bolsen@hms.harvard.edu

Harvard Medical School

240 Longwood Ave

Boston

MA 02115

USA

Det faktum at mange tumorer kan stimulere til angiogenese og dermed vokse raskt og aggressivt, har ført til en intens jakt på substanser med potensiell innvirkning på nydanning av blodkar. Muligheten for å forhindre tumorvekst ved å hemme blodforsyningen er et tiltalende behandlingsalternativ, spesielt i kombinasjon med konvensjonell terapi. Etter mange år med forskning rundt dette konseptet ble det nylig isolert en meget potent endogen angiogenesehemmer som vakte stor oppsikt i internasjonal presse. Dette midlet, endostatin, er et fragment av kollagen XVIII, et proteoglykan/kollagen som inngår i oppbygningen av basalmembraner. Endostatin ble opprinnelig funnet i et cellekulturmedium av hemangioendoteliumceller. Substansen hemmer migrasjon av endotelceller in vitro og synes å være meget effektiv i in vivo-studier med musetumorer. Man har funnet at fysiologisk vevsproduksjon av endostatin katalyseres av proteolytiske enzymer, spesielt kathepsin L og matriksmetalloproteaser (MMP). Disse enzymene produseres av aktiviserte endotelceller, og systemet synes å fungere som en lokal negativ kontrollmekanisme for regulering av angiogenese. Store forhåpninger er nå knyttet til at midlet skal vise seg å være effektivt som adjuvant behandling av pasienter med malign sykdom.

Utvikling av blodkar skjer på to prinsipielt forskjellige måter, kalt vaskulogenese og angiogenese (fig 1, fig 2). Vaskulogenese er en embryonal prosess med nydanning av blodkar og etablering av et blodomløp fra primitive endotelceller, angioblaster. Med angiogenese mener man derimot tilvekst av nye blodkar via stimulering av endotelceller fra allerede eksisterende blodkar. Ved angiogenese dannes nye kapillære rør i en flertrinnsprosess som begynner med proteolytisk degradering av basalmembraner, fulgt av en vandring av endotelceller inn i omkringliggende bindevev, hvor de prolifererer og danner nye rør.

Når en tumor vokser, induseres angiogenese. Hvis det ikke skjer nydanning av blodkar, kan en tumor ikke vokse mer enn noen få kubikkmillimeter, da diffusjon av næringsstoffer og avfallsprodukter blir begrensende faktorer. Det ble allerede i 1960-årene demonstrert at nydanning av blodkar i tumorer stimuleres av vekstfaktorer som kan måles i serum. Disse vekstfaktorene produseres både av tumorceller og av celler i omkringliggende vev (1).

Nydanning av blodkar er avgjørende for primærtumors tilvekst, men dette er også en viktig faktor i metastaseringsprosessen. Sammenliknet med normale karsystemer har en malign tumor umodne kar med tynne basalmembraner og få intercellulære forbindelser (2, 3). En tumor med høy grad av vaskularisering har derfor teoretisk lettere for å spre seg metastatisk enn en som inneholder færre blodkar, noe som gjelder for blant annet malignt melanom, brystkreft og prostatakreft (2, 3).

Stimulering og hemming av angiogenese

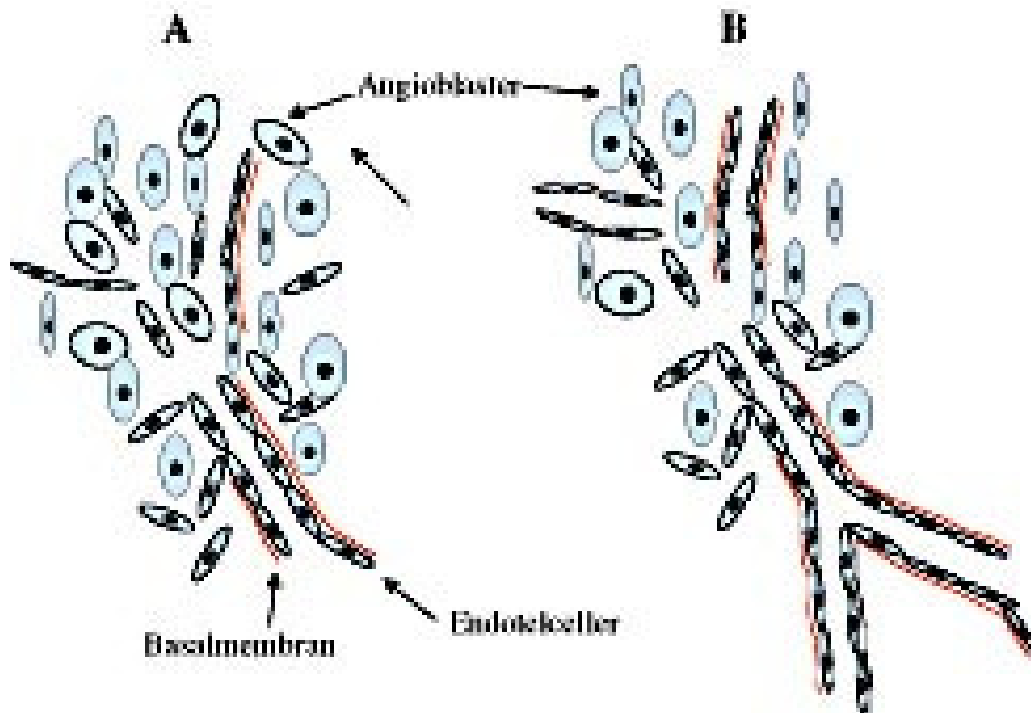
Siden begynnelsen av 1970-årene er flere substanser med angiogenesestimulerende effekt blitt identifisert. Den første av disse angiogene vekstfaktorer som ble skikkelig karakterisert med hensyn til virkningsmekanisme, var basisk fibroblastvekstfaktor (basic fibroblast growth factor) (FGF-2) (4, 5). Et stort antall andre faktorer er senere blitt beskrevet, hvorav FGF-1, FGF-2 og vaskulær endotelvekstfaktor (vascular endothelial growth factor) (VEGF) (6) er de som er vanligst forekommende i normalt vev. Disse faktorene produseres av tumorceller og omkringliggende vev og virker stimulerende på endotelceller gjennom tyrosinkinasereseptorer som er koblet til intracellulære signalsystemer.

Det er en anerkjent klinisk observasjon at kirurgisk fjerning av en primærtumor noen ganger fører til rask vekst av tidligere okkulte metastaser. En foreslått forklaring på dette fenomenet er at den større primærtumoren undertrykker mikrometastaser ved selv å produsere angiogenesehemmere. Veksthastigheten av en tumor kan derfor være resultatet av kombinasjonen av positive og negative angiogene faktorer. Straks primærtumoren er fjernet, forsvinner hemmingen og mikrometastaser begynner å vokse (7). I 1994 ble denne teorien bekreftet da O'Reilly og medarbeidere oppdaget angiogenesehemmeren angiostatin i urin hos mus med en lite metastaserende variant av Lewis' lungekarsinom (8). Angiostatin, som viste seg å være et proteolytisk produkt fra nedbrytning av plasminogen, virket sterkt hemmende på metastasering gjennom å forhindre angiogenese.

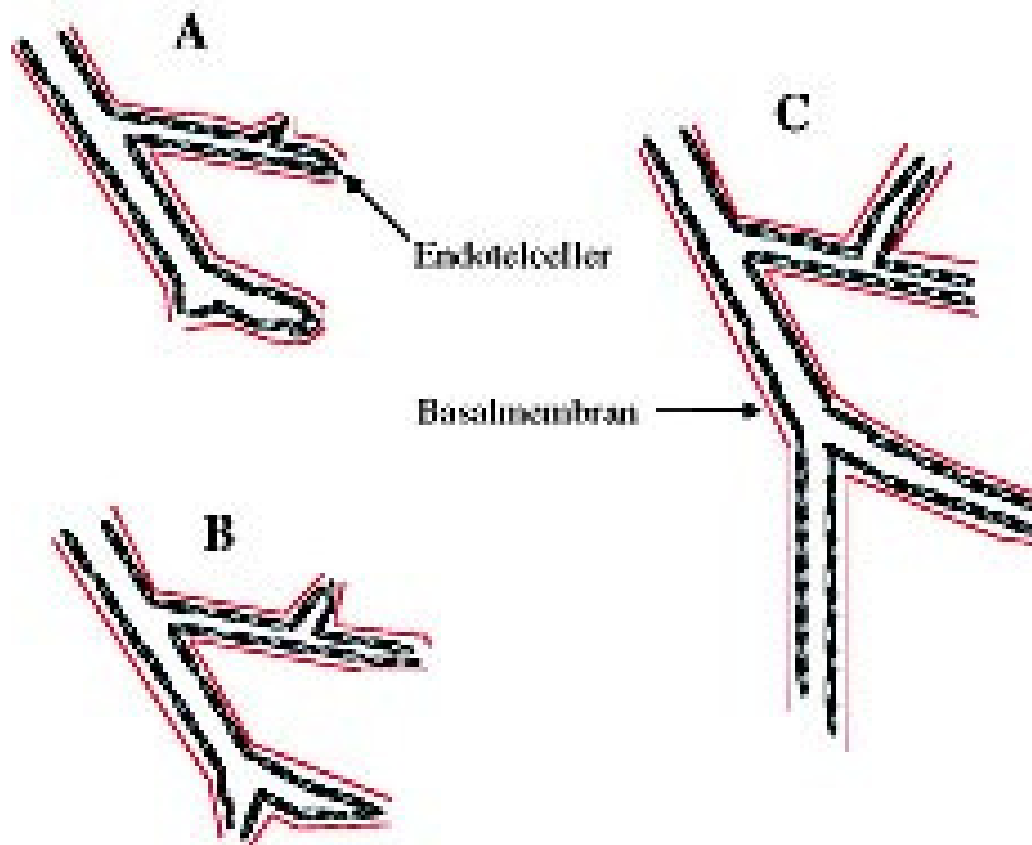
Kollagen XVIII/endostatin

Da det noen år etter beskrivelsen av angiostatin ble oppdaget ytterligere en endogen angiogenesehemmer, vakte dette meget stor oppsikt i mediene. Denne nye substansen ble isolert fra supernatanten av en cellekultur fra en ikke-metastaserende musetumor, hemangioendoteliom (EOMA). Supernatanten forhindret utvekst av metastaser i mus gjennom å hemme proliferasjonen av endotelceller. Den aktive substansen viste seg å være et proteinfragment på 22 kDa og ble kalt endostatin (9).

Rensing og partiell aminosyresekvensbestemming av endostatin har bekreftet at endostatin er et fragment av kollagen XVIII, en spesiell type kollagen som er rikelig representert i basalmembraner (fig 3). Kollagen XVIII tilhører en familie som har fått navnet multipleksiner (*multiple triple-heli x domains with in terruptions*) (10, 11) (fig 4). Mens de fleste andre kollagener er rigide og uelastiske med kun én sentral trippelheliksregion, tillater bruddene i heliksstrukturen i multipleksinene en fleksibilitet mellom heliksområdene. Det er blitt påvist (12) at kollagen XVIII er et proteoglykan med sidekjerder av heparansulfat.



Figur 1 Skjematisk fremstilling av utvikling ved vaskulogenese. A: tidlig stadium. B: senere stadium



Figur 2 Skjematisk fremstilling av utvikling ved angiogenese. A: tidlig stadium. B og C: senere stadium



Figur 3 Immunohistokjemisk fremstilling av distribusjonen av endostatin i vev fra museembryo. Snitt med oesophagus – 1, aorta – 2, atrium – 3, thymus – 4 og trachea – 5

Hva er det strukturelle grunnlaget for endostatinets

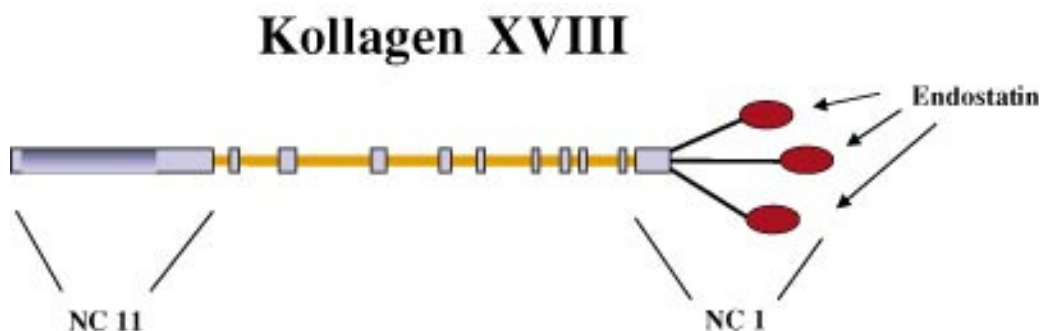
aktivitet?

Som de fleste andre substanser med hemmende effekt på angiogenese har endostatin sterk affinitet til heparin. Fenomenet, som ikke har noe med antikoagulasjon å gjøre, er av interesse, da det har vist seg at heparin kan forhindre metastasering ved eksperimentelle studier *in vivo*. Strukturanalyse av den 38 kDa C-terminale NC1-delen av kollagen XVIII viser at den består av tre segmenter: en 5 kDa N-terminal trimeriseringsdel, en sentral proteasefølsom del og den C-terminale 22 kDa-endostatinindelen (fig 4).

Strukturanalyse av endostatinfragmentet med røntgenkrystallografi viser at endostatinet er et kompakt molekyl (13). Den heparinbindende delen utgjøres av et stort basisk område med argininmolekyler. Det er mest sannsynlig at endostatin hemmer angiogenese både gjennom heparinavhengige mekanismer og uavhengig av heparinbinding. Ved pikomolare konsentrasjoner spiller heparinbinding ingen rolle, ved høyere konsentrasjoner, nano- og mikromolare, kan antakeligvis heparinbinding være avgjørende.

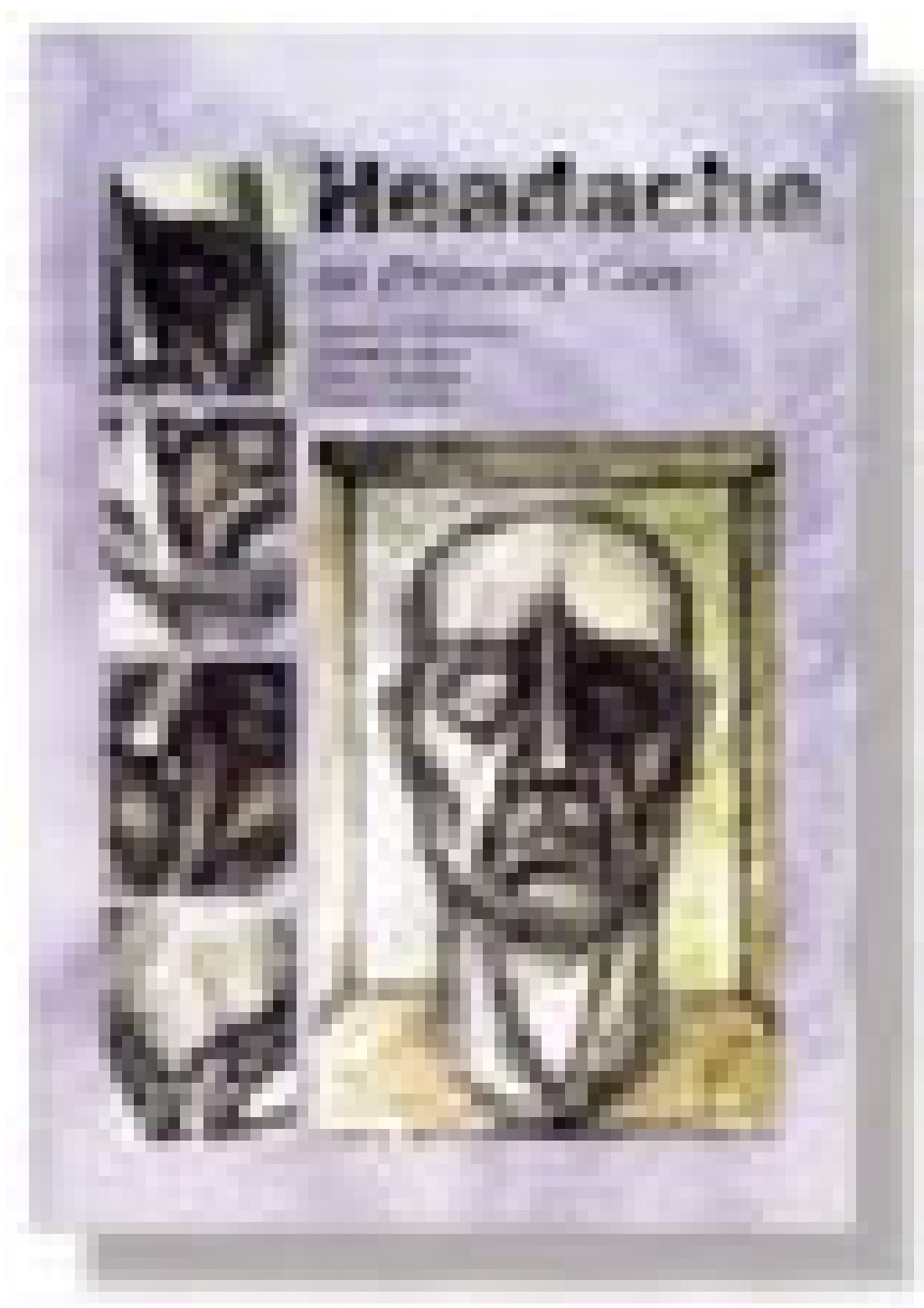
Endostatin inneholder et sinkmolekyl nær den N-terminale enden. Det ble først rapportert at sinkbinding var essensielt for endostatins antiangiogenetiske effekt, men man har senere funnet en strukturell heterogenitet i den sinkbindende delen av molekylet mellom to forskjellige krystallformer. Det er derfor mest sannsynlig at sink spiller en strukturell og ikke en funksjonell rolle (14).

I eksperimentelle studier med rekombinant endostatin fra baculovirusinfiserte celler forhindres proliferasjonen av endotelceller på en doseavhengig måte. Injeksjon av rekombinant endostatin fra bakterier forhindrer effektivt vekst av flere ulike eksperimentelle tumorer hos mus (9, 15), og det har ikke vært noen tegn til behandlingsindusert resistens. I noen tilfeller har det til og med oppstått residivfrihet etter avsluttet behandling (15). Det er derfor knyttet meget store forhåpninger til endostatins terapeutiske potensial når man nå er i ferd med å gjennomføre fase I-studier.



Figur 4 Endostatin er et proteolytisk fragment av den NC1-terminale delen av kollagen XVIII, som tilhører multipleksinfamilien. Figuren viser den strukturelle oppbygningen.

Trippelheliksdeler representeres av en solid strek. Tre endostatinmolekyler er festet til trimeriseringsdelen (Modifisert fra Olsen & Ninomiya (11))



Figur 5 Kollagen XVIII-/endostatinsystemet som lokal negativ kontrollmekanisme for regulering av angiogenese. Lokal sekresjon av proteolytiske enzymer (kathepsin og MMP) fra endotelceller fører til produksjon av endostatin, som hemmer angiogenese. Dette medfører i sin tur reduksjon av kathepsin og MMP. Modifisert fra Felbor og medarbeidere (17)

Er endostatin et fysiologisk produkt?

EOMA-celler produserer kollagen XVIII, sammen med proteolytiske enzymer, som dermed frigjør fragmentet endostatin. Denne proteolytiske mekanismen er nå i ferd med å bli kartlagt (fig 5) (16). Felbor og medarbeidere (17) har vist at EOMA-celler skiller ut store mengder av prokathesin L, som aktiviseres til kathepsin L ved lave pH-

verdier. Kathepsin L spalter endostatin fra kollagen XVIII. EOMA-celler produserer dessuten matriksmetalloproteaser (MMP) som spalter større kollagen XVIII-fragmenter, som blant annet inneholder endostatin (17).

Angiogenese stimuleres av flere forskjellige cytokiner, slik som FGF-2 og VEGF. I senere stadier er prosessen også avhengig av platederivert vekstfaktor (platelet derived growth factor) (PDGF) og transformerende vekstfaktor- β (transforming growth factor β -1) (TGF β -1) (18). Disse stimulatorene binder til heparansulfatproteoglykaner på celleoverflater og til spesifikke reseptorer som signaliserer intracellulært ved stimulering.

Proteoglykanene fungerer som kofaktorer for effektiv angiogen signalisering. Siden kollagen XVIII er kjerneproteinet i et heparansulfatproteoglykan i vaskulære basalmembraner, er det mulig at kollagen XVIII i seg selv er en positiv kofaktor for angiogenese, eventuelt sammen med perlecan, et annet viktig basalmembranproteoglykan (19). I forbindelse med angiogenesen frigjøres som nevnt blant annet MMP og kathepsin L fra endotelceller, og disse enzymene spalter peptidbindinger i NC1-delen av kollagen XVIII. Dette fører til frisetting av fragmenter (fig 5) som virker som lokale inhibitorer.

Hvilken fysiologisk betydning har kollagen XVIII-/endostatinssystemet?

Det er blitt foreslått at kollagen XVIII-/endostatinssystemet kan ha utviklet seg som en slags "sensor" av proteolytisk aktivitet forbundet med angiogenese. Systemet fungerer som en negativ kontrollmekanisme gjennom frigjøring av endostatin (fig 5).

Til tross for at avgjørende data angående biologisk aktivitet hos forskjellige endostatinliknende fragmenter ennå ikke foreligger, er det sannsynlig at man har en antiangiogen effekt også med fragmenter som er noe større eller noe mindre enn endostatin. Et argument for dette er det faktum at aminosyresekvensen i den regionen av kollagen XVIII som spaltes ved frigjøring av endostatin, ikke er identisk hos f.eks. mus og menneske (20). Humant endostatin er 11 aminosyremolekyler lengre enn museendostatin (17). Det er videre påvist at rekombinante endostatiner med ekstra aminosyrer i den N-terminale enden er like aktive som endostatin in vitro og in vivo (21).

Angiogenesehemmere som behandling

Prognosen ved maligne solide svulster er for en stor del avhengig av hvorvidt det skjer en lokal spredning og metastasering eller ikke. En viktig barriere som tumorceller må passere er den ekstracellulære matriks (ECM) som holder sammen celler og basalmembraner. Ved proteolytisk nedbrytning av ekstracellulær matriks omkring tumorceller skjer samtidig en migrasjon og en proliferasjon av endotelceller fra blodkar som omgir tumor.

Det er foreslått at kollagen XVIII-/endostatsystemet har en regulerende funksjon ved angiogenese som lokal hemmer via proteolytisk frigjøring av antiangiogene proteinfragmenter. Det som gjør dette systemet så lovende, er at kollagen XVIII/endostatin er en naturlig komponent av karstrukturer og basalmembraner, noe som taler for at man her har identifisert en fysiologisk mekanisme som kan medvirke til å forhindre vekst og spredning av invasive tumorer. Fremtidige studier vil vise hvorvidt forhåpningene til endostatin som et terapeutisk middel hos pasienter vil innfris eller ikke.

LITTERATUR

1. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* 1966; 164: 491 – 502.
2. Weidner N, Folkman J. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer. *Important Adv Oncol* 1996; : 167 – 90.
3. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 407 – 24.
4. Gospodarowicz D, Rudland P, Lindstrom J, Benirschke K. Fibroblast growth factor: its localization, purification, mode of action, and physiological significance. *Adv Metab Disord* 1975; 8: 301 – 35.
5. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984; 223: 1296 – 9.
6. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306 – 9.
7. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149 – 53.
8. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315 – 28.
9. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277 – 85.
10. Oh SP, Kamagata Y, Muragaki Y, Timmons S, Ooshima A, Olsen BR. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4229 – 33.
11. Olsen BR, Ninomiya Y. Multiplexins. I: Kreis T, Vale R, red. *Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*. Oxford: Oxford University Press, 1999: 399 – 401.
12. Halfter W, Dong S, Schurer B, Cole GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998; 273: 25404 – 12.

13. Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO J* 1998; 17: 1656 – 64.
 14. Hohenester E, Sasaki T, Mann K, Timpl R. Variable zinc coordination in endostatin. *J Mol Biol* 2000; 297: 1 – 6.
 15. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404 – 7.
 16. Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1998; 17: 4249 – 56.
 17. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 2000; 19: 1187 – 94.
 18. Hagedorn M, Bikfalvi A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34: 89 – 110.
 19. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol* 1999; 147: 909 – 11.
 20. Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, Salmivirta M, Claesson-Welsh L, Lindahl U et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1999; 18: 6240 – 8.
 21. Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J* 1999; 18: 4414 – 23.
-

Publisert: 30. november 2000. Tidsskr Nor Legeforen.

© Tidsskrift for Den norske legeforening 2026. Lastet ned fra tidsskriftet.no 17. juli 2026.