

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14380

研究課題名(和文) 未知の血管発芽シグナルを同定するための腫瘍微小環境への多角的アプローチ

研究課題名(英文) Novel approach to identify unknown vascular sprouting signals in tumor angiogenesis

研究代表者

木戸屋 浩康 (Kidoya, Hiroyasu)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00543886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：固形腫瘍の増大と腫瘍組織内の血管形成は密接に関連しており、腫瘍血管を対象とした研究が盛んに行われてきた。しかしながら、腫瘍血管形成において中心的な役割を担うVEGFに対する阻害剤の治療効果は限定的であった。

本研究では、腫瘍組織内での血管形成過程を可視化して観察することで、その制御機構の解明に取り組んだ。まず、腫瘍血管を蛍光にて識別可能なイメージングマウスを作製した。このマウスにて生体イメージング系を確立し、腫瘍血管の形成が起こる部位や時期などを解析した。その結果、これまで漠然とした考えしかなかった腫瘍血管の形成ステップが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Blood vessels in tumor tissues is essential for solid tumor progression. To clarify the mechanism of tumor blood vessels formation, studies on tumor blood vessels have been vigorously investigated. Consequently, VEGF was identified as a potent angiogenic factor for formation of tumor blood vessels. However, the therapeutic effect of inhibitors of VEGF have been disappointing in clinical studies.

In this study, we tried to elucidate cellular mechanism of tumor blood vessel formation by visualizing the process of angiogenesis in tumor tissue. We generated imaging mouse that enabling the discrimination of tumor blood vessels by expression of fluorescence protein. By using this mouse and multiphoton microscopy system, we established in vivo imaging model and analyzed the spatiotemporal dynamics of tumor blood vessels. As a result, we revealed the previously unknown mechanism of tumor blood vessel formation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 腫瘍血管 イメージング VEGF

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の増大には、腫瘍組織内の血管の形成が密接に関連していることが知られている。そのため、腫瘍血管の形成機構の解明を目的とした癌研究が盛んに行われてきた。その結果、腫瘍血管形成において中心的な役割を担う VEGF ファミリーが同定され、その阻害剤が臨床においても利用されている。しかしながら、予想に反してその効果は限定的であり、新たな概念に基づく腫瘍血管抑制剤の開発が待望されている。腫瘍組織中に認められる血管は、主に血管新生(angiogenesis)と呼ばれる過程によって形成される。血管新生とは、既存の血管の一部から新たな血管の芽が生まれ、枝を伸ばすように分岐して血管網を形成する現象である。これまでに、発芽細胞の形成に VEGF ファミリー分子群 および DLL4-Notch シグナル系が関与している事が報告されている。しかしながら、前述したように VEGF 阻害剤や Notch シグナル阻害剤による抗腫瘍効果は限定的な事から、未知の発芽制御メカニズムの存在が示唆されている。腫瘍血管の抑制による癌治療法を開発するためには、VEGF シグナル系や DLL4-Notch シグナル系に依存していない未知の血管形成機構を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍組織内でどのようにして血管が形成されていくのかを可視化して観察することで、その制御機構の解明に取り組む。この目的を達成するため、まず、血管の発芽部位を蛍光にて識別可能なイメージングマウスを作製する。このマウスにて担癌モデルを作製し、多光子顕微鏡を用いた生体イメージング系を確立する。生体イメージング系によって撮影された動画から、血管の発芽が起こる部位や時期、方向などを数値化して解析し、これまで漠然とした考えしかなかった腫瘍血管の形成ステップを、実際にどのような規則に従って進んでいくのかを明らかにする。さらに VEGF 阻害剤を加えた場合にもたらされる変化についても検証し、VEGF 非依存性の発芽がどのように進むかを明らかにする。さらには、蛍光標識された発芽部位の血管内皮細胞をセルソーターにて回収して遺伝子発現を解析することで、この細胞に特異的な分子シグナルの解明に取り組む。将来的には、本研究で確立した解析系にて、発芽を制御する腫瘍微小環境と血管の相互作用の分子基盤の実態解明を実現させる。

3. 研究の方法

発芽血管内皮を生体内で可視化させる系の確立に向けて、新生血管に特異的に発現が認められる分子として申請者が同定した apelin と APJ に着目した(Kidoya H. EMBO J. 2008. Blood. 2010. Oncogene. 2012. Developmental Cell. in revision)。これらの新生血管に特異的な apelin および APJ 遺

伝子のプロモーター下で蛍光タンパクを発現するイメージングマウス (apelin-tdTomato BAC Tg、APJ-EGFP BAC Tg) を作成した。

作製したマウスから皮膚と網膜組織を回収し、発芽血管にて蛍光タンパクが発現しているかを免疫得染色と RNA の発現量から検証した。また、腫瘍細胞を移植することで担癌モデルを作成し、in vivo でのライブイメージング解析系の構築を進めた。撮影された動画から、腫瘍血管の発芽がどのように進んでいくのかを数値化し、法則性を見つけ出した。さらに、腫瘍血管の生体イメージングモデルに VEGF 阻害剤を投与することで腫瘍血管の発芽部位がどのような変化するのか解析した。また、発芽血管内皮細胞を蛍光タンパクの発現を指標にセルソーターにて回収し、遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

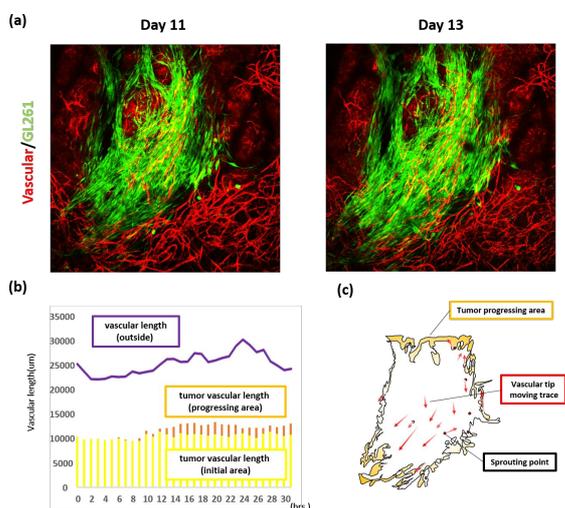
(1) 血管発芽のイメージングマウスの作成と検証

Apelin および APJ の発現を指標として、発芽血管や新生血管の内皮細胞の生体組織での観察や、組織からの細胞の分離を可能とするため、これらのプロモーターにて蛍光を発現する BAC-Tg マウスの作成を試みた。Apelin についてはコーディング領域を含む 224kbp のゲノム配列にて tdTomato を発現するようにデザインし、APJ については同じく 233kbp のゲノム配列にて EGFP を発現するようにデザインした BAC ベクターを Red / ET Recombination System によって作成した。このベクターを用いて、トランスジェニックマウスを作成し、産まれてきた F0 マウスの中から PCR 法によりトランスジェニックマウスを選別した。得られたマウスを、それぞれ Apelin-tdTomato BAC-Tg マウスと APJ-EGFP BAC-Tg マウスと命名し、蛍光タンパクの発現量が apelin および APJ と関連しているかを検討した。作成したマウスの新生児の網膜を回収して血管を CD31 抗体にて whole mount 免疫染色し、蛍光タンパクの発現が新生血管に特異的に認められるかを検討した。その結果、Apelin-tdTomato BAC-Tg マウスでは、発芽部位や新生血管に特異的な tdTomato の発現が確認できたが、APJ-EGFP BAC-Tg マウスに関しては、一部の静脈血管において EGFP の発現が認められたのみであり、蛍光陽性率や強度は弱かった。そこで、生体イメージング解析には Apelin-tdTomato BAC-Tg マウスを用いることにした。LLC(Lewis lung carcinoma)細胞を 100 万個、Apelin-tdTomato BAC-Tg マウスの背部皮下に移植して担癌モデルマウスを作成した。移植から 14 日後に形成された腫瘍の切片にて血管を免疫染色すると、腫瘍血管の発芽部位において特異的に蛍光タンパクが発現していることを確認できた。さらに、セルソーターにて蛍光を発現する腫瘍血管内皮細胞を分

取して、apelin および発現を解析したところ、蛍光強度に相関した mRNA の発現が確認できた。

(2) in vivo イメージングによる発芽部位の解析

apelin- tdTomato BAC Tg マウスのブレグマ近傍の頭蓋骨内表層部に GL261 グリオーマ細胞を移植することで担癌モデルを作成した。移植からの経時的な腫瘍組織の変化を多光子共焦点レーザー顕微鏡にて麻酔下で撮影し、生体イメージング解析を進めた(下図 a)。その結果、グリオーマの腫瘍血管の伸長方向と腫瘍の浸潤方向との間に強い相関が認められ、発芽した血管の伸長には腫瘍細胞との相互作用を要することが示唆された(下図 b、c)。



次に、腫瘍内の低酸素状態を観察するため、5HRE-EGFP を発現させた GL261 細胞を用いて生体イメージング解析を行ったところ、これまで定説とされていた低酸素が血管新生を引き起こしている様子は確認されず、低酸素に依存しない未知なる腫瘍血管の制御機構の存在が示唆された。また、FITC-dextran を静脈内に投与することで、脆弱血管と成熟血管の区別が可能となることを確認した。

(3) 血管内皮細胞の発芽の制御メカニズムの検討

さらに、VEGF 非依存性の発芽誘導メカニズムを解析するため、VEGF 阻害剤(axitinib)を投与して生体イメージング解析を行った。その結果、腫瘍組織のある程度の領域で血管発芽の抑制効果が認められた。近年、VEGF 阻害剤による癌治療の効果が限定的であることが課題となっているが、本研究にて確立したイメージング解析系を用いることで、VEGF 非依存的な血管形成メカニズムの解析を進めたい。本研究を通じて、これまで提唱されていた腫瘍血管形成の概念の検証が進んでおり、なぜ血管新生抑制剤が効果を示さないのか、どのような方法であれば腫瘍血管の形成を抑制できるのか、といった疑問に対する

答えが得られつつある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N. Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J Biochem.* 査読有. In press. doi: 10.1093/jb/mvx001.

Matsushita J, Inagaki S, Nishie T, Sakasai T, Tanaka J, Watanabe C, Mizutani KI, Miwa Y, Matsumoto K, Takara K, Naito H, Kidoya H, Takakura N, Nagai T, Takahashi S, Ema M. Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Angiogenesis in Flk1-Nano-lantern Transgenic Mice. *Sci Rep.* 査読有. Vol17. 2017. Article number: 46597. doi:10.1038/srep46597.

Zhang L, Takara K, Yamakawa D, Kidoya H, Takakura N. Apelin as a marker for monitoring the tumor vessel normalization window during antiangiogenic therapy. *Cancer Sci.* 査読有. Vol.107. Issue.1. 2016. pp.36-44. doi: 10.1111/cas.12836. Epub 2015 Nov 12.

Naito H, Wakabayashi T, Kidoya H, Muramatsu F, Takara K, Eino D, Yamane K, Iba T, Takakura N. Endothelial Side Population Cells Contribute to Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Drug Resistance. *Cancer Res.* 査読有. Vol.76, 2016. Issue.11. pp.3200-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2998.

Yamane K, Naito H, Wakabayashi T, Yoshida H, Muramatsu F, Iba T, Kidoya H, Takakura N. Regulation of SLD5 gene expression by miR-370 during acute growth of cancer cells. *Sci Rep.* 査読有. Vol16. 2016. Article number:30941. doi: 10.1038/srep30941.

[学会発表](計9件)

Hiroyasu Kidoya, Apelin-APJ system regulates juxtapositional alignment of arteries and veins, Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, 2015年5月13日, 大阪

木戸屋 浩康, Apelin-APJ シグナルによる動静脈形成の制御機構、加齢研セミナー、2015年7月15日、仙台

木戸屋 浩康、新規単球サブセットによる
高次血管ネットワークの編成機構の解明、
Vascular Biology Innovation Conference、
2015年8月22-23日、東京

Regulation of arteries and veins
patterning through apelin-APJ system.
Hiroyasu Kidoya. "New Era of Angiogenesis
Research" symposium. 2016年7月7日、口
頭発表(招待シンポジスト)、英語、大阪

Hiroyasu Kidoya, Molecular and
Cellular Mechanisms for the Regulation of
Arterial and Venous Vascular Structure.
The 12th International Congress of Cell
Biology. 2016年7月21-25日、Czech
Republic.

木戸屋 浩康、血管を形づくる、細胞と
分子の科学、「細胞間クロノ・コミュニケー
ション」研究会、2016年8月30日、千葉

Hiroyasu Kidoya, Regulation of
arterial and venous vascular patterning
through apelin-APJ system. 19th
International Vascular Biology Meeting.
2016年10月30日-11月3日, United States.

木戸屋 浩康、血管形成のダイナミクス、
Winter School 2016 @微研、2016年12月27
日、大阪

木戸屋 浩康、腫瘍血管が生みだす負のス
パイラル、第3回 血管生物若手研究会、2017
年3月3日(金)-4日(土)、兵庫

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://st.biken.osaka-u.ac.jp/index.htm>

|

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸屋 浩康 (KIDOYA, Hiroyasu)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00543886

(2) 研究協力者

村松 史隆 (MURAMATSU, Fumitaka)
大阪大学・微生物病研究所・大学院生