

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18411

研究課題名(和文) NDRG1のマクロファージと血管新生を介したがん微小環境の制御と新規がん治療創出

研究課題名(英文) Novel anti-angiogenic cancer therapeutic strategy by targeting differentiated macrophage lineage cells through N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)

研究代表者

渡 公佑 (WATARI, Kosuke)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：90596834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は2001年に腫瘍関連マクロファージに高発現しているN-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)を腫瘍血管新生制御因子として同定した。NDRG1ノックアウトマウスではがん移植モデル系で移植腫瘍の増大と血管密度と浸潤マクロファージ数の減少が観察された。さらにin vitro, in vivoの両方の系で腫瘍関連マクロファージの分化能や浸潤能、機能の低下とVEGF誘導特異的な血管新生の減少がみられた。本研究では、特に間質細胞におけるNDRG1が腫瘍関連マクロファージへの分化や腫瘍部位での活性化を介してがん血管新生を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Macrophages, which differentiated into tumor-associated macrophages in tumor microenvironment, are known to play crucial roles in tumor angiogenesis. However, the specific molecules and markers of these “angiogenesis-supporting macrophages” have not been fully defined. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), a gene responsible for a hereditary motor and sensory neuropathy (Lon-Charcot-Marie disease), plays pleiotropic roles in cell proliferation, development, differentiation, and tumorigenesis. We have previously reported that NDRG1 expression levels in cancer cells were closely correlated with tumor angiogenesis. However, how NDRG1 could affect tumor angiogenesis remains unclear. In this study, we asked how NDRG1 could specifically modulate tumor angiogenesis through its differentiation control of macrophage lineage cells by using NDRG1 knock out mice.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：NDRG1 血管新生 マクロファージ VEGF 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

- (1) NDRG1 は 4 つの NDRG ファミリー遺伝子 (NDRG1 ~ NDRG4) の 1 つであり、オンコジンは N-Myc や c-Myc により下方制御される遺伝子として単離された 43kDa の蛋白質である。NDRG1 は多くの臓器で発現しており、ストレス応答や免疫細胞の増殖や分化に関与していることが報告されている。またがん細胞での NDRG1 の発現はがんの転移や分化度と相関することが報告されている。しかし、がん微小環境における NDRG1 のがん悪性進展への役割についてはほとんど研究が進んでいない。
- (2) がん微小環境を構成するがん間質細胞の 1 つであるマクロファージはがんの悪性進展に極めて重要な役割を担っていることが様々ながん種において報告されている。腫瘍内へと浸潤したマクロファージはがん細胞や炎症などの刺激によってがん悪性進展を促進する多様な性質を獲得することが報告されている。この腫瘍関連マクロファージの重要な機能の 1 つががんの血管新生を促進することである。これまで我々はがん血管新生における腫瘍関連マクロファージの機能とその関連因子の治療標的としての可能性について研究を進めるとともに、がん微小環境における NDRG1 のがん悪性進展への関与について研究を進めてきた。
- (3) 我々の研究室では、過去にがん細胞における血管新生を制御するタンパクとして NDRG1 を同定し、腎癌、胃癌、肺癌、脳腫瘍、骨肉腫の患者において NDRG1 の発現が血管密度や悪性進展と相関することを報告した。さらに、動物実験系において胃癌細胞における NDRG1 の発現上昇は、血管新生や浸潤/転移を亢進させることを報告した。
- (4) 最近我々は、がん微小環境における NDRG1 のがん悪性進展への関与を明らかにするため、NDRG1 ノックアウトマウスを用いた研究を進めている。その結果、NDRG1 ノックアウトマウスでは、皮下移植腫瘍の体積と新生血管密度と浸潤マクロファージ数の減少、および ex vivo における VEGF-A 誘導のマウス大動脈由来の血管新生の著明な減少を観察している。さらにマウスの血清を用いたマイクロアレイの結果より、マクロファージ分化誘導因子 M-CSF とマクロファージ産生因子の発現低下を観察している。
- (5) 現在、さらに NDRG1 ノックアウトマウスで、骨髄由来前駆細胞からマクロファージへの分化能の低下、腫瘍内より単離した腫瘍関連マクロファージの

VEGF-A を含むがん悪性進展関連因子の発現量の低下、大動脈リングアッセイ法における VEGF 特異的に誘導される大動脈切断面からの血管新生の減少を観察している。

2. 研究の目的

- (1) 宿主 NDRG1 はがん微小環境における腫瘍関連マクロファージと VEGF-A 特異的な血管新生を制御することで、がん悪性進展を促進するがん微小環境の形成に関与している可能性が考慮される。そこで本研究では、NDRG1 が腫瘍関連マクロファージ (分化能、浸潤能、機能) 及び VEGF 特異的に誘導される血管新生の制御を介して、がん悪性進展を促進するがん微小環境を形成するメカニズムを明らかにし、それらを標的とした新規がん治療の創出を目指したいと考えた。

3. 研究の方法

- (1) マトリゲルプラグアッセイ  
野生型マウスに 3 Gy の放射線を全身照射し、骨髄抑制を行った。放射線照射一週間後に、B16/BL6 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l) と野生型または NDRG1 ノックアウトマウス骨髄由来マクロファージ ( $5.0 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l) を PBS に懸濁し、計 400  $\mu$ l の growth factor reduced マトリゲルに懸濁し、マウス両側腹部に 500  $\mu$ l 移植した。移植から 10 日後にマトリゲルを回収し凍結切片の作製及びマクロファージの単離を行った。
- (2) マウス角膜法  
ヒト VEGF-A (200 ng) 及び FGF-2 (100 ng) をそれぞれ 0.3  $\mu$ l のハイドロネットに封入し、WT 及び NDRG1KO マウスの角膜に移植した。7 日目に Viewfinder 3.0 を用いて角膜の血管を撮影し定量化した。マウス角膜における血管新生の定量化分析には Image J を用いた。
- (3) マウス肺組織からの血管内皮細胞の単離・培養  
WT 及び NDRG1 ノックアウトマウスより肺を摘出しフェザーを用い細かく切り刻んだ。その後 0.5% collagenase L、20 unit/ml Dnase 含有の PBS 中で 37、60 分間湯浴で混和した。1600rpm で 10 分間遠心した。上清を破棄し、ペレットを 5% FBS 含有の Endothelial Growth Media-2 Microvascular (EGM-2MV) 培地で懸濁し型コラーゲンでコートしたディッシュに播種した。4 から 6 日間培養後、0.05% トリプシン/EDTA を添加し、細胞を剥離した。1000rpm で 5 分間遠心し、上清を破棄し、磁気標識抗 CD31 抗体を 10  $\mu$ l 添加し 4 で 15 分間浸した後に、MACS バッファー 5ml を加え 1000rpm で 5 分間遠心した。上清を

破棄し、ペレットを MACS バッファーで懸濁し 25LS カラムにて単離を行った。単離した細胞を 15%FBS 含有 EGM-2MV 培地で 4 から 6 日間培養した。再び磁気ビーズを用いて CD31 陽性細胞の単離を同様にを行い、単離した細胞を 15%FBS 含有の EGM-2MV 培地で培養し血管内皮細胞として用いた。

#### 4. 研究成果

- (1) NDRG1 ノックアウトマウス由来骨髄前駆細胞は野生型と比較して、マクロファージ系統細胞である成熟型マクロファージ、単球由来樹状細胞、破骨細胞への分化能が有意に低下しており、それぞれの分化誘導因子 M-CSF や GM-CSF、RANKL 刺激時の下流シグナル因子 (AKT, と ERK, STAT5, NFATc1) の活性化が減少していることを明らかにした。
- (2) 放射線照射により骨髄抑制を行った野生型マウスにがん細胞 (B16/BL6: マウスメラノーマ細胞) と共に NDRG1 ノックアウトマウス骨髄由来マクロファージをマトリゲル内に封入し移植したところ、野生型マウス骨髄由来マクロファージ封入時と比較して、新生血管密度が減少していた。
- (3) 野生型マウスと比較して NDRG1 ノックアウトマウスでは、  
発生期における網膜の血管形成が遅延していた。  
マウス角膜法における VEGF-A 誘導の血管新生能が有意に低下していたが、FGF-2 誘導の血管新生は同様に誘導された。
- (4) NDRG1 ノックアウトマウス肺組織由来血管内皮細胞は、野生型マウス由来血管内皮細胞と比較して、通常医用条件下及び FGF-2 誘導の細胞増殖には差が見られなかったが、VEGF-A 誘導の増殖能が有意に低下していた。
- (5) NDRG1 ノックアウトマウス肺組織由来血管内皮細胞は、野生型マウス由来血管内皮細胞と比較して、VEGF-A 誘導の遊走能も有意に低下していた。
- (6) NDRG1 ノックアウトマウス肺組織由来血管内皮細胞では VEGF-A 刺激時の下流シグナル因子 ERK のリン酸化の上昇が有意に低下していた。一方、FGF-2 刺激時の ERK のリン酸化は野生型マウス由来血管内皮細胞と同様に誘導された。
- (7) 両マウス由来の肺血管内皮細胞での VEGF-A 受容体 (VEGFR2) の全発現量と細胞膜上での発現量を比較検討したが、差はみられなかった。

#### 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 1 件)

Watari K, Shibata T, Nabeshima H, Shinoda A, Fukunaga Y, Kawahara A, Karasuyama K, Fukushi J, Iwamoto Y, Kuwano M, Ono M. Impaired differentiation of macrophage lineage cells attenuates bone remodeling and inflammatory angiogenesis in NdrG1 deficient mice. *Sci Rep.* 2016 Jan 18;6:19470. doi: 10.1038/srep19470. 査読有

[学会発表](計 6 件)

渡 公佑, 柴田 智博, 鍋島 弘嗣, 河原 明彦, 村上 雄一, 桑野 信彦, 小野 眞弓. NDRG1 は血管内皮細胞における VEGF/VEGFR2 シグナル活性を介してがん血管新生を促進する, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2016.10.07, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

渡 公佑, 柴田 智博, 村上 雄一, 小野 眞弓. NDRG1 はがん血管新生と転移を亢進する—マクロファージの分化と成熟化を介して, 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2016.07.21, 米子コンベンションセンター (鳥取県・米子市)

渡 公佑, 柴田 智博, 河原 明彦, 村上 雄一, 鹿毛 政義, 小野 眞弓. NDRG1 による血管内皮細胞の VEGF/VEGFR2 シグナルの特異的な制御 - がん血管新生阻害剤の新規標的因子, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016.06.01, 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

Watari K, Shibata T, Nabeshima H, Shinoda A, Fukunaga Y, Kawahara A, Karasuyama K, Fukushi JI, Murakami Y, Kuwano M, Ono M. Novel anti-angiogenic cancer therapeutic strategy by targeting differentiated macrophage lineage cells through N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2015.11.07. Boston (USA)

渡 公佑, 柴田 智博, 鍋島 弘嗣, 篠田 あい, 河原 明彦, 福土 純一, 村上 雄一, 桑野 信彦, 小野 眞弓. NDRG1 はマクロファージの成熟と活性化を介してがん

血管新生の重要な鍵をにぎる, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10.09, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

渡 公佑, 柴田 智博, 村上 雄一, 桑野 信彦, 小野 眞弓, NDRG1 は血管内皮細胞 VEGF-A/VEGFR2 シグナルを介してがん血管新生と転移を促進する, 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2015.07.23, シティプラザ大阪 (大阪府・大阪市)

〔その他〕

九州大学大学院薬学研究院創薬腫瘍科学講座ホームページ

<http://shuyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡 公佑 (WATARI, Kosuke)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 90596834