

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間 2005～2009

課題番号：17014033

研究課題名（和文）がん組織における血管リモデリング機構

研究課題名（英文）Analysis of blood vessel formation in the tumor environment

研究代表者 高倉 伸幸（TAKAKURA NOBUYUKI）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80291954

研究成果の概要（和文）：がんの組織に生じる新しい血管の形成は、がん細胞への養分や酸素の供給の導線となり、この血管形成が生じる分子機構を解明することで、その制御により新しいがん治療の開発をめざして研究を遂行した。その結果、がん組織の中の最も悪性度の高いがん幹細胞は腫瘍周囲の血管新生抑制剤に抵抗性を示す成熟血管近傍に存在し、この血管の成熟化に、造血幹細胞の血管壁細胞への分化転換、および血管内皮細胞に発現する Tie2 受容体、APJ 受容体の活性化が関わることが判明した。

研究成果の概要（英文）：As newly developed blood vessels in tumor environment supply oxygen and nutrient to cancer cells resulted in growth of tumor, we analyzed the molecular mechanisms of blood vessel formation in cancer to develop a good strategy for inhibition of tumor angiogenesis. We found that cancer stem cells locate near the mature blood vessels in the tumor edge that show resistance against angiogenesis inhibitors. Moreover, we found that maturation of blood vessels in tumor is caused by the transdifferentiation of hematopoietic stem cells into mural cells which support stability of blood vessels and associates with activation of receptors, Tie2 and APJ expressed on endothelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	47,000,000	0	47,000,000
2006年度	48,600,000	0	48,600,000
2007年度	48,600,000	0	48,600,000
2008年度	48,500,000	0	48,500,000
2009年度	48,500,000	0	48,500,000
総計	241,200,000	0	241,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：癌、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

血管は、内腔を一層の血管内皮細胞が全面に覆い、その外側から壁細胞と呼ばれる血管平滑筋細胞あるいはペリサイトが裏打ちして安定した構造を呈している。このような既存の血管から無血管野へ新しい血管が形成される際には、壁細胞が内皮細胞から離脱した領域から、内皮細胞によるマトリックスの消化に始まり、内皮細胞の増殖、移動など血管の再構築過程、いわゆる血管新生が生じる。胎児期の脈管形成、血管新生の分子機序が、近年血管形成に関わることが明らかにされてきたレセプター型チロシンキナーゼである VEGF 受容体ファミリー、TIE ファミリー、Eph ファミリーの機能解析から徐々に明らかにされつつある。

## 2. 研究の目的

胎児期の血管形成の基本原理は、成体における種々の生理的、病的血管形成のメカニズムにも同様に利用される分子機序であることが想像される。しかし、特に腫瘍内に形成される血管は、正常な血管で観察される血管壁細胞の内皮細胞への裏打ちが高頻度に欠損し、また開放系の血管のごとく内皮細胞の存在しない血管様構造も観察されるなど、正常な血管形成の原理が全てあてはまるものではない。このような異常血管はがん組織内でがんの支持細胞として機能する間葉系細胞の形質や、がん細胞による血管関連分子の無秩序な分泌によると考えられるものの、その分子機序は現在明らかでない。そこで、本研究ではがん組織と正常組織で形成される血管形成の相違を血管形成の基本原理に関連する上述した受容体ファミリーの機能解析を中心に比較検討し、がん組織における血管新生のリモデリング機構の基本原理をとらえることで、腫瘍血管新生を抑制する制御法を見い出すことを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) がん組織の血管リモデリングにおける Tie2 の機能制御

Tie2 の血管新生に対する作用の中で 1) 血管透過性の抑制、2) 血管内皮細胞の細胞周期の遅延あるいは細胞分裂抑制、3) 内皮細胞-壁細胞間細胞接着の誘導につき、Tie2 活性化に伴い内皮細胞において発現が制御されている分子を同定し、正常組織形成における機能および、がん組織における発現、機能を詳細にする。腫瘍血管新生との関わりは、遺伝子改変マウスを用いて個体レベルにおいても解析する。これら解析結果に立脚し、腫瘍血管新生抑制に有効な分子に関し、血管新生抑制法開発に着手する。

(2) 動脈、静脈の区別に関わる ephrinB2-EphB4 システムの腫瘍血管形成における機能解析

動脈内皮細胞に発現する ephrinB2 と静脈内皮細胞に発現する EphB4 に対するモノクローナル抗体を作成し、腫瘍内の動脈、静脈の形成過程を種々の腫瘍径の組織切片を用いた免疫染色により明確にする。腫瘍血管新生において動脈、静脈形成が腫瘍の増大や転移などいかに関わりがあるかを詳細にする。

(3) がん幹細胞の棲息領域、血管ニッチの解明

がん細胞は生化学的に単一ではなく、がん組織には、薬剤耐性で、浸潤転移能が高く、がん細胞を産生するがん幹細胞が存在する。このがん幹細胞のがん組織内における局在を明確にすることで、がん幹細胞に対する治療戦略がたてられる。我々は、造血幹細胞に特有の自己複製の分子メカニズムの解析により、PSF1 という核内因子が幹細胞の DNA 複製に必須であることを見いだした。この PSF1 の発現は、造血幹細胞だけでなく、神経幹細胞、皮膚幹細胞ならびに胎性幹細胞などの幹細胞系列の細胞に特異的に観察され、また腫瘍組織内でもがん幹細胞に発現が認められることが示唆されてきた。そこで、本研究では、この PSF1 遺伝子プロモーターの制御下に EGFP を発現するがん細胞を用いて、EGFP 陽性がん幹細胞の局在を、血管ニッチとの関連で詳細にし、がん幹細胞にとっての生態学的適所を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1)

①腫瘍周囲に集合する造血幹細胞は血管成熟化因子であるアンジオポエチン-1

(Ang1) を分泌しており、この Ang1 は内皮細胞に対し apelin という成長因子の産生能を高める。そして、この apelin の受容体 APJ は VEGF 刺激により内皮細胞で発現が誘導されることが判明した。Apelin のノックアウトマウスが血管の狭小化の表現型を示し、また大動脈リングを用いた解析から、VEGF と apelin の存在下では VEGF 単独に比して、管腔の拡張した血管が誘導されることから、この apelin/APJ のシステムが Ang1 による血管成熟化の一役を担っていることが判明した。

②アペリンは、内皮細胞への刺激が加わると、血管透過性因子ともいわれている VEGF による血管透過性を抑制した。これは VEGF による内皮細胞同士の接着に必須の VE-Cadherin の細胞内移行を強く抑制することによることが判明した。

(2)

我々は以前、ストロマ細胞を用いた血管内皮細胞の培養系において、ストロマ細胞に EphB4 を過剰に発現させると動脈内皮細胞が発生せず、逆に ephrinB2 を過剰に発現させると静脈内皮細胞が発生しないことを報告してきた。腫瘍細胞には EphB4 が広く発現しているが、腫瘍の悪性化とともに EphB4 の発現が減弱することから、EphB4 の過剰状態は腫瘍内の動脈化を抑制していると仮説を立てた。そこで、EphB4 を腫瘍細胞に過剰に発現させ、マウス皮下に移植したところ、EphB4 を過剰に発現した腫瘍では、ephrinB2 陽性の動脈の形成が抑制され、腫瘍の増大も抑制された。また EphB4 を過剰に発現させた腫瘍と ephrinB2 陽性の内皮細胞の共培養により、ephrinB2 陽性の内皮細胞は細胞死が誘導された。以上より、腫瘍細胞の発現する EphB4 が腫瘍の動脈化を制御して、腫瘍組織の発達に関与していることが明らかになった。

(3)

PSF1 遺伝子プロモーターの制御下に EGFP を発現するがん細胞をマウスに移植した後に、腫瘍から EGFP の発現強度により、がん細胞を分画すると、予想どおり、EGFP の高い発現細胞が、浸潤転移能が高く、薬剤耐性のがん幹細胞の分画となることが判明した。また、この EGFP の発現を組織学的に解析したところ、多くのがん幹細胞は腫瘍周囲の血管領域に密集して存在することが判明した。また、ヒトのがんサンプルについても解析したところ、ヒトにおいても PSF1 高発現がん細胞は、腫瘍周囲の血管領域に存在することが判明した。

#### 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 33 件)

1. Kidoya H, Naito H, and Takakura N. Apelin induces enlarged and non-leaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood* 115, 3166-3174, 2010 (査読有り).
2. Nagahama Y, Ueno M, Miyamoto S, Morii E, Minami T, Mochizuki N, Saya H, Takakura N. PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer Res* 70, 1215-1224, 2010(査読有り).
3. Nagahama Y, Ueno M, Haraguchi N, Mori M, Takakura N. PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 392, 150-154, 2010(査読有り).

4. Ueno M, Itoh M, Sugihara K, Asano M, and Takakura N. Both alleles of *PSF1* are required for maintenance of pool size of immature hematopoietic cells and acute bone marrow regeneration. *Blood* 113: 555-562, 2009(査読有り).
5. Takakura N and Kidoya H. Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells : involvement of apelin/APJ and Angiopoietin/Tie2 interactions in vessel caliber size regulation. *Thromb Haemost* 101:999-1005, 2009(査読有り).
6. Katoh S, Kamimoto T, Yamakawa D, and Takakura N. Lipid rafts serve as signaling platforms for Tie2 receptor tyrosine kinase in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 315:2818-2823, 2009(査読有り).
7. Han Y, Ueno M, Nagahama Y, and Takakura N. Identification and characterization of stem cell-specific transcription of PSF1 in spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 609-613, 2009(査読有り).
8. Naito H, Kidoya H, Sato Y, and Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J Biochem* 145: 653-659, 2009(査読有り).
9. Satoh N, Yamada Y, Kinugasa Y and Takakura N. Angiopoietin-1 alters tumor growth by stabilizing blood vessels or by promoting angiogenesis. *Cancer Sci.* 99:2373-2379, 2008(査読有り).
10. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, and Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 10: 513-526, 2008(査読有り).
11. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, and Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J* 27:522-534, 2008(査読有り).
12. Katoh SY, Ueno M, and Takakura N. Involvement of MDR1 function in proliferation of tumor cells. *J Biochem* 143:517-24, 2008(査読有り).
13. Huang X, Yamada Y, Kidoya H, Naitoh H, Nagahama Y, Kong L, Katoh S, Li W, Ueno M, and Takakura N. EphB4 overexpression on B16 melanoma cells affects arterial-venous patterning in tumor angiogenesis. *Cancer Res* 67:9800-9808, 2007(査読有り).
14. Yamada Y, Yokoyama S, Wang XD, Fukuda N, and Takakura N. Cardiac stem cells in brown adipose tissue express CD133 and

- induce bone marrow non-hematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. *Stem cells* 25: 1326-1333, 2007(査読有り).
15. Yamada Y, Yokoyama SI, Fukuda N, Kidoya H, Huang XY, Naitoh H, Satoh N, Takakura N. A novel approach for myocardial regeneration with educated cord blood cells cocultured with cells from brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 353:182-188, 2007(査読有り).
  16. Tonchev AB, Yamashima T, Guo J, Chalidakov GN, and Takakura N. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience* 144:1425-1435, 2007(査読有り).
  17. Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, Mukaida N. Essential Roles of the CC Chemokine Ligand 3-CC Chemokine Receptor 5 Axis in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis through Regulation of Macrophage and Fibrocyte Infiltration. *Am J Pathol.* 170: 843-854, 2007(査読有り).
  18. Vachkov IH, Huang X, Yamada Y, Tonchev AB, Yamashima T, Kato S, and Takakura N. Inhibition of axonal outgrowth in the tumor environment: Involvement of class 3 semaphorins. *Cancer Sci* 98:1192-1197, 2007(査読有り).
  19. Yamada Y, and Takakura N. Physiological pathway of differentiation of hematopoietic stem cell population into mural cells. *J Exp Med* 203: 1055-1065, 2006(査読有り).
  20. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I. Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J* 25: 3955-3965, 2006(査読有り).
  21. Sano H, Hosokawa K, Kidoya H, and Takakura N. Negative Regulation of VEGF-Induced Vascular Leakage by Blockade of Angiotensin II Type 1 Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2673-2680, 2006(査読有り).
  22. Takakura N. Role of hematopoietic lineage cells as accessory components in blood vessel formation. *Cancer Sci* 97: 568-574, 2006(査読有り).
  23. Yamada Y, Wang XD, Yokoyama S, Fukuda N, and Takakura N. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 662-670, 2006(査読有り).
  24. Kong L, Ueno M, Itoh M, Yoshioka K, and Takakura N. Identification and characterization of mouse PSF1-binding protein, SLD5. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 1204-1207, 2006(査読有り).
  25. Li WL, Yamada Y, Ueno M, Nishikawa S, Nishikawa S, and Takakura N. Platelet derived growth factor receptor alpha is essential for establishing a microenvironment that supports definitive erythropoiesis. *J Biochem* 140: 267-273, 2006(査読有り).
  26. Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, and Takakura N. Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* 105: 2757-2763, 2005(査読有り).
  27. Ueno M, Itoh M, Kong L, Sugihara K, Asano M, and Takakura N. *PSF1* is essential for Early Embryogenesis in mice. *Mol Cell Biol* 25: 10528-10532, 2005(査読有り).
  28. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, and Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 25:136-146, 2005(査読有り).
- [学会発表] (計 33 件)
1. Nobuyuki Takakura: Visualization of Cancer Stem Cell Population in the Vascular Niche. The 21st Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB), Oct 15-16, 2009, Seoul, Korea
  2. Nobuyuki Takakura : Endogenous negative feedback regulation of angiogenesis by micro-RNA, 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1-3 日、パシフィコ横浜 (横浜)
  3. Nobuyuki Takakura : Visualization of cancer stem cells and their vascular niche、第 71 回日本血液学会総会、2009 年 10 月 23-25 日、国立京都国際会館 (京都)
  4. Nobuyuki Takakura: Maturation of Blood Vessels by Hematopoietic Stem Cells. The 15<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, June 1-5, 2008. Sydney, Australia
  5. Nobuyuki Takakura: Maturation of Blood Vessels by Hematopoietic Stem Cells. The 9<sup>th</sup> International Conference, June 22-26, 2008. Conference and Cultural Center of the University of Patras, Patras, Greece
  6. 高倉伸幸 血管新生の基礎と臨床的進歩 第 70 回 日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、国立京都国際会館 (京都)
  7. Nobuyuki Takakura: Tie2 alters tumor growth by stabilizing blood Vessels or promoting angiogenesis, 第 67 回日本癌学

- 会学術総会 (International Session)、2008年10月28-30日、名古屋国際会議場 (名古屋)
8. Nobuyuki Takakura: Visualization of cancer stem cells and vascular niche formation, 第67回日本癌学会学術総会 (Symposium)、2008年10月28-30日、名古屋国際会議場 (名古屋)
  9. Nobuyuki Takakura: Involvement of hematopoietic stem cell population in angiogenesis. 7<sup>th</sup> ESH Euroconference on Angiogenesis. May 11-14, 2007. Albufeira, Portugal
  10. Nobuyuki Takakura: Process of blood vessel maturation in physiological and pathological condition. 19<sup>th</sup> FAOBMB Seoul Conference. May 27-30, 2007 COEX Center, Seoul, Korea
  11. Nobuyuki Takakura: Arterial and venous specification in pathological and physiological angiogenesis. Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology. August 16-17, 2007. Ladena Resort (Doosan Resort), Chuncheon, Korea
  12. 高倉伸幸: レセプター型チロシンキナーゼ Tie2 による血管新生の制御機構. 第30回、日本分子生物学会、平成19年12月15-21日、パシフィコ横浜 (横浜)
  13. Nobuyuki Takakura: Maturation of blood vessels in the tumor. 第66回日本癌学会学術総会、平成19年10月3-5日、パシフィコ横浜 (横浜)
  14. Nobuyuki Takakura. Analysis of molecules regulated by Tie2 on stemness and blood vessel formation. 5th Congress of Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. 12-15 April, 2006 Jeju, Korea

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]  
 ホームページ等  
 該当なし

6. 研究組織
- (1) 研究代表者 高倉 伸幸 (TAKAKURA NOBUYUKI)  
 大阪大学・微生物病研究所・教授  
 研究者番号：80291954
  - (2) 研究分担者 上野 将也 (UENO MASAYA)  
 大阪大学・微生物病研究所・助教  
 平成17年～19年度まで  
 研究者番号：20334766
  - (3) 連携研究者 上野 将也 (UENO MASAYA)  
 大阪大学・微生物病研究所・助教  
 平成20年度  
 研究者番号：20334766