

令和元年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06838

研究課題名（和文）VEGF分子の生体イメージングによる腫瘍血管形成機構の解明

研究課題名（英文）Explication of a tumor angiogenesis mechanism through in vivo imaging of VEGF molecule

研究代表者

村松 史隆（Muramatsu, Fumitaka）

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：90803627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：VEGFシグナルを介した腫瘍血管形成の生体イメージング解析を行った。神経膠腫や肺癌などの腫瘍において、血管内皮先端細胞は腫瘍組織浸潤と随伴するように伸長し、拡大する腫瘍組織において遠心性の血管新生が認められた。先端内皮血管細胞の伸長運動は特にVEGFシグナルへの依存性が強く、低酸素シグナル系とは独立してVEGFを強く発現する特定の腫瘍集団が存在することが明らかとなった。本成果は生体内における腫瘍血管新生のシエマを新たに示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織の血管分布は不均一であるがゆえに灌流が悪く、抗がん剤送達の妨げとなっている。これは急速な腫瘍組織の成長と、それに伴い供給される新生血管のミスマッチが原因と考えられているが、どのような法則に基づき血管が分布しているのかはよくわかっていなかった。我々は神経膠腫や肺癌組織などにおける血管新生を生体イメージング解析し、腫瘍組織の血管分布変化を再評価した。その結果、腫瘍内部に存在する血管内皮細胞が、腫瘍組織内を灌流する血管を構成するように遠心性に伸長する性質を有することを明らかとした。この性質を今後さらに調べることで、腫瘍血管制御を介した、新たながん治療の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：We performed in vivo imaging analysis of a tumor vessel formation through VEGF signal. The efferent angiogenesis was observed among GL261 glioma and LLC lung cancer, in which the vascular endothelial tip cells extended along with tumor tissues infiltrating direction. These efferent elongation of vascular endothelial tip cells in tumor infiltrating rims were strongly depending on VEGF signals. There was some specific tumor cell group, which shows strong VEGF expression regardless of hypoxia signals, among tumor tissues. These outcomes invented new schema of tumor angiogenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：血管新生 生体イメージング 腫瘍 血管内皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

VEGF は血管新生に必須となる分泌型シグナルタンパク質であり、無血管領域の細胞から産生され新生血管の発芽・増殖を誘導する。古典的には VEGF 濃度勾配に従い新たな血管の伸長方向が制御され、十分に組織が酸素化されると VEGF シグナルが止まり、新生血管が安定化されると考えられている。ヒトの大半のがん組織においても、VEGF タンパク質が高発現していることから、これを標的とした抗 VEGF 療法が開発されてきた。しかしながら、様々ながん患者での臨床試験の結果、抗 VEGF 療法のみでは生存期間の改善が得られないがんも多く存在することが明らかとなり、腫瘍血管の抑制を目的とした抗血管新生療法の不十分性が問題となってきた。この結果を受け、さまざまな新規分子を標的とした治療法が提唱され始め、我々も miR-125b を利用した内皮細胞間の接着阻害をコンセプトとした、新しい抗腫瘍血管新生療法を報告した (Muramatsu et al, Oncogene, 2013)。これらは腫瘍内の栄養血管の減少を利用した「腫瘍組織の兵糧攻め」をコンセプトとしていたが、いずれも抗 VEGF 療法より明確な優位性を示せなかった。

我々は抗腫瘍血管新生療法をリアルタイムに評価することを目的として、二光子励起顕微鏡と血管特異的蛍光イメージングマウス( *apelin promoter-tdTomato BAC Tg* マウス)を用いた、神経膠腫形成に伴う血管新生の長時間ライブイメージング解析系を確立した。その結果、腫瘍内を還流させる血管は酸素、栄養を供給するために、腫瘍近傍組織より腫瘍内部へと新生血管が誘引されるのではなく、腫瘍血管としての特性を獲得した新生血管が、腫瘍の増大に伴ってある起点より生じ、浸潤する腫瘍細胞に伴走するように腫瘍外部へと形成されることが明らかとなった。さらに、様々ながん組織内での VEGF の局在を免疫染色法にて観察した結果、VEGF は一部の血管近傍の細胞外基質に蓄積しており、これまで考えられていた無血管領域からの濃度勾配は認められなかった。これらは従来の組織学的手法により得られた結果から提唱された腫瘍血管新生モデルに誤りがあることを示唆しており、新しい解析手法を通じて VEGF による腫瘍血管新生モデルを再評価する必要がある。

### 2. 研究の目的

がん組織では VEGF シグナルが適切に調節されないため、動脈-毛細血管-静脈と体系づけられた血管が構築されず血液灌流不全が生じる。VEGF シグナルにより支配される新生血管の選択過程や、増大する腫瘍組織と血管形成過程の時間・空間的变化などは不明であった。そこで本研究では以下の実験を計画し、VEGF による腫瘍血管新生モデルの再評価を目的とした。

- (1) 各種がん組織の成長過程における、腫瘍血管形成パターンの評価
- (2) 腫瘍環境における VEGF の局在の変遷と、それに応答する新生血管の定義づけ
- (3) 原始腫瘍血管内皮細胞の選定される過程の検証

### 3. 研究の方法

- (1) 各種がん組織の成長過程における、腫瘍血管形成パターンの評価

神経膠芽腫は抗 VEGF 療法感受性であるが、神経膠芽腫以外のがん組織、特に抗 VEGF 療法抵抗性の肺がん組織などで、どこから腫瘍血管が形成され、どのように血管が分布するのか時間・空間的に長期間生体イメージング解析をすることで、全く性質の異なるがん組織に共通する血管形成過程の特徴の有無を検討した。

- (2) 腫瘍環境における VEGF の局在の変遷と、それに応答する新生血管の定義づけ

VEGF-FIAsH タグノックインマウスを利用し、VEGF 分子を生体内で蛍光標識することで、VEGF 分子の局在変化と、応答する腫瘍血管の存在領域の可視化を試みた。また腫瘍細胞において VEGF 遺伝子の発現と関連する遺伝子群を網羅的に RNA-Seq 解析し、特異的なシグナル経路の有無を検討した。

- (3) 原始腫瘍血管内皮細胞が選定される過程の検証

正常血管から、腫瘍血管としての新生血管が発芽・維持される過程を解析する。特に初期腫瘍の血管新生や抗 VEGF 耐性化に関与すると考えられる腫瘍関連ミエロイド細胞、正常血管を覆う壁細胞や、アストロサイトなどの血管を構成する細胞群の運動・分布と、内皮細胞との相互作用の評価を行う。

### 4. 研究成果

- (1) 各種がん組織の成長過程における、腫瘍血管形成パターンの評価

VEGF 阻害剤に強い感受性を示す GL261 神経膠腫では、腫瘍スフェロイドを大脳皮質に同所性移植した 7 日目ごろより血管新生が開始した。GL261 腫瘍組織が拡大するにつれ、腫瘍内に存在する血管内皮細胞が経時的に増加していたが、それらの血管内皮細胞の供給経路としては、腫瘍内部にすでに存在する内皮細胞の伸長や遊走が 90%近くを占めることが明らかとなった。このことは近傍の正常組織から腫瘍の増大に伴い、連続的に血管が供給されるという古典的な腫瘍血管新生のシエマと大きく異なっていた。移植後 14 日目ごろには、腫瘍内部の血管内皮細胞は腫瘍外側に形成された、炎症刺激応答性の血管と連結した。

VEGF 阻害剤に強い抵抗性を示す LLC 肺がん細胞の腫瘍スフェロイドを大脳皮質に移植した転

移モデルでは、移植 5 日後頃より一部の正常脳血管が腫瘍血管内皮細胞として活性化する様子が観察された。GL261 神経膠腫と同様に、LLC 肺がん組織でも腫瘍内を灌流する血管内皮細胞は、腫瘍の増大に伴って、腫瘍の内部から外側へと伸長する遠心性の運動指向性を示すことが分かった。LLC 肺がん組織では、腫瘍外側の炎症刺激応答性に形成された血管に由来する内皮細胞から、一部の血管内皮先端細胞が選定され、腫瘍内部側に向かうように求心的な伸長運動を見せたが、最終的に腫瘍内を灌流した血管内皮細胞の割合としては、約 70% 近くが遠心性の血管新生によるものであることが明らかとなった。これらのことは、腫瘍組織を灌流する血管を構成する内皮細胞は、腫瘍組織の増大に伴って分裂・増殖・伸長を経て供給されるものであり、近傍の血管内皮細胞は、成長する腫瘍組織を都度灌流するに十分な内皮細胞の供給源としての貢献性に乏しいことを意味している。(図 1)

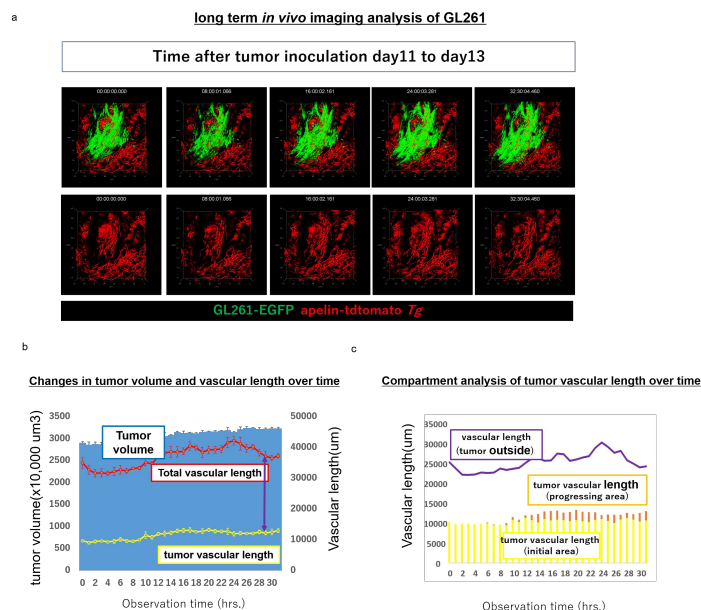


図 1

## (2) 腫瘍環境における VEGF の局在の変遷と、それに応答する新生血管の定義づけ

VEGF-FIAsH タグノックインマウスを利用し、VEGF 分子を生体内で蛍光標識することで、VEGF 分子の局在変化と、応答する腫瘍血管の存在領域の可視化を試みたが、生体における VEGF と蛍光組織の局在に著しい乖離が認められ、VEGF-FIAsH ノックインマウスを用いたイメージング解析は断念した。VEGF 刺激に支配される新生血管の変化を調べるため、VEGFA 遺伝子を過剰発現させた GL261 細胞を作製し、腫瘍血管がどのように供給されるのかをイメージング解析した。その結果、高濃度の VEGFA を産生する腫瘍細胞から 50  $\mu\text{m}$  以内の血管内皮細胞は強く活性化されるが、100  $\mu\text{m}$  以上離れた位置にある血管からは新生血管の発芽や誘引は起こらなかった。古典的な腫瘍血管新生の概念では、VEGFA の濃度勾配に従い、腫瘍血管内皮細胞が発芽し伸長することで血管が供給されるとされていたが、生体イメージング解析の結果より腫瘍組織を灌流する血管は腫瘍細胞から 50  $\mu\text{m}$  以内より発生し維持されることが明らかとなった。さらに VEGF 阻害剤であるアキシチニブを投与し、腫瘍組織のどの血管が退縮するのかをイメージング解析したところ、腫瘍外縁部に位置する血管先端内皮細胞がもっとも早くに退縮し、遅れて腫瘍内部の太い血管の抑制が認められることがわかった。これらのことから、腫瘍外縁部には腫瘍血管を強く誘導する VEGFA の産生細胞が存在することが示唆された。そこで、活発な血管新生が認められる腫瘍組織から、腫瘍細胞をセルソーターで単離し、シングルセル RNA-Seq 遺伝子発現解析を行った。その結果、腫瘍細胞は少なくとも 4 つ以上のクラスターに分類され、一部に VEGFA 発現が高い特定の細胞集団が存在することが明らかとなった。この強い VEGF を発現する細胞集団において、低酸素シグナル系の関与は認められなかった。

## (3) 原始腫瘍血管内皮細胞が選定される過程の検証

正常血管から、腫瘍血管としての新生血管が発芽・維持される過程を解析した。LLC 肺がん腫瘍スフェロイドの移植 5 日後頃より、腫瘍細胞近傍の正常血管内皮細胞がランダムに不安定化し葉状仮足の形成が認められた。しかしながら予想と反し、全ての不安定化した内皮細胞が発芽を担う先端細胞になるのではなく、一部の細静脈血管内皮細胞から、積極的に腫瘍組織内へ侵入する先端細胞が選定されていることが明らかとなった。この選定過程が内皮細胞の特性によるものか、腫瘍組織を構成するストローマ細胞群と細胞間相互作用に基づくものであるのかを検討するため、腫瘍関連ミエロイド細胞、血管壁細胞、アストロサイト細胞群と原始腫瘍血管新生選定過程との関連を生体イメージング解析した。腫瘍スフェロイド移植 5 日後では、腫瘍内にアストロサイトは存在せず、多数の腫瘍関連ミエロイド細胞の浸潤が認められた。しかし血管内皮先端細胞の発芽位置と、腫瘍関連ミエロイド細胞の組織内局在には相関は認められなかった。血管壁細胞も血管内皮先端細胞と相関せず、腫瘍移植後 14 日ごろより、腫瘍組織内を灌流する太い血管の壁に安定的に存在していた。壁細胞は腫瘍血管の安定化に寄与するが、先端細胞の選択位置との相関はみとめられなかった。このことから、原始の腫瘍血管内皮細胞の先端細胞化に至る過程には、壁細胞、腫瘍関連ミエロイド細胞、およびアストロサイトは関与に乏しく、一部の血管内皮細胞がもつ特異性に起因すると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計6件)

Kidoya H, **Muramatsu F**, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Hayashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S, Takakura N., Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. *Nat Commun*. 2019 Mar 6;10(1):1072. doi: 10.1038/s41467-019-09028-w. 査読有

Hayashi Y, Jia W, Kidoya H, **Muramatsu F**, Tsukada Y, Takakura N., Galectin-3 Inhibits Cancer Metastasis by Negatively Regulating Integrin  $\alpha 3$  Expression. *Am J Pathol*. 2019 Apr;189(4):900-910. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.12.005 査読有

Naito H, Iba T, Wakabayashi T, Tai-Nagara I, Suehiro JI, Jia W, Eino D, Sakimoto S, **Muramatsu F**, Kidoya H, Sakurai H, Satoh T, Akira S, Kubota Y, Takakura N., TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity. *Dev Cell*. 2019 Jan 28;48(2):151-166.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.12.002. 査読有

Eino D, Tsukada Y, Naito H, Kanemura Y, Iba T, Wakabayashi T, **Muramatsu F**, Kidoya H, Arita H, Kagawa N, Fujimoto Y, Takara K, Kishima H, Takakura N., LPA4-Mediated Vascular Network Formation Increases the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy against Brain Tumors., *Cancer Res*. 2018 Dec 1;78(23):6607-6620. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0498. 査読有

Wakabayashi T, Naito H, Suehiro JI, Lin Y, Kawaji H, Iba T, Kouno T, Ishikawa-Kato S, Furuno M, Takara K, **Muramatsu F**, Weizhen J, Kidoya H, Ishihara K, Hayashizaki Y, Nishida K, Yoder MC, Takakura N., CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties., *Cell Stem Cell*. 2018 Mar 1;22(3):384-397.e6. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.010. 査読有

Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y, Iba T, Wakabayashi T, **Muramatsu F**, Kidoya H, Fukuhara S, Mochizuki N, Ishii S, Kishima H, Takakura N., Lysophosphatidic Acid Receptor 4 Activation Augments Drug Delivery in Tumors by Tightening Endothelial Cell-Cell Contact., *Cell Rep*. 2017 Aug 29;20(9):2072-2086. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.080. 査読有

### 〔学会発表〕(計3件)

**村松 史隆**, 木戸屋 浩康, 塚田 陽平, 林 弓美子, 高倉 伸幸、化学療法耐性神経膠芽腫の生体イメージング解析、第26回日本血管生物医学会学術集会、2018

**Fumitaka Muramatsu**, Kidoya Hiroyasu, Yohei Tsukada, Yumiko Hayashi, Tomohiro Iba, Hisamichi Naito, Nobuyuki Takakura、In vivo imaging analysis of combined chemotherapy resistant glioblastoma multiforme、20th International Vascular Biology Meeting、2018

**村松 史隆**, 木戸屋 浩康, 林 弓美子, 塚田 陽平, 内藤 尚道, 高倉 伸幸 神経膠芽腫における腫瘍血管新生の生体イメージング解析、第25回日本血管生物医学会学術集会、2017

### 〔図書〕(計1件)

木戸屋 浩康・**村松 史隆** 他、ニューサイエンス社、月刊「細胞」、2018、674-677

### 〔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：  
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：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。