

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591113  
 研究課題名（和文） 巨核球系細胞の白血病・リンパ腫増殖機構における機能解析  
 研究課題名（英文） The role of megakaryocytic lineage cells in leukemia/lymphoma cell proliferation  
 研究代表者  
 服部 浩一（HATTORI KOICHI）  
 東京大学・医科学研究所・特任准教授  
 研究者番号：10360116

## 研究成果の概要（和文）：

研究代表者らは、本研究において、生体内の腫瘍増殖促進因子の一つであるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性が、血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンの生成によって制御されていることを明らかにした。また代表者らは、マウス実験により、プラスミン阻害剤が、MMP活性制御を介して、一部の白血病・リンパ腫の増殖を抑制し得ることを明らかにし、凝固・線溶系の亢進と白血病・リンパ腫増殖との関連性、そしてこれらの疾患に対する、線溶系因子を新たな分子標的とした治療法の可能性を示唆した。

## 研究成果の概要（英文）：

The main fibrinolytic enzyme, plasmin, can activate matrix metalloproteinases (MMPs) which has been linked to various malignancies. Here we provide the evidence that blockade of Plg reduces leukemia-lymphoma growth by inhibiting MMP activity. The data presented in this study demonstrate a previously undescribed role of plasmin in lymphoproliferative disorders and provide strong evidence that specific blockade of Plg represents a promising approach for the regulation of leukemia-lymphoma growth.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学科

研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：癌、酵素、細胞・組織、生体分子、凝固・線溶

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまでに、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)をはじめケモカイン

stromal cell-derived factor-1(SDF-1、CXCL12)あるいは血管内皮増殖因子(VEGF)、胎盤成長因子(PlGF)等の血管新生因子等の

細胞動員因子群が、主に亜鉛を活性中心に有するマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)というプロテアーゼの一群、とりわけ血管基底膜を基質とする MMP-9 の活性化を通じて、造血因子 Kit-ligand(stem cell factor)の細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)が誘導され、骨髄由来細胞の末梢組織への動員、そして骨髄細胞の再生を促進する機序を解明し、報告した(Heissig B, Hattori K et al. Cell. 109:625-637. 2002)。1994年にクローニングされたトロンボポイエチン(TPO)は、生体内外を問わず巨核球増殖、血小板産生を刺激する増殖因子として広く認知されており、当時これに対する臨床治験が進行中の造血因子であった(Kaushansky K. N Engl J Med. 339:746-754, 1998)。生体内の血液凝固の中核を担う巨核球系細胞の分化、そして血小板産生を促進するサイトカインとしては TPO の他、IL-6、IL-11、leukemia inhibitory factor 等が知られているが、各種遺伝子欠損マウスの実験によってその多くが TPO/c-mpl シグナルを介したものであることが証明されている(Gainsfold T. et al. Blood. 95:528-534, 2000)。これに対し代表者らは2003年から2004年の基盤研究C「血小板増多に伴う腫瘍増殖機序の解析(血管新生スイッチの探索)」の遂行過程において、TPO及びその受容体である c-mpl 遺伝子欠損マウスを使用することにより、SDF-1、fibroblast growth factor-4(FGF-4)等の因子が TPO/c-mpl シグナルを介することなく生体中で骨髄内巨核球の成熟分化、血小板増加を可能にすること、また骨髄内の「血管ニッチ」と呼ばれる領域で巨核球が成熟化し、さらに血小板産生過程における VE-カドヘリンを介した骨髄内血管との接着の重要性を示唆した(Avecilla ST, Hattori K. et al. Nat Med. 10: 64-71. 2004)。SDF-1、FGF-4の両因子はいずれも血管内皮細胞の遊走、血管構築を促進する血管新生誘導因子として機能することが報告されており(Folkman J. et al. Science 235: 442-447. 1987, Yamaguchi J. et al. Circulation 107: 1322-1328. 2003)、これらの研究成果からも、申請者らの研究の主題である血小板産生と血管新生との間に何らかの相互作用が存在することは推測されていた。

TPO が血管の主要な構成細胞である血管内皮細胞の遊走を刺激し、マトリジェル内に

おいて血管新生を誘導することについては生体内外の実験系で報告されており(Brizzi MF et al. Circ Res. 84: 787-796. 1999)、さらに TPO が血管新生因子の一つである VEGF の造血系細胞からの産生を刺激することについても別のグループから生体外の実験系で示されていた(Bobik R et al. FEBS letters. 423: 10-14. 1998)。2006年、代表者らは、MMP-9の存在下に血小板が SDF-1 の分泌を介して生理的血管新生を誘導すること、また VEGF 受容体-1(VEGFR1)陽性細胞群が産生する VEGF によってヘマンジオサイト(CXCR4 陽性 VEGFR1 陽性細胞)の末梢組織への動員を通じて、血小板が血管新生の基盤となる「血管新生ニッチ」の形成に関与すること、これを介して虚血壊死組織の再生が促進されることを明らかにした(Jin DK et al. Nature Med. 12: 557-567. 2006)。

また悪性腫瘍に特化した線維芽細胞(carcinoma associated fibroblast)が SDF-1 を産生することにより、血管内皮を含む組織前駆細胞を腫瘍組織中へと動員し、腫瘍増殖に伴う病的な血管新生が促進されるとの報告もなされた(Orimo A et al. Cell 121: 335-348. 2005)。これらの報告は、組織中の SDF-1 をはじめとする細胞動員因子によって末梢組織へと動員され、組織中では SDF-1 の供給源として機能する血小板の病的血管新生への関与を支持する論拠となるものである。

さらに最近、代表者らは MMP の活性化—潜在型酵素 ProMMP から MMP への変換が、代表的な血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミノゲン(Plg)の活性化—プラスミンの生成によって制御されていることを明らかにし、血小板を含む骨髄由来細胞の動員あるいは血管新生を介した骨髄組織再生が Plg の活性化によって促進されることを明らかにした(Heissig B et al. Cell Stem Cell 1: 658-670, 2007)。

以上の如く、代表者らのこれまでの研究成果により、損傷治癒あるいは虚血壊死組織の再生及び生理的血管新生の局面における巨核球系細胞の活性化、血小板増加の血管新生における重要性は確認されつつあるが、白血病・リンパ腫をはじめとする血液系腫瘍性疾患、悪性腫瘍いわゆるがんに伴う病的血管新生と血小板増加に代表される血液凝固系の亢進、そして凝固・線溶系と腫瘍増殖との関

連性は解明が殆ど進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

多くの白血病をはじめとする腫瘍性疾患はその重症化に伴い、生体内で異常ないしは病的血管新生と組織因子、血小板をはじめとする血球の産生亢進や凝固因子活性を刺激することによる血栓傾向を誘引することは周知の如くであるが、その発生機序については不明な点が多い。代表者らは、虚血壊死組織へと誘導された骨髄由来の好中球、マスト細胞等からVEGFが供給されること、さらには虚血組織へと同様に動員された骨髄由来のヘマンジオサイトを分子生物学的HUBとした「血管新生ニッチ(虚血ニッチ)」が形成され、他の骨髄由来細胞との相互作用を介して組織再生が促進されることについても報告しており、生理的血管新生機構における骨髄由来細胞の介在は確実視されつつある。代表者らは、本研究期間内に腫瘍・がん増殖過程における異常ないしは病的血管新生における骨髄由来細胞、特に血小板の機能を明らかにすること、そしてこれを標的とした新規治療法の開発を目指している。近年、癌増殖過程における異常ないしは病的血管新生がVEGF等の血管新生因子によって制御されているとの報告は枚挙に暇がなく、加えてSDF-1等のケモカインが各種悪性腫瘍の転移浸潤を促進するとの仮説も提唱されている。本研究は、巨核球の成熟分化によって産生される血小板が血管新生因子あるいはケモカインの供給源として機能し、異常ないしは病的血管新生を介して白血病、リンパ腫の病態形成に寄与するとの研究代表者らの仮説に基づくもので、前述の近年の他施設での実験結果とも整合性を示しているといえよう。

本研究期間内目標の関連細目として、生体内における血小板増加と病的血管新生との関連性の解明、白血病、リンパ腫の進展と骨髄由来の非白血病細胞との関連性の精査、異常な血管新生に伴う各種病態形成に伴う凝固線溶系亢進の生理学的意義の解明、そしてこれらを制御することによる新治療開発までをその目的の範疇と定める。

## 3. 研究の方法

(1) 各種マウス白血病・リンパ腫細胞、B6RV2(T細胞性リンパ腫)、RMA(T細胞性リンパ腫)、MBL-2 (T細胞性リンパ腫)、FBL-3(T

細胞性リンパ腫)、EL-4(白血病)等を $2 \times 10^7$ 個ずつ血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミノゲン(Plg)あるいは各種マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の遺伝子欠損マウス及びこれらの野生型の皮下または静脈内へ移植する。

(2)(1)の処置後、2-3日間隔でマウス血漿を採取し、マウス血漿中の血管内皮増殖因子(VEGF)、placenta growth factor (PlGF)あるいは造血因子 Kit ligand、ケモカイン SDF-1(CXCL12)、MMP-9、ProMMP-9、MMP-2、Plg activator inhibitor-1 (PAI-1)、tissue Plg activator (tPA)レベルを免疫酵素抗体法、ELISA法、ザイモグラフィーないしはウェスタンブロットで測定、検出する。

(3)(1)の処置後、腫瘍発育の状況と末梢血球数を2-3日毎に記録し、1週間毎に、骨髄等のマウス各種臓器及び腫瘍を摘出し、これらの病理組織所見を詳細に観察する。さらに各種蛋白分解酵素群、von Willebrand 因子、VE-カドヘリン、VEGFR2等の血管内皮特異抗原、各種血球系マーカーあるいは接着分子の発現等について免疫学的特殊染色を施行し、各種臓器組織中の血管新生、腫瘍細胞あるいはその周囲の集簇細胞の性状、骨髄中の巨核球産生の状況、骨髄内外のMMPあるいは線溶系因子活性等について評価する。血管新生因子については *in situ hybridization* を施行し、その局在性についても精査する。加えてマウス末梢血中の血球数及び単核球の各種コロニー形成能、VEGFRあるいは接着分子、ケモカイン受容体等の細胞表面マーカー解析を行い、これらと腫瘍増殖との関連性について調べる。

## 4. 研究成果

本研究は、生体内の血小板増加、凝固・線維素溶解系(線溶系)亢進と病的血管新生との関連性、白血病・リンパ腫細胞の生体内増殖における凝固・線溶系亢進の生理学的意義の解明を目的としている。研究代表者らは、これまでの研究で、生体内腫瘍増殖の促進因子と考えられているマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化—潜在型酵素 pro-MMP から活性型 MMP への変換が、線溶系因子プラスミノゲンの活性化—プラスミンの生成によって制御されていることを明らかにした。昨年度までの研究で、代表者らは、マウス生体に移植された白血病・リ

リンパ腫の増殖過程において、生体各所で MMP の活性化が起り、これらがストローマ細胞からの各種の細胞増殖因子の細胞外ドメイン分泌を促進すること、また MMP の活性化に伴って組織中へと動員された血小板を含む骨髄由来細胞が、血管新生因子の組織内供給源として機能していることを確かめた。これらを基礎とした今年度の研究で、代表者らは、線溶系・プラスミン阻害剤の投与が、一部の白血病・リンパ腫の増殖を抑制し得ることを明らかにした。このことは、凝固・線溶系の亢進と白血病・リンパ腫の生体内増殖との強い関連性を示唆するものであり、いわば本研究課題の目的でもあった「白血病・リンパ腫細胞の生体内増殖における凝固・線溶系の亢進の生理学的意義」を具体的に証明したものと言える。また本研究成果として、欧米で治験が暗礁に乗り上げている MMP 阻害剤に対して、その上流の線溶系を阻害することによって一部の白血病・リンパ腫の増殖抑制が証明されたことから、今後の白血病・リンパ腫の治療法開発において、線溶系因子群が、MMP 阻害剤の代替として、新たな分子標的の可能性を示唆したものと言える。

#### 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 10 件)

1. Piao JH, Hasegawa M, Heissig B, Hattori K, Takeda K, Iwakura Y, Okumura K, Inohara N, Nakano H: Tumor necrosis receptor-associated factor (Traf)2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease, *J Biol Chem*, 2011 (in press) (査読有)
2. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Rosenkvist J, Gritli I, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K: Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration *Blood*, 115: 4302-4312 2010. (査読有)
3. Heissig B, Nishida C, Tashiro Y, Sato Y, Ishihara M, Ohki M, Hattori K. Role of Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 for tissue regeneration. *Histology & Histopathology*, 25.765-770.2010 (査読有)
4. Aoki N., Yokoyama R., Asai N., Ohki M., Ohki Y., Kusubata K., Heissig B., Hattori K., Nakagawa Y., and Matsuda T. Adipocyte-Derived Microvesicles Are Associated with Multiple Angiogenic Factors and Induce Angiogenesis *in Vivo* and *in Vitro*. *Endocrinology* 151: 2567-2576,2010(査読有)
5. 服部浩一、西田知恵美: 血液線維素溶解系因子による骨髄細胞の動態制御 中外医学社 *Annual Review*2011 血液 187-195
6. 服部浩一、佐藤亜紀 : 骨髄異形成と造血微小環境の異常 *Dysfunction of bone marrow microenvironment in myelodysplasia* 血液・腫瘍科 科学評論社 61:660-666, 2010
7. 服部浩一、西田知恵美 : 線維素溶解系による造血幹細胞ニッチの制御機構. 日本血栓止血学会雑誌 21 : 27-31, 2010
8. 服部浩一、田代良彦 : 造血幹細胞ニッチにおける MMP-9 の役割 生化学 第 82 巻 第 10 号 979-984 2010
9. Sato Y, Ohki Y, Akiyama H, Rosenkvist J, Gritli I, Okumura K, Ogawa H, Heissig B, Hattori K, Ohsaka A : Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 reduces neutrophil accumulation during G-CSF-induced neoangiogenesis. *Cytometry Res* 19: 53-62, 2009 (査読有)
10. Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H : Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from embryonic

stem cells. J Exp Med 205:1917-1927,  
2008 (査読有)

[学会発表] (計 28 件)

1. Koichi Hattori: Fibrinolytic system regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration..3<sup>rd</sup> Symposium of IMSUT & RCAST Global COE on New Horizon of Stem Cell Biology and Immunotherapy 東京大学医科学研究所 東京都
2. 西田知恵美、楠畑かおり、田代良彦、清水元治、中内啓光、Heissig Beate、服部浩一、生体内細胞分化制御因子としての MT1-MMP の機能解析 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2 京王プラザホテル.東京
3. 楠畑かおり、小泉摩希子、Heissig Beate、服部浩一：線維素溶解系の活性化による骨髄内間葉系幹細胞の増殖 2011. 3. 1 -2 第 10 回日本再生医療学会総会、京王プラザホテル. 東京
4. Yurai Okaji, Chiemi Nishida, Koichi Hattori, Beate Heissig:線溶系因子プラスミンによる赤血球造血制御機構の解明. 2011. 2. 3-4 ワークショップ「個体レベルのがん研究の魅力：培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス」 琵琶湖ホテル. 大津
5. Chiemi Nishida, Kaori Kusubata, Motoharu Seiki, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori, Beate Heissig : MT1-MMP plays a critical role in the cell growth and maturation. 2011. 2. 3-4 ワークショップ「個体レベルのがん研究の魅力：培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス」 琵琶湖ホテル. 大津
6. Nishida Chiemi, Heissig Beate, Tashiro Yoshihiko, Seiki Motoharu, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori MT1-MMP Plays a Critical Role In the Modulation of Hematopoiesis. December 4-7, 2010, 52nd ASH Annual Meeting; Orange County Convention Center, Orlando, FL
7. Okaji Yurai, Nishida Chiemi, Gritli Ismael, Tashiro Yoshihiko, Ohki Makiko, Hattori Koichi, Heissig Beate. :Plasminogen Deficiency Impairs Erythropoietic Recovery Capacity in Male C57BL/6J Mice through Testosterone Defect. December 4-7, 2010. 52nd ASH Annual Meeting; Orange County Convention Center, Orlando, FL
8. Chiemi Nishida, Heissig, Motoharu Seiki, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori MT1-MMP is a critical modulator of normal hematopoiesis. 第 72 回日本血液学会 2010. 9. 24-26 パシフィコ横浜. 横浜
9. Ismael Gritli, Chiemi Nishida, Makoto Ishihara, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori, Beate Heissig. Epidermal growth factor-like domain 7, a vascular niche factor, regulates myelopoiesis. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Pacifico Yokohama 2010.9.24
10. 石原誠人、ベアテハイジッヒ、田代良彦、西田知恵美、小泉摩希子、和中敬子、津田裕子、岡田芳男、八木田秀雄、奥村康、中内啓光、服部浩一：リンパ腫増殖における線維素溶解系の役割と新規治療法の開発第72回 日本血液学会 2010. 9. 24-26 パシフィコ横浜. 横浜
11. 田代良彦、石原誠人、西田知恵美、Ismail Gritli(小泉摩季子、小見山博光、坂本一博、Beate Heissig、宮田敏男、中内啓光、服部浩一：生体内組織再生における線溶系因子PAI-1の機能解明 第72回日本血液学会 2010. 9. 24-26 パシフィコ横浜. 横浜
12. 石原誠人、山本玲、八木田 秀雄、奥村康、ハイジッヒベアテ、服部浩一：癌増殖における線維素溶解系因子の役割と新規治療法の開発 第69回日本癌学会学術集会 2010. 9. 24 .大阪国際会議場. 大阪
13. 服部浩一：癌間質・微小環境形成における骨髄由来細胞動員の意義. 第 51 回日本臨床細胞学会、指名講演 2010. 5. 31. パシフィコ横浜 横浜
14. 服部浩一：Contribution of the fibrinolytic system to hematopoiesis and angiogenesis during tissue regeneration. 第 33 回日本血栓止血学

- 会学術集会. 招待講演、2010. 4. 20 城山観光ホテル. 鹿児島
15. 服部浩一 : プロテアーゼ活性化を起点とした癌と骨髄とのクロストーク.  
2009.11.20 : 大阪・千里 (第 12 回癌と骨病変研究会招待講演)
  16. Ishihara M, Heissig B, Tashiro Y, Tsuda Y, Wanaka K, Okada Y, Hattori K: The Role of fibrinolytic system in lymphoma progression; implication for targets. The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2009 : Kyoto (第 71 回日本血液学会総会ワークショップ発表)2009.10.23.京都
  17. Hattori K, Ohki M, Ohki Y, Nishida C, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Nakauchi H, Heissig B: tPA regulates bone marrow derived cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2009 .10.23: Kyoto (第 71 回日本血液学会総会プレナリーセッション発表)
  18. 西田知恵美, Heissig Beate, 清木元治, 中内啓光, 服部浩一 : 生体内造血制御機構における MT1-MMP の機能解析.  
2009 .10.23: 京都 (第 71 回日本血液学会総会発表)
  19. Resenkvist J, Ishihara M, Ismael Gritli, Nishida C, Heissig Beate, Hattori K: Fibrinolytic system plays a key role in tumor growth and apoptosis. 2009 6.1: Tokyo (平成 21 年度医科学研究所研究成果発表会)
  20. 服部浩一, 石原誠人, Heissig B : 癌微小環境形成における骨髄由来細胞の動員機構. 2009.9.18 : 東京 (第 10 回運動器科学研究会招待講演)
  21. 西田知恵美, 新谷大悟, 清木元治, Heissig Beate, 服部浩一 : 生体内造血制御機構における MT1-MMP の重要性.  
2009.3.5 : 東京 (第 8 回日本再生医療学会総会口演)
  22. 大木摩希子, 大木勇一, 秋山晴代, Heissig Beate, 服部浩一 : 末梢血幹細胞動員における線溶系因子の機能解析.  
2009 .3.5: 東京 (第 8 回日本再生医療学会総会発表)
  23. 服部浩一 : 骨髄由来細胞動員を介した組織再生制御機構. 2008 .11.15: 神奈川 (第 59 回日本電気泳動学会シンポジウム指名講演)
  24. 服部浩一 : 血液線維素溶解系と骨髄細胞動態との相関. 2008 : 東京 (第 14 回血液科学セミナー招待講演)
  25. 服部浩一 : 骨髄由来細胞動員による腫瘍血管新生制御機構. 2008 .10.28: 名古屋 (第 67 回日本癌学会学術総会指名講演)
  26. 服部浩一 : 骨髄由来細胞によるがん関連ニッチ形成機構. 2008 10.30: 大阪 (第 26 回日本骨代謝学会学術集会ミニシンポジウム指名講演)
  27. 西田知恵美, 新谷大悟, 清木元治, Heissig Beate, 服部浩一 : 生体内造血制御機構における MT1-MMP の重要性.  
2008 .10.10: 京都第 70 回日本血液学会総会
  28. 石原誠人, Heissig Beate, 服部浩一 : 癌増殖における線維素溶解系因子の役割と新規治療法の開発. 2008 .10.10: 京都第 70 回日本血液学会総会・優秀ポスター賞  
[その他]  
ホームページ等  
<http://stemcell-u-tokyo.org/sc-re/>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
服部 浩一 (HATTORI KOICHI)  
東京大学・医科学研究所・特任准教授  
研究者番号 : 10360116