

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22590851

研究課題名（和文） 肺動脈原発血管内肉腫の発症機序解明および造血幹細胞分離・臨床応用への可能性

研究課題名（英文） Investigations on development of pulmonary arterial intimal sarcoma and identification and isolation of hematopoietic stem cells

研究代表者

坂尾 誠一郎 (SAKAO SEIICHIRO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80431740

研究成果の概要（和文）：慢性血栓塞栓性肺高血圧症における血栓内膜摘出術検体より分離した肉腫様細胞は、肺動脈原発血管内肉腫（intimal sarcoma）に非常に近い特徴を有することが示された。また肉腫様細胞では matrix metalloproteinase (MMPs) 遺伝子発現が著名に上昇していたため、抑制実験として MMPs 阻害薬の batimastat の投与実験を施行した。その結果 in vitro、in vivo 共に腫瘍細胞増殖抑制効果を示し、以上から batimastat による intimal sarcoma への臨床応用の可能性が示唆された。しかし、当初の目的である摘出血栓からの造血幹細胞分離・臨床応用に関してはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：We have investigated sarcoma-like cells (SCLs) derived from endarterectomized tissue from chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). The characteristic features of SCLs showed that these cells appeared to be pulmonary arterial intimal sarcoma. Because of the increased expression of mRNAs of matrix metalloproteinase (MMPs), anti-tumor effects of MMPs inhibitors (batimastat) were examined. Batimastat inhibited cell proliferation, invasion, migration, and tube-formation of SCLs. Moreover, batimastat inhibited the growth of subcutaneous tumor and weight loss of the mice. These results indicate that MMPs inhibitors seem to be effective against some types of intimal sarcoma. Previous study suggested that SCLs might include some kinds of hematopoietic stem cells, but isolation of these cells would be future directions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌 肺動脈原発血管内肉腫

1. 研究開始当初の背景

我々は慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) の新生内膜より筋線維芽様細胞を分離し、1 症例より肉腫様細胞 (sarcoma like cell :

SCL) を分離した。この肉腫様細胞は免疫抑制マウスに腫瘍を形成し、それらの腫瘍は病理学的に血球系の細胞を有し、腫瘍由来の新生血管系を有する可能性を示した。

2. 研究の目的

この研究の目的は、同肉腫様細胞をその起源である筋線維芽様細胞や上皮系癌細胞と比較し、悪性細胞発症機序解明と共に、同腫瘍細胞に含まれる血球系細胞を再生医療に応用しようとするものである。

3. 研究の方法

まず、SCLの悪性細胞としての特徴を確認した。まず、細胞周期のS期に特異的にDNAに取り込まれる5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を用い細胞の増殖能を確認した。また、軟寒天培地でのコロニー形成能を見ることにより足場非依存性の有無も確認した。さらに、BD BioCoat™ FluoroBlok™ Invasion assay 癌浸潤アッセイを用い同細胞の浸潤能を検討した。また細胞の特性を検討するため免疫染色、PCRアレイ、Western blot法を施行した。また、細胞の管腔形成能を確認するためBDマトリゲルを用いた三次元培養を行った。さらにSCIDマウスに対しSCLの皮下注射および尾静脈注射を行い、腫瘍形成の経時変化及び病理学的検討を行った。

また、実験結果から同腫瘍発症の過程でmatrixmetalloproteinase (MMPs)の関与が疑われたため、MMPs阻害薬batimastatを用いた検討を加えた。batimastatを用いたin vitroで各種検討、及びSCIDマウスに形成させたSCL皮下腫瘍に対するbatimastatの効果についての検討を行った。

さらに、腫瘍内での骨髄単球系細胞や造血前駆細胞の存在を再確認するために、ヒト特異性のある骨髄単球系細胞マーカー (CD14)、造血前駆細胞マーカー (CD31) 抗体、ヘモグロビン抗体により免疫染色を施行した。そして、再生医療への応用のため上記抗体にて同細胞をmicro beads法やflowcytometry法により分離した。

4. 研究成果

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) における血栓内膜摘出術検体より分離した肉腫様細胞は、高増殖能を有し、足場非依存性であり、癌細胞に準じる浸潤能を有していた。また、筋線維芽細胞に比し悪性疾患特異的遺伝

図1 PCR arrayによる接着因子の検討

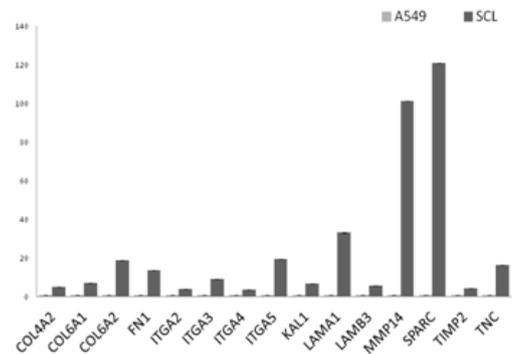


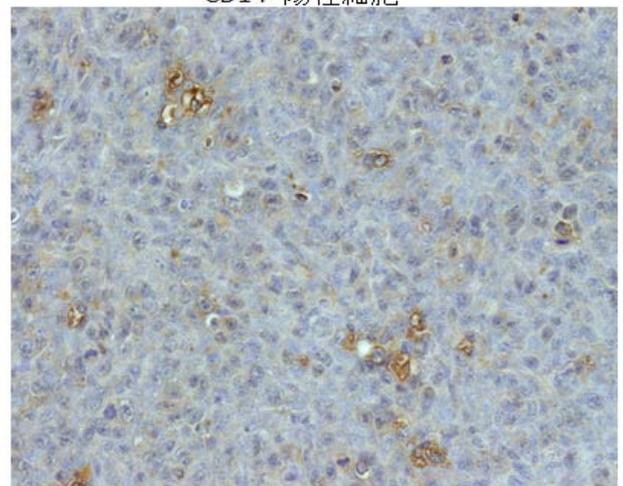
図2

SCL MMP14免疫染色



図3

CD14 陽性細胞



子が著名に上昇し、接着因子関連遺伝子が顕著に低下していた。中でも特にmatrixmetalloproteinase (MMPs) 遺伝子の発現上昇が顕著であった。実際、上皮系の肺癌細胞 (A549) に比べても、PCRアレイ (図

1)、免疫染色(図2)にてMMP-14の発現上昇を認めた。

また同肉腫様細胞を免疫抑制マウスへ尾静脈投与すると、肺動脈壁に生着し肺動脈内膜に沿って進展することが示された。しかし明らかな多臓器への遠隔転移は確認されなかった。これに対し、肺癌細胞であるA549では血管内腔への進展は見られず、臓器実質内への浸潤がみられた。このことから、SCLは明らかに、上皮系の癌細胞とは腫瘍進展形態が異なる事が示唆された(Jujo T, Sakao S et al. Int J Oncol. 2012 41:701-11.)。

さらにマトリゲルを用いた三次元培養にて、同細胞が管腔形成能を有することが確認された。つまり同細胞は宿主によらず自らの細胞により、血管新生能を有する可能性を示唆した。また免疫染色では vimentin 陽性、desmin 陰性であった。以上の結果より同細胞は間葉系の肉腫細胞、特に肺動脈への進展形式より肺動脈原発血管内肉腫(intimal sarcoma)に非常に近い特徴を有すると考えられた。

次に、同細胞ではMMPsの発現上昇が見られたため、抑制実験としてMMPs阻害薬のbatimastat(Merck Mikkipore, US #196440)の投与実験を施行した。in vitroでの検討では増殖能、浸潤能、三次元培養での管腔形成などが有意に抑制された。さらにin vivoでの検討では、control群と比較しbatimastat投与群ではSCL皮下腫瘍のサイズ、腫瘍重量が有意に低下した。現在intimal sarcomaに対して有効な治療薬は存在しないが、以上の結果よりbatimastatがintimal sarcomaに対する新規治療薬になる可能性が示唆された。

上述したように、SCLは腫瘍由来の新生血管形成能を有するのみでなく、CD14陽性の骨髄単球系細胞と思われる細胞も混在していた(図3)。このことは同細胞が血球源基由来の悪性細胞である可能性を示唆し、造血前駆細胞の分離の可能性を示唆した。これにより骨髄系の造血前駆細胞などに発現するCD31(Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1:PECAM-1)を用いた免疫染色を施行したところ、多数の陽性細胞が確認された(図4)。しかも、ヒト特異的ヘモグロビン抗体陽性の細胞も多数確認された(図5)。つまり同細胞が赤血球系の前駆細胞を含む可能性を示唆した。しかし、CD14やCD31抗体によるmicro beads法やflowcytometry法によりこれらの細胞を分離すると、分離後の細胞は継代中にその増殖能が著しく低下した。そのためそれらの細胞から造血前駆細胞を分離し増殖させることは、現状では困難な状況である。

図4

CD31 陽性細胞

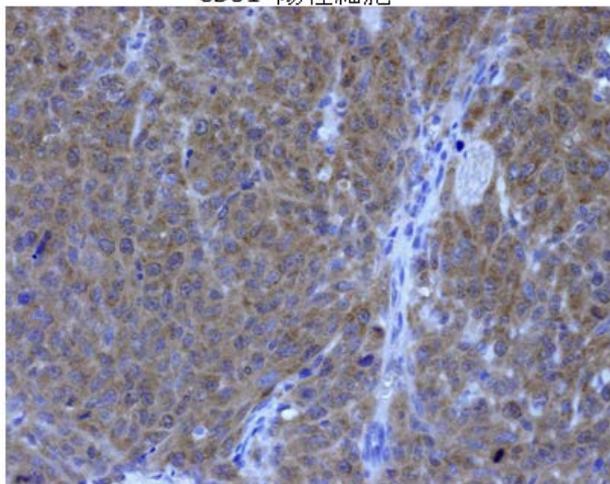
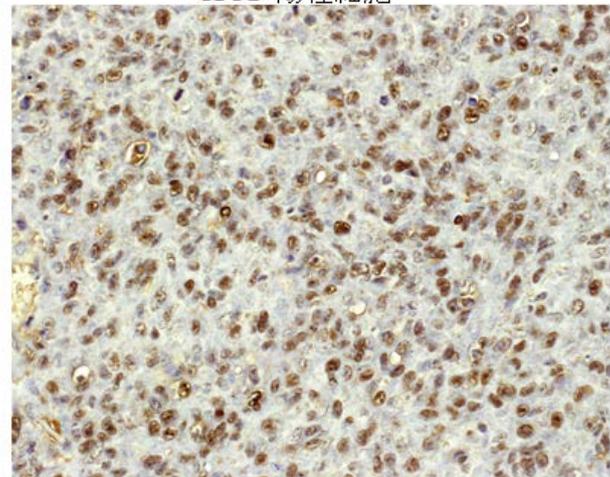


図5

CD31 陽性細胞



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6件)

1. Nishimura R, Tanabe N, Sugiura T, Shigeta A, Jujo T, Sekine A, Sakao S, Kasahara Y, Tatsumi K. Improved Survival in Medically Treated Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. Circ J. 2013 Apr 25. [Epub ahead of print] doi:10.1253/circj.CJ-12-1391
2. Sakao S, Tatsumi K. Crosstalk between endothelial cell and thrombus in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: perspective. HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY. 2013

Feb;28(2):185-93.

http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_28/28_2/28_2_185.htm

3. Sakao S, Tatsumi K. Molecular mechanisms of lung-specific toxicity induced by epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncology Letters*. 2012 Nov;4(5):865-867 doi: 10.3892/ol.2012.872
4. Sugiura T, Tanabe N, Matsuura Y, Shigeta A, Kawata N, Jujo T, Yanagawa N, Sakao S, Kasahara Y, Tatsumi K. Role of 320-Slice computed tomography in the diagnostic workup of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 2012 Oct 22. [Epub ahead of print] doi: 10.1378/chest.12-0407.
5. Sakao S, Tanabe N, Kasahara Y, Tatsumi K. Survival of Japanese Patients with Pulmonary Arterial Hypertension after the Introduction of Endothelin Receptor Antagonists and/or Phosphodiesterase Type-5 Inhibitors. *Intern Med*. 2012;51(19):2721-6. doi: 10.2169/internalmedicine.51.8162
6. Jujo T, Sakao S, Oide T, Tatsumi K. Metastatic gastric cancer from squamous cell lung carcinoma. *Intern Med*. 2012;51(14):1947-8. Epub 2012 Jul 15. doi: 10.2169/internalmedicine.51.7597
7. Jujo T, Sakao S, Kantake M, Maruoka M, Tanabe N, Kasahara Y, Kurosaki K, Masuda M, Harigaya K, Tatsumi K. Characterization of sarcoma-like cells derived from endarterectomized tissues from patients with CTEPH and establishment of a mouse model of pulmonary artery intimal sarcoma. *Int J Oncol*. 2012 41:701-11. doi: 10.3892/ijo.2012.1493.

[学会発表] (計 5 件)

1. Sakao S. Pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (招待講演) 2012 年 12 月 14 日～2012 年 12 月 16 日 Hong Kong, China
2. Sakao S. Endothelial-like cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): crosstalk with myofibroblast-like cells. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 English

Mini-Symposium 2012 年 04 月 20 日～2012 年 04 月 22 日 神戸

3. 坂尾誠一郎 COPD における血流障害: 肺高血圧症. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 招待講演 (招待講演) 2012 年 04 月 20 日～2012 年 04 月 22 日 神戸
4. Sugiura T, Tanabe N, Kawata N, Matsuura Y, Yanagawa N, Kasai H, Kasahara Y, Sakao S, Tatsumi K. Right ventricle volume index and right ventricle to left ventricular volume ratio by electrocardiogram-gated 320 slice CT is a predictor of right ventricular pressure load in pulmonary hypertension. American Thoracic Society 2011 International Conference 2012 年 05 月 19 日～2012 年 05 月 23 日 San Francisco, USA
5. Sekine A, Tanabe N, Sakao S, Nishimura R, Terada J, Sugiura T, Kasahara Y, Tatsumi K. Mixed venous oxygen tension affects the prognosis on pulmonary hypertension even in recent Era. American Thoracic Society 2011 International Conference 2012 年 05 月 19 日～2012 年 05 月 23 日 San Francisco, USA

[図書] (計 2 件)

1. 坂尾誠一郎 医学書院 今日の治療指針 2013 2013 年 1955 ページ
2. 坂尾誠一郎 メディカルレビュー社 Cardiac practice 2013 年 95 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

特記なし

○取得状況 (計 0 件)

特記なし

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂尾 誠一郎 (SAKAO SEIICHIRO)
千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80431740

(2)研究分担者

巽 浩一郎 (TATSUMI KOICHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10207061

笠原 靖紀 (KASAHARA YASUNORI)
千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60343092