

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461654

研究課題名(和文)分泌蛋白質MFG-E8による機能制御の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the regulation by secreted protein MFG-E8, and the development of new therapy

研究代表者

茂木 精一郎(Motegi, Sei-ichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20420185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、創傷治癒、腫瘍血管新生、線維化における分泌蛋白質MFG-E8の役割について研究を行った。本研究の成果によって、MFG-E8が血管新生を亢進させて、マクロファージを制御し、創傷治癒を促進させることや、腫瘍の成長を促進させること、そして、線維化を抑制することを見出した。今後、さらにMFG-E8が創傷治癒、腫瘍血管新生、線維化を制御する機序を解明することができれば、難治性潰瘍、悪性腫瘍、強皮症の病態を理解する一助となり、今後、新たな治療法の開発に大きく貢献できることが予想される

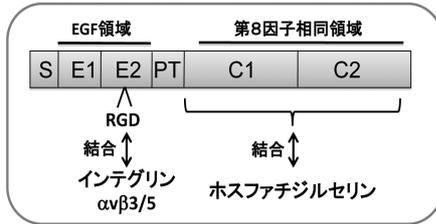
研究成果の概要(英文)：We studied the role of secreted protein MFG-E8 in wound healing, tumor angiogenesis, fibrosis. Based on the results of this study, we found that MFG-E8 enhances angiogenesis, regulates macrophages, resulting in the acceleration of wound healing, promoting tumor growth, and inhibition of fibrosis. If we can further elucidate the mechanism by which MFG-E8 regulates wound healing, tumor angiogenesis and fibrosis, it will help to understand the pathogenesis of refractory ulcer, malignant tumor, scleroderma, and it can be expected to contribute greatly to the development of new therapy.

研究分野：皮膚科学

キーワード：創傷治癒 悪性黒色腫 強皮症

1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質 MFG-E8 は、N 末端に 2 つの上皮成長因子様ドメインを持ち、インテグリンとの結合に重要な RGD 配列を含む。MFG-E8 は RGD 配列を介して、インテグリン  $\alpha\beta 3/5$  と結合する。



MFG-E8 は、アポトーシス細胞貪食の制御やコラーゲン代謝能の制御など様々な機能の制御に関わっている。申請者は、マウス悪性黒色腫内において、ペリサイトが MFG-E8 の主要な産生細胞であること、そして分泌された MFG-E8 が血管周囲に局在し、腫瘍血管新生を促進させることを明らかにした (Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology 31: 2024-2034, 2011)。さらに、MFG-E8 によるペリサイトを介した血管新生制御のメカニズムを明らかにした (Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology 31: 2653-2664, 2011)。MFG-E8 はペリサイト様細胞 10T1/2 cell より産生、分泌され、細胞膜上のインテグリン  $\alpha V$  と結合する。そして、PDGF 刺激によりリン酸化された PDGFR $\beta$  は FAK を介して、インテグリン  $\alpha V$  と複合体を形成する。そして、PDGFR $\beta$  のユビキチン化が抑制されることにより、PDGFR $\beta$  シグナルが増強することを明らかにした。

現在、主に以下の 3 つの分野における MFG-E8 の機能解析を行っている。まず 1 つ目として、皮膚創傷治癒の制御に MFG-E8 が関与することを明らかにした。マウスとヒト皮膚において、MFG-E8 が血管周囲、特にペリサイトと共局在することを明らかにした。MFG-E8 は皮膚欠損を作製後 4 日目より発現が増加し、7 日目で肉芽組織中にびまん性に発現が見られ、特に血管周囲に多く発現が見られた。また、MFG-E8 KO マウスの創傷治癒は WT と比較して遷延していた。さらに、KO マウス創傷部の血管新生量が抑制されていた。これらの結果より、MFG-E8 は皮膚創傷治癒を促進させることが示唆された。また、創傷治癒における新しい制御機構の解明につながり、今後、新しい治療法、医薬品の開発、臨床応用に貢献できることが期待される。

MFG-E8 は分泌蛋白質であり、すでに臨床応用されている塩基性線維芽細胞増殖因子 bFGF などの外用剤と併用して使用することが可能である。これまでに MFG-E8 が PDGF シグナルを増強させることを見出している (ATVB 2011) が、PDGF 等の成長因子の受容体は構造が共通しているため、bFGF シグナルも増強することが予想される。よって、**本研究では bFGF を含めた成長因子と MFG-E8 の併用による創傷治癒への臨床効果についてマウス創傷治癒モデルを用いて明らかに**

していく。

2 つ目として、我々は、MFG-E8 と間葉系幹細胞の機能についても解析を開始した。これまでの我々の知見より、MFG-E8 は、ペリサイトなど間葉系幹細胞由来細胞より産生され、PDGFR $\beta$  シグナルの制御を介して、その細胞機能を制御することが示唆される。そこで、まず間葉系幹細胞における MFG-E8 の発現を検討した結果、間葉系幹細胞で MFG-E8 が高発現していることを見出した。間葉系幹細胞は多能性幹細胞としての機能を持ち、腫瘍においては、間葉系幹細胞が腫瘍血管新生を促進、腫瘍増殖を亢進させることが知られている (J Cell Mol Med, 15, 2343-52, 2011)。そこで、間葉系幹細胞による腫瘍血管新生能における MFG-E8 の役割に注目した。**本研究では、MFG-E8 による間葉系幹細胞の機能制御のメカニズムを明らかにしたい。**

3 つ目の研究として、線維化と MFG-E8 の関連性について研究を開始した。MFG-E8 KO マウスでプレオマイシン誘導肺線維化が亢進することが報告されている (Atabai K. J Clin Invest, 2009)。また、喘息患者の気道周囲平滑筋細胞における MFG-E8 発現量は低下しており、MFG-E8 KO マウスでは喘息モデル (気道周囲の線維化) が増悪するとの報告もあり (Kudo M. PNAS, 2013)、MFG-E8 は線維化に対して抑制的に働いている可能性が考えられる。そこで、まず正常人と皮膚硬化が強く見られる全身性強皮症患者の皮膚線維芽細胞における MFG-E8 の発現を比較した。その結果、強皮症由来線維芽細胞での MFG-E8 の発現は低下していた。次に siRNA 法を用いてヒト皮膚線維芽細胞の MFG-E8 の発現を抑制して、線維化に関する因子について検討したが、*in vitro* では明らかな違いは得られなかった。そこで、**本研究では、MFG-E8 WT/KO マウスを用いてプレオマイシン誘導皮膚線維化について比較検討し、*in vivo* での線維化に対する MFG-E8 の役割を検討したい。また、皮膚線維化モデルマウスであるタイトスキンマウスと MFG-E8 KO マウス (B6 マウス) を交配することによってタイトスキンで MFG-E8 が欠損するマウスを作製して、*in vivo* における MFG-E8 の皮膚硬化への影響を明らかにしたい。**

2. 研究の目的

申請者は以前に、分泌蛋白質 MFG-E8 が血管周皮細胞 (ペリサイト) から大量に産生されること、MFG-E8 がペリサイト細胞表面上のインテグリンと結合し、PDGFR $\beta$  シグナルを亢進させ、細胞運動、腫瘍血管新生を促進させることを見いだした。これらの知見を元に MFG-E8 の新たな機能制御の解明を目指している。**本研究では、創傷治癒、間葉系幹細胞による腫瘍血管新生、線維化の 3 つの病態における MFG-E8 の機能制御を明らかにすることが目的である。具体的な目的は、**

**MFG-E8 と成長因子(bFGF や PDGF)の併用による創傷治癒の促進効果を明らかにする。**

**間葉系幹細胞の腫瘍血管新生能における MFG-E8 の役割、その機序を明らかにする。**

**動物モデルを用いて MFG-E8 による線維化の制御、役割を明らかにする。の3つである。**

### 3. 研究の方法

**MFG-E8 と成長因子(bFGF や PDGF)の併用による創傷治癒の促進効果を明らかにする。**

糖尿病マウス(db/db マウス)の背部に創傷(皮膚の表皮、真皮の全層欠損)を作製し、その創傷部位にコントロールとして PBS のみを外用するもの、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic Fibroblast Growth Factor: bFGF)だけを外用するもの、MFG-E8 のみを外用するもの、MFG-E8 と bFGF の両方を外用するもの4グループに分けて創傷治癒の程度を測定し比較する。外用は連日行う。創傷作成後7日目と14日目の創傷部位を採取し、組織を作製し、免疫染色を行い、血管量(CD31 陽性血管内皮細胞、NG2 陽性ペリサイト、 $\alpha$ SMA 陽性ペリサイト、血管平滑筋細胞、筋線維芽細胞)の比較を行う。また、創傷作成後7日目と14日目の創傷部位を採取し、RNA を採取し、リアルタイム PCR によって、CD31、NG2、 $\alpha$ SMA の mRNA 量を比較検討する。また、bFGF と同じく創傷治癒促進効果が見られる成長因子である血小板由来成長因子 PDGF と MFG-E8 の併用効果についても検討する。

**間葉系幹細胞の腫瘍血管新生能における MFG-E8 の役割、その機序を明らかにする。**

マウスに悪性黒色腫細胞と MFG-E8 WT もしくは KO マウス由来の間葉系幹細胞を混ぜて皮下注射して、成長を比較する。また、組織学的に血管量やマクロファージ量を比較する。MFG-E8 WT、KO マウス由来間葉系幹細胞を24時間培養した後に、RNA を回収し、real-time PCR 法によって MFG-E8 や血管新生にかかわる因子である VEGF、エンドセリンなどの発現量を比較検討する。

***in vivo* モデルを用いて MFG-E8 による線維化の制御、役割を明らかにする。**

MFG-E8 WT/KO マウスを用いてブレオマイシン誘導皮膚線維化について比較検討し、*in vivo* における線維化に対する MFG-E8 の役割を検討する。MFG-E8 WT/KO マウスに線維化を誘導し、組織学的に皮膚硬化の比較を行う。また、皮膚より RNA を抽出してリアルタイム PCR 法にて線維化に関する因子(TGF- $\beta$ , 1 型コラーゲン, CTGF,  $\alpha$ SMA, MMP-1 など)の発現を比較する。免疫染色に

て、硬化部に浸潤する細胞の種類や数の比較も行う。

### 4. 研究成果

**MFG-E8 と成長因子(bFGF や PDGF)の併用による創傷治癒の促進効果を明らかにする。**

糖尿病マウス(db/db マウス)の背部に創傷(皮膚の表皮、真皮の全層欠損)を作製し、その創傷部位にコントロールとして PBS のみを外用するもの、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic Fibroblast Growth Factor: bFGF)だけを外用するもの、MFG-E8 のみを外用するもの、MFG-E8 と bFGF の両方を外用するもの4グループに分けて創傷治癒の程度を測定したところ、MFG-E8 や bFGF の外用ないし皮下注入によって糖尿病性難治性潰瘍の創傷治癒が促進された。さらに MFG-E8 と bFGF の併用によって相加的な治療効果が得られた。血管新生数も MFG-E8 や bFGF の外用ないし皮下注入によって増加し、さらに MFG-E8 と bFGF の併用によって相加的に増加がみられた。マクロファージの量や種類についても変化がみられた。

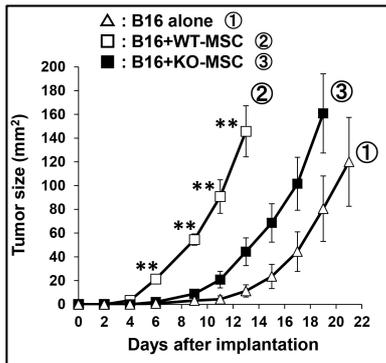
循環障害による皮膚潰瘍は難治であり、血流を増加させる様々な内服薬や点滴を用いても改善に乏しい場合もある。局所治療法として、肉芽の増殖を促し、血管新生を促す効果のある成長因子を含んだ外用剤が使用されている。bFGF は噴霧式の治療薬として、既に多くの皮膚潰瘍の症例で広く使用されている。本研究によって分泌蛋白質 MFG-E8 が bFGF の創傷治癒効果を増強させたことから、ヒトの創傷治癒においても同様の効果が得られることが期待される。このようにヒトの難治性潰瘍の新たな治療法として活用することが可能になれば、この研究の成果が、国民の健康を促進させ、患者の生活の質の向上をもたらすことが予想される。

**間葉系幹細胞の腫瘍血管新生能における MFG-E8 の役割、その機序を明らかにする。**

ペリサイトは間葉系幹細胞(MSC)由来の細胞であることから、マウス骨髄細胞由来 MSC における MFG-E8 の発現を調べた結果、骨髄由来 MSC は、悪性黒色腫細胞やペリサイト様細胞 10T1/2 細胞と比べて、多くの MFG-E8 を発現することを見出した。FACS にて、MFG-E8 野生型(WT)マウス、MFG-E8 欠損(KO)マウスの骨髄より作成した MSC の細胞表面分子の発現量を比較した結果、MSC のマーカーとして知られている Sca-1, CD105, CD44 の発現量に差はみられなかった。次に悪性黒色腫細胞と GFP マウス骨髄由来 MSC を混ぜてマウスに皮下移植し、MSC の局在について検討した。その結果、MSC は悪性黒色腫内で血管内皮細胞周囲に局在し、一部はペリサイトマーカー NG2 や MFG-E8 を発現して

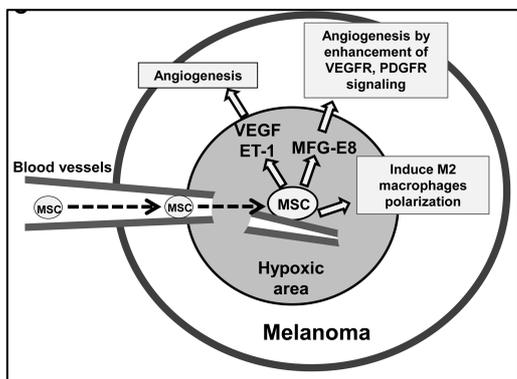
いた。MSC の悪性黒色腫に対する影響を見るために、マウスの皮下にメラノーマ細胞単独、悪性黒色腫細胞と MFG-E8 WT マウス由来 MSC、悪性黒色腫細胞と MFG-E8 KO マウス由来 MSC を移植する 3 群を作製し、腫瘍の成長を比較した。その結果、メラノーマ細胞単独と比較して、MSC を移植した腫瘍( )は増殖が亢進すること、悪性黒色腫細胞と MFG-E8 KO マウス由来 MSC を移植した腫瘍は、悪性黒色腫細胞と MFG-E8 WT マウス由来 MSC を移植した腫瘍

と比べて、増殖が抑制された(下図参照)。この結果より、MSC による悪性黒色腫の増殖促進効果に MFG-E8 が重要な役割を担っている



可能性が示唆された。次に腫瘍内血管量について検討したところ、MFG-E8 WT マウス由来 MSC を移植した腫瘍で血管内皮細胞とペリサイト量が亢進していた。また、MFG-E8 WT マウス由来 MSC を移植した腫瘍

内には腫瘍随伴性マクロファージ (TAM: CD68+, CD206+細胞) の量が MFG-E8 KO マウス由来 MSC を移植した腫瘍より増加していた。クロドロネートリポソームによってマクロファージを除去したところ、MFG-E8 WT マウス由来 MSC による腫瘍増殖亢進が抑制された。In vitro にて MSC によるマクロファージの分化能への影響について検討した。MFG-E8 WT マウス由来 MSC の培養上清で培養したマクロファージ(RAW264.7)は、M2 マクロファージのマーカーである arginase-1, CD206 の発現が増加したが、MFG-E8 KO マウス由来 MSC の培養上清では増加しなかった。これらの結果より、MSC による M2 マクロファージへの分化促進には MFG-E8 が関与している可能性が示唆された。さらに、MFG-E8 WT マウス由来 MSC は、血管増殖因子 (VEGF やエンドセリン-1) の発現が増加していた。ヒト悪性黒色腫内の MFG-E8 の局在を検討した結果、MFG-E8 は



血管周囲を中心に見られ、特にペリサイト中に見られた。これらの結果から、悪性黒色腫内に遊走した MSC は血管周囲で MFG-E8 や VEGF などを産生して血管新生を亢進させること、腫瘍随伴性マクロファージ (M2 マクロファージ) を誘導し腫瘍の成長を促進させることが示唆された(左下図参照)。これらの成果は、Cancer Research 誌に掲載された。

### in vivo モデルを用いて MFG-E8 による線維化の制御、役割を明らかにする。

MFG-E8 WT/KO マウスを用いてプレオマイシン皮下注射による皮膚線維化の程度を比較したところ、MFG-E8 KO マウスで皮膚硬化が亢進していた。また、マクロファージやリンパ球などの炎症細胞浸潤や線維化を亢進させる因子の発現が MFG-E8 KO マウスで増加していた。今後は、in vitro の実験によって、その機序の解明を目指す。

また、fibrillin1 遺伝子突然変異によって皮膚硬化を生じたマウス (タイトスキンマウス) が皮膚線維化モデルマウスとして知られている。そこで、タイトスキンマウスと MFG-E8 KO マウス (B6 マウス) を交配し、タイトスキンかつ MFG-E8 が欠損するマウスを作製して、in vivo における MFG-E8 の皮膚硬化への影響を明らかにしたい。我々はすでに交配を開始しており、目的のマウスが数匹生まれている。今後は組織学的に皮膚硬化の比較を行う。また、プレオマイシン皮膚硬化モデルと同様に、生化学的、組織学的に線維化に関与する因子の比較を行い、その病態を明らかにしたい。

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)  
Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Udey MC, Ishikawa O, Motegi S.  
MFG-E8 drives melanoma growth by stimulating mesenchymal stromal cell-induced angiogenesis and M2 polarization of tumor-associated macrophages.  
Cancer Research, 査読あり 76(14) 2016; 4283-4492.

[学会発表](計1件)  
Fujiwara C, Uehara A, Yokoyama Y, Ogino S, Uchiyama A, sekiguchi A, Ogino S, Ishikawa O, Motegi S.  
Inhibitory regulation of MFG-E8 on fibrosis in systemic sclerosis.  
The 41<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology  
2016年12月9日~2016年12月13日, Sendai

[その他]

ホームページ等

悪性黒色腫における間葉系幹細胞の役割を  
解明

[http://www.gunma-u.ac.jp/information/16  
246](http://www.gunma-u.ac.jp/information/16246)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 精一郎 (MOTEGI Sei-ichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20420185