

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22112007

研究課題名(和文) 骨髄由来細胞を介した腫瘍血管新生及び増殖における血液線維素溶解系の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the fibrinolytic system in bone marrow-derived cell mediated tumor angiogenesis and growth

研究代表者

Heissig Beate (Heissig, Beate)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30372931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 46,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん病態形成における、がん微小環境の重要性が注目されている。研究代表者らは、本研究で、血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンの新規阻害剤のT細胞白血病・リンパ腫モデルへの投与が、マトリックスメタロプロテアーゼ-9の活性に依存したCD11b陽性F4/80陽性の骨髄由来細胞のがん組織への浸潤と、これに伴うリンパ腫の異常血管新生、及びその増殖を障害することを示した。また代表者らは、このプラスミン阻害剤が、CD45陽性CD11b陽性VEGFR-1陽性の骨髄由来細胞の動員抑制により、炎症性腸疾患にも有効であることを示し、がんを含む多くの疾患で、線溶系因子の創薬の標的分子としての重要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment includes hematopoietic cells, endothelial cells, and cancer-associated fibroblasts. Hematopoietic-myeloid cells promote cancer growth by stimulating angiogenesis (formation of new blood vessels). Plasmin inhibition (pharmacological and genetic) prevented T cell lymphoma growth and diminished matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)-dependent CD11b+F4/80+ myeloid cell infiltration into lymphoma tissues. Inflammatory bowel disease (IBD) and here especially ulcerative colitis patients are endowed with a high of developing colorectal cancer. Plasmin regulated IBD progression in models of IBD by activating MMP-9 and enhancing myeloid cell influx. Plasminogen activation not only activated other proteases like MMP-9, but also mobilized marrow derived CD45+CD11b+VEGFR-1+ cells, which promoted neovascularization. In summary, we have established a critical role of the fibrinolytic system for regulating the cellular composition of the tumor microenvironment.

研究分野：血液学、腫瘍学、幹細胞生物学、免疫学

キーワード：がん 酵素 細胞・組織 発生・分化 生体・分子

1. 研究開始当初の背景

(1) がん増殖とその病態形成過程における、がん微小環境の重要性は揺るぎないものとなりつつある。がん微小環境中の細胞成分として、いわゆる腫瘍関連マクロファージ (TAM) を含む造血系・炎症性細胞、異常血管を構築する血管内皮細胞、がん関連線維芽細胞 (CAF) の重要性が示唆されてきている。これらの細胞群は、各種細胞間の相互作用を通じて、がん増殖機構に関与し、異常血管新生や転移巣の形成を含むがん病態を構成している。細胞間相互作用については、サイトカイン、ケモカインをはじめ、接着分子やマトリックスポロテイナーゼ (MMP) といった各種プロテアーゼ群等の細胞外環境分子の存在が必須と考えられている。近年、MMP 群と血液線維素溶解系 (線溶系) に代表されるセリンプロテアーゼ群間の相互活性化機構の解明も進んできており、これらのプロテアーゼ群が、がん細胞の浸潤あるいは転移等の動態を直接的あるいは間接的に制御していることも、生体内の実験を通じ、次々と報告されている。

(2) 線溶系の主要酵素であるプラスミンはその酵素前駆体であるプラスミノゲンの活性化によって生成する。生体内においては、プラスミノゲンは、主にウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (uPA)、あるいは組織型 PA (tPA)、また PA 抑制因子 (PAI-1、PAI-2) 等によって活性化を制御されていることが判明している (Dano et al. Thromb Haemost 2005)。線溶系は、生体内の血栓除去機構として広く知られているが、いわゆる血液線溶と、uPA の細胞表面に存在する uPA 受容体 (uPAR) による細胞表面の uPA/uPAR 結合を中心とした細胞線溶とに分類され、プラスミンの生成は、潜在型酵素 ProMMP から活性型 MMP への変換を制御していることが解ってきている。これまでに各種のがんに対する免疫応答として、がん微小環境中に存在する造血系、血管内皮系細胞、あるいは CAF において、これら線溶系因子の発現増強が報告されている。がん病態における線溶系の生理学的機能の詳細については未だ不明な点が多く、がん血管新生についての仮説として二つの側面が指摘されている。一つは、血管内皮増殖因子 (VEGF) や、がん由来のその他の生体因子等と協調した直接的な血管内皮細胞の増殖制御、そしてもう一つは、アンジオスタチン等のコファクターのプロセッシング等を通じた間接的な作用である。また近年、PAI-1 については、脂肪細胞、線維芽細胞、マクロファージから分泌されること、がん微小環境中の異常血管新生との連関を通じて、がん細胞の動態に関与していることが示唆されている。

2. 研究の目的

がん増殖と病態形成過程において血管、サイトカイン、接着分子の他、CAF あるいは TAM

を含めた造血系細胞等によって構成されるがん微小環境の、がん病態形成、がん細胞動態における重要性は確立されつつある。また MMP やセリンプロテアーゼに代表されるプロテアーゼ群は、やはりその構成因子として機能し、がん細胞の組織内浸潤、あるいは転移等の生体内のがん細胞動態に直接的あるいは間接的に関与することが明らかとなっている。代表者らは、これまでの研究で、生体内の血管新生におけるプラスミン生成を介した MMP の活性化と血管新生因子の供給媒体として機能する造血系細胞動員の重要性を示唆した。本研究では、線溶系を中心とした各種プロテアーゼ活性のがん血管新生、がん病態形成における意義と役割を明らかにすることを主目的とし、薬剤によるプロテアーゼ活性制御によるがん増殖抑制療法の可能性を探ることまでをその目的の範疇とする。

3. 研究の方法

マウスおよびヒトのがん(腫瘍)組織における uPA、tPA、uPAR、プラスミンの発現

パターンの解析 マウス腫瘍組織モデルとして白血病・リンパ腫、乳がん、メラノーマをはじめとする皮膚がんの腫瘍組織、ヒト腫瘍組織モデルとして、白血病の骨髄、リンパ腫、大腸がん、乳がん、メラノーマ患者の腫瘍組織切片を作成し、uPA、tPA、uPAR、PAI-1、プラスミノゲン (Plg)、プラスミン、フィブリノーゲン、フィブリン等の免疫特殊染色を行う。遺伝子改変や薬剤による Plg または PA の欠損が腫瘍の増殖・転移、骨髄由来細胞の動員に及ぼす影響の検討 Plg^{-/-}マウス、tPA^{-/-}マウス、uPA^{-/-}マウス、新規プラスミン阻害剤 YO-2 または PAI-1 阻害剤を投与した野生型マウスに腫瘍細胞株 Colon-26、B6RV2、B16 を注入し、形成された腫瘍組織を摘出し、骨髄性細胞による浸潤について免疫特殊染色にて検討する。なおこの時、細胞表面マーカーとして、CD11b、Gr-1、F4/80、MBP を使用する。また、腫瘍組織より単一細胞を分離し、腫瘍血管新生に寄与している CD11b⁺/F4/80⁺細胞や VEGF 非依存性の腫瘍血管新生に寄与している可能性のある CD11b⁺/Gr-1⁺細胞について検討する。

遺伝子改変や薬剤による Plg または PA の欠損が炎症性疾患に及ぼす影響の検討

Plg^{-/-}マウス、tPA^{-/-}マウス、uPA^{-/-}マウス、新規プラスミン阻害剤 YO-2 または PAI-1 阻害剤を投与した野生型マウスに Dextran sulfate sodium による腸炎の誘導を行い、炎症性腸疾患での線溶系の機能解析を行う。また F1 ハイブリッドによる移植片対宿主病 (GVHD) のモデルを作製し、YO-2 の有効性を精査する。

uPA, tPA, PAI-1 欠損型マウスにおける腫瘍の増殖・転移の検討 野生型マウスの骨髄を uPA, tPA, PAI-1 欠損型マウスの骨髄で置き換える、あるいは、逆に、uPA, tPA, PAI-1 欠損型マウスの骨髄を野生型マウスの骨髄で置き換えることにより、キメラ型マウスを作製する。増殖・転移が線溶系の存在に依存する腫瘍細胞株を投与し、腫瘍の増殖・転移、骨髄性細胞の浸潤、血管新生について、免疫染色にて検討する。

プラスミンまたは PAI-1 阻害剤を投与したマウスにおける腫瘍の増殖・血管新生の検討、さらに造血系細胞の血管新生関与の精査 マウスのがんモデルに対し、抗 CD11b 抗体を投与し、骨髄性細胞を除去した後に、プラスミン阻害剤 YO-2 または PAI-1 阻害剤を投与し、腫瘍の増殖・異常血管新生について検討する。さらに、大腿動静脈の結紮による虚血肢モデルを作製し、生理的な血管新生と線溶系、MMP との関連性も精査し、この時の造血系細胞の役割についても検討する。

4. 研究成果

(1) 代表者らは、白血病・リンパ腫細胞の微小環境—ニッチを構成する細胞、いわゆるニッチ細胞として骨髄由来の CD11b 陽性 F4/80 陽性細胞が機能していることを突き止めた。一部の白血病・リンパ腫では、その増殖、進展と共に血液中で線溶系の亢進すなわちプラスミン産生の増加とこれに伴うマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)の活性化が認められる。最近の他施設及び代表者らの研究で、これらのプロテアーゼが、血管内皮増殖因子(VEGF)や細胞増殖因子 Kit-ligand のプロセッシングを制御していることが解ってきた。本研究で、作製した白血病・リンパ腫のマウスモデルにおいても、これらのプロテアーゼの活性化、VEGF、Kit-ligand の血中濃度の上昇を認め、また遺伝子欠損マウスの使用により、線溶系酵素 Plg / プラスミン及び MMP の活性が、一部のリンパ腫細胞の増殖、そしてこれらの液性因子レベルと有意な相関関係を有することが判明した。またこの時、リンパ腫増殖とプロテアーゼの活性化に応じて、腫瘍組織中に CD11b 陽性 F4/80 陽性の造血系細胞が有意に増加すること、さらにこれらの細胞が VEGF 供給能を有し、異常血管新生を誘導している可能性が示唆された。加えて、こうした実験結果を基礎として、代表者らは、MMP 活性を抑制する新規のプラスミン活性阻害剤 YO-2 が、骨髄由来 CD11b 陽性 F4/80 陽性細胞の腫瘍組織周囲への動員抑制を介し、生体内でリンパ腫増殖を有意に抑制することを示した。

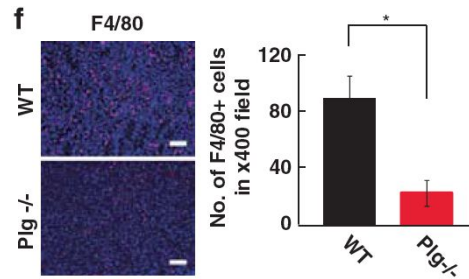


Figure 1: From Ishihara et al. Leukemia, 26: 2012.

(2) またやはりがん微小環境の構成因子と考えられている膜型 MMP(MT1-MMP)の遺伝子欠損マウスを精査した結果、野生型と比較して骨髄組織における造血幹細胞に変化はない一方で末梢組織における造血前駆細胞や成熟血球細胞が減少していること、さらに骨髄の線維芽細胞—ストローマ細胞ら産生される各種造血因子、ケモカインの発現および分泌が減少していることを明らかにした。

Kit-ligand をはじめとする数種類の造血因子は膜型から可溶型へプロセッシングされるという細胞外ドメイン分泌という形態をとる。プロセッシングは多くの MMP により制御されているが、研究グループらの発表によりこの MMP の活性化は MT1-MMP などによって上方制御されていることが明らかとなった。また細胞外ドメイン分泌とは異なる形態をとる造血因子についても、通常は MT1-MMP の細胞内ドメインに結合している HIF-1 阻害物質である FIH-1 が MT1-MMP 遺伝子欠損マウスでは細胞質内に遊離してしまい HIF-1 活性が阻害される結果、HIF-1 により発現制御されている造血因子の遺伝子発現が抑制されるという二つの原因を明らかにした。これらの実験結果は、がん微小環境における、サイトカイン、ケモカイン、血管制御因子群の産生が、やはり MMP の活性によって制御されている可能性を示唆したと言える。

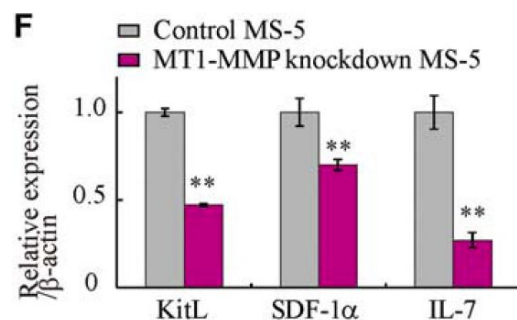


Figure 2. From Nishida 2012 Blood

(3) またがん微小環境を構成する造血系細胞の動態は、線溶系の活性によって制御されていることを明らかにした。近年、慢性炎症、ないしは自然炎症と発がんとの関連性も示唆されている。当方では、移植片対宿主病(GVHD)と炎症性腸疾患の二つの炎症性疾患(IBD)モデルを精査したところ、線溶系の活性

の活性は二つの経路で炎症性サイトカイン分泌を制御していることを明らかにした。その一つは、MMP等の活性化を通じて、TNF- α やFas-ligand、MCP-1等の炎症性サイトカインの細胞外ドメイン分泌を促進する経路、もう一つはNF- κ Bを通じて直接的なシグナル伝達の促進、細胞内因子の活性化であることが判明した。MCP-1については、TAMの誘導あるいは動員作用も指摘されており、線溶系亢進を認めるがん種においては、こうした造血系細胞の動員、増殖を通じたがん増殖の促進作用が機能している可能性がある。

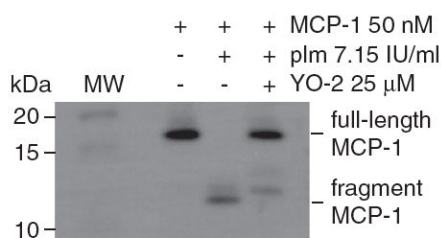


Figure 2: From Sato et al. *Leukemia* 2015

IBD、特に潰瘍性大腸炎については、がん化の問題も指摘されているが、今回の研究で、当方では薬剤誘導、免疫学的機序の三つのモデルで、プラスミン阻害剤の有効性を確認しており、現在も炎症・発がん系のモデルで、その有用性を確認中である。また急性GVHDのモデルにおいても線溶活性の抑制は、有意な予後と病変の改善を認めた。

(4) 虚血肢モデルにPAI-1阻害剤を投与することにより、対照群と比較して、有意な虚血性壊死組織の減少や下肢の血流回復の促進を認めた。また、PAI-1阻害剤を投与したマウスでは、生体由来のtPAが血液中で増加しており、このtPA量のPAI-1阻害に対する反応性・相対的増加が、プラスミンの生成増加、MMP-9の活性化、さらに造血因子の細胞外ドメイン分泌亢進のプロセスを介して、骨髄由来の造血系細胞の虚血組織中への動員を促進することが判明した。さらにこうして組織内に動員、そして浸潤したCD45+CD11b+VEGFR-1+細胞に、VEGF-A及びFGF-2を供給する能力があることが判明し、これにより下肢虚血部位における血管新生の促進、新生血管の有意な増加を認めた。さらにCD11bの移植により虚血肢再生、血管新生が促進されることも確認した。

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 12 件)

shared senior author

- Munakata S, Tashiro Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahri D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B#,

Hattori K#. Inhibition of Plasmin Protects Against Colitis in Mice by Suppressing Matrix Metalloproteinase 9-Mediated Cytokine Release From Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 148(3):565-578.e4, 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.001.

- Sato A, Nishida C, K Sato-Kusubata, M Ishihara, Y Tashiro, I Gritli, H Shimazu, S Munakata, H Yagita, K Okumura, Y Tsuda, Y Okada, A Tojo, H Nakauchi, S Takahashi, Heissig B#, Hattori K#*. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia*. 29(1):145-56, 2015. doi: 10.1038/leu.2014.151.

- Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B#, Hattori K#, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. *Blood*. 123(25):3932-42, 2014. doi: 10.1182/blood-2013-01-476747.

- Caiado F, Carvalho T, Rosa I, Remédios L, Costa A, Matos J, Heissig B, Yagita H, Hattori K, da Silva JP, Fidalgo P, Pereira AD, Dias S. Bone Marrow-Derived CD11b+Jagged2+ Cells Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 73(14):4233-4246, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0085.

- Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B#, Hattori K#. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood*. 119(26):6382-93, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-12-399659.

- Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B#, Hattori K#. MT1-MMP

- plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemo-/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood*. 119(23):5405-16, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-11-390849.
7. Okaji Y, Tashiro Y, Gritli I, Nishida C, Sato A, Ueno Y, Del Canto Gonzalez S, Ohki-Koizumi M, Akiyama H, Nakauchi H, Hattori K#, Heissig B#. Plasminogen deficiency attenuates post-natal erythropoiesis in male C57BL/6 mice through decreased activity of the LH-testosterone axis. *Exp Hematol*. 40(2):143-54, 2012. doi: 10.1016/j.exphem.2011.10.008.
 8. Heissig B, Ohki-Koizumi M, Tashiro Y, Gritli I, Sato-Kusubata K, Hattori K. New functions of the fibrinolytic system in bone marrow cell-derived angiogenesis. *Int J Hematol*. 95(2):131-7, 2012. doi: 10.1007/s12185-012-1016-y.
 9. Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Okaji Y, Yamamoto R, Yagitat H, Okumura K, Nishikori M, Wnaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B#, Hattori K#. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b(+)/F4/80(+) myeloid cell recruitment. *Leukemia*. 26: 332-9, 2012. doi: 10.1038/leu.2011.203.
 10. Piao JH, Hasegawa M, Heissig B, Hattori K, Takeda K, Iwakura Y, Okumura K, Inohara N, Nakano H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (Traf)2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease. *J Biol Chem*. 286, 17879-88, 2011. doi: 10.1074/jbc.P111.221853.
 11. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Atsumi 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. doi: 10.1182/blood-2009-08-236851.
 12. Heissig B, Nishida C, Tashiro Y, Sato Y, Ishihara M, Ohki M, Gritli I, Rosenkvist J, Hattori K. Role of neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 in tissue regeneration. *Histology and Histopathology*. 25(6), 765-70, 2010. http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_25/25_6/25_6_765.htm
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. Heissig B. The fibrinolytic system modulates the cytokine and cellular environment during cancer progression and chronic inflammation. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer. Signal Network in Tumor Microenvironment. つくば国際会議場 Tsukuba, Japan, Jan. 12-13, 2015
 2. Heissig B. The fibrinolytic pathway is required for Mesenchymal Stem Cell expansion by initiating a crosstalk between Mesenchymal Stem and Endothelial cells. IMSUT, Stem Cell Forum 東京大学医科学研究所 April 25, 2014.
 3. Heissig B. The fibrinolytic pathway is required for Mesenchymal Stem Cell expansion by initiating a crosstalk between Mesenchymal Stem and Endothelial cells. International vascular biology meeting (IVBM). みやこめっせ Kyoto April 14-17, 2014.
 4. Heissig B. Role of the microenvironment in cancer initiation and development. Nagoya University, Japan, 名古屋大学 June 10th, 2013.
 5. Heissig B. Regulation of Blood Stem Cell Function through life by MT1-MMP. Tokyo, Japan, Nov. 30, MT1-MMP symposium, 東京大学医科学研究所 2012.
 6. Heissig B. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemo-/cytokine gene transcription within niche cells. がん微小環境ネットワークの統合的研究 文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究公開シンポジウム, 東京大学医学部総合中央館 Tokyo, Japan, July 05, 2012.
 7. Heissig B. A role for niches in hematopoietic development. Chiba Cancer Institute, Japan, 第772回千葉県がんセンター研究局集団会, 千葉県がんセンター, October 19, 2011.
 8. Heissig B. Fibrinolytic factors regulate tumor progression and growth by altering the interaction between cells of the tumor microenvironment. J第70回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 Nagoya, Japan, October 3-5, 2011.
 9. Heissig B. The proteolytic bone marrow niche: The impact of membrane type-1 matrix metalloproteinase and plasminogen deficiency on post-natal

hematopoiesis. Japanese-German Cancer Workshop. グランドプリンスホテル 広島 Hiroshima, Japan, September 17-20, 2011.

10. Heissig B. The impact of membrane type-1 matrix metalloproteinase and plasminogen deficiency on post-natal hematopoiesis. 3rd Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE. New Horizon of Stem Cell Research and Regenerative Medicine. 東京大学医科学研究所, March 4th, 2011.

11. Heissig B. The fibrinolytic system regulates myeloid cell influx and lymphoma growth. Global COE Symposium on Current and Future Directions of Dendritic Cell Biology and Immunotherapy. 東京大学医科学研究所, June 29, 2010.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://stemcell-u-tokyo.org/scd/>

<http://ganshien.umin.jp/public/research/main/heissig/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ハイジツヒ ベアテ (HEISSIG BEATE)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30372931

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

服部 浩一 (HATTORI KOICHI)

順天堂大学・医学(系)研究科・特任先任
准教授

研究者番号：10360116