

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830080

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮幹細胞制御による新規血管新生阻害療法の開発

研究課題名(英文)Characterization of endothelial side population cells in the tumor vasculature and their potential role for drug resistance.

研究代表者

内藤 尚道(Naito, Hisamichi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30570676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の増大には血管新生が必須である。これまでに増殖能が非常に高い幹・前駆細胞様の性質を持った血管内皮細胞が全身の血管に存在する事を明らかにした。血管新生時にはこの特殊な内皮細胞が血管を構築する内皮細胞を大量に産生する。本研究では腫瘍血管で、このような幹・前駆細胞様の内皮細胞の解析を行った。腫瘍血管においては増殖能の高い内皮細胞は正常組織よりも高頻度で認めること、さらに正常組織とは異なる表面マーカーを持つことが明らかになった。また、この内皮細胞と腫瘍をマウス皮下に共移植するとこの内皮細胞由来の腫瘍血管が構築された。この細胞を特異的に阻害することにより、効果的な血管新生阻害剤が開発できる。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is regarded as a hallmark in cancer development. In the previous work, we identified stem/progenitor like endothelial cell(EC) in the peripheral blood vessel. These endothelial stem-like cell possess EC colony-forming potential in vitro and contribute to angiogenesis by generating functional mature blood vessels in vivo. In this study, we characterized endothelial stem-like cells in the tumor vasculature and found that in the tumor vasculature, the percentage of stem-like cells were higher than normal tissues. We further examined contribution of these cells to the tumor vasculature by transplantation model and found that they produces numbers of ECs and contribute to the tumor blood vessels as functional vessels. Moreover, administration of anti-angiogenic drugs revealed their potential role for resistance to anti-angiogenic therapy.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮幹細胞 腫瘍血管 血管新生

1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管新生では既存の血管から発芽的に血管が形成される血管形成 (Angiogenesis) のみが生じると考えられてきた。近年、末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell ; EPC) が存在し、胎生期でのみ行われると考えられていた血管網の構築による脈管形成 (vasculogenesis) が、腫瘍や虚血性疾患などで生じる病的な血管新生に貢献しているとの概念が提唱された。しかし、現在では EPC が血管内皮細胞として新規血管に貢献する割合は非常に低い事が明らかになっている。

私たちは血管新生時の血管内皮細胞の供給源として末梢に存在する血管内皮細胞の重要性を再認識して解析を行い、既存の血管内皮細胞中に分化レベルでの血管内皮細胞の多様性が存在することを示唆してきた。フローサイトメトリー (FACS) を用いた組織幹細胞の同定方法として知られているヘキスト解析を用いて、血管内皮細胞分画中に内皮細胞母集団 (Endothelial main population ; EC-MP) から、約 1% の比率で血管内皮幹/前駆細胞分画 (Endothelial side population ; EC-SP) として分離可能な新規血管内皮幹細胞様の細胞集団が末梢血管の内腔に存在することを明らかとし、その特殊な内皮細胞がコロニー形成能をもち、著明な増殖能をもつ事を示してきた。またマウス下肢虚血モデルでは EC-SP 細胞は細胞周期が回転をはじめ細胞増殖をおこし、虚血部位に移植を行うと血流の改善および長期間にわたって維持される血流のある血管を完全に再構築することを明らかとしてきた。

このような特殊な内皮細胞の存在はこれまでに報告がなく、各臓器での役割、生理的条件下での血管新生における役割、さらには腫瘍血管新生における役割は不明である。

2. 研究の目的

正常組織の末梢血管内皮細胞分画中に血管内皮幹/前駆細胞が存在し、末梢血管で血管内皮細胞が独自の幹細胞システムを構築し血管新生に貢献していることを明らかとしてきた。本研究では腫瘍血管内皮細胞における血管内皮幹・前駆細胞の同定、腫瘍血管新生での役割を解明することを通じて新規血管新生阻害療法の開発を目指した。

(1) 腫瘍血管における EC-SP 細胞の同定 (2) 血管新生阻害剤と SP 細胞の関係 (3) 腫瘍 EC-SP 細胞の新規表面抗原の同定、以上 3 点の解明を目指した。

3. 研究の方法

マウスの腫瘍から FACS を用いて血管内皮細胞を分離し解析を行う。

(1) 腫瘍血管における EC-SP 細胞の同定
腫瘍皮下移植、腫瘍同所移植モデルマウス

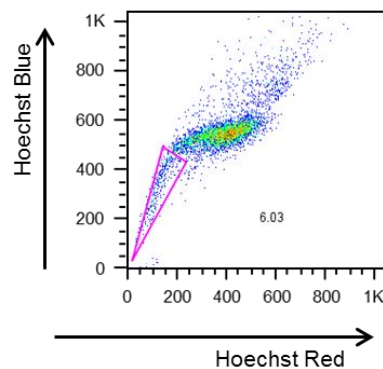
を用いてマウスに腫瘍を作製し、FACS を用いて腫瘍血管内皮細胞を分離する。幹細胞分画を検出する方法であるヘキスト染色を用いて腫瘍血管内皮細胞分画中の Side Population (SP) 細胞を同定する。

(2) 血管新生阻害剤と EC-SP 細胞の関係
抗 VEGF 抗体であるベバシズマブや VEGFR 阻害剤を担がんマウスに投与し、その結果残存する腫瘍血管のヘキスト解析を行う。

(3) 腫瘍 EC-SP 細胞の新規表面抗原の同定
腫瘍血管 EC-SP 細胞、EC-MP 細胞を分離しマイクロアレイ解析にて遺伝子発現の差の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 腫瘍血管における EC-SP 細胞の同定
Lewis Lung carcinoma 細胞株、KLN205 細胞株、Colon26 細胞株を用いて腫瘍を作製し FACS 解析を行った。解析ごとのばらつきが強かったが、CD31+CD45-腫瘍血管内皮細胞中には約 4-10% の割合で EC-SP 細胞が存在していた。(下図)



これらの腫瘍血管 SP 細胞は p27 の発現が低く、Ki67 の発現が高く細胞周期が常に回転していた。OP9 細胞上で培養すると多数の血管内皮細胞コロニーを形成しコロニー形成能が高い細胞であることが明らかとなった。また、腫瘍細胞と GFP マウス由来の内皮 SP 細胞を共移植すると、GFP 陽性の血管を腫瘍の中に多く認め腫瘍血管の基となる細胞であることが明らかとなった。

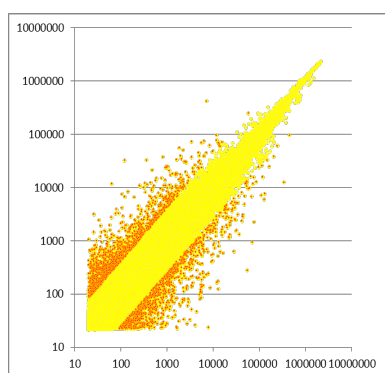
肺がん細胞株を用いて肺への腫瘍同所移植モデルを用いて解析を行った。肺で腫瘍を作製し解析を行っても皮下に腫瘍を移植した場合と同様の結果であり腫瘍血管の SP 細胞の性質は腫瘍の生じる部位が異なっても共通する性質を持つことが示唆できた。

(2) 血管新生阻害剤と SP 細胞の関係
現在臨床で用いられている血管新生阻害剤及び臨床治験段階にある薬剤、さらには血管新生阻害を目的とした中和抗体を用いて腫瘍血管 SP 細胞の変化に関して解析を行った。アキシチニブ、バンデタニブ、スニチニブ、ベバシズマブを用いて担癌マウスの治療を行った。受容体チロシンキナーゼ阻害剤を用

いた場合は SP 細胞の比率が増えることが明らかとなった。これは、SP 細胞が各種の薬剤排出ポンプを発現していることが一因であることが推測でき、実際に RNA レベルで SP 細胞は MP 細胞に比べ ABCG2 等の発現が高いことが明らかになった。(1)での実験結果と同様に肺がん細胞の同所移植モデルでも同様の実験を行った。チロシンキナーゼ阻害剤を用いた場合は肺腫瘍でも同様に SP 細胞の比率が増加することが明らかとなった。

(3) 腫瘍 EC-SP 細胞の新規表面抗原の同定
腫瘍の内皮 SP 細胞と MP 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行うように準備を行ったが、回収できる細胞量があまりにも少なく、RNA が解析可能量まで回収できなかったため解析を断念した。

そこで、当初予定していた様に正常組織での内皮 SP 細胞、MP 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。(下図)



SP 細胞と MP 細胞で発現の差を認める遺伝子を同定し、その中の膜表面糖タンパクである SPEC1 に注目して解析を行った。SPEC1 に対する FACS 抗体を用いて全身の血管内皮細胞を解析すると SPEC1 陽性と SPEC1 陰性の内皮細胞が存在することが明らかとなった。これらの細胞は EC-SP 細胞と同様に高い増殖能とコロニー形成能を持つ細胞であった。腫瘍血管内皮細胞で解析を行うと、正常組織と異なりすべての内皮細胞が SPEC1 陽性であった。SPEC1 のノックアウトマウスの解析を行うと、このマウスは正常に発育することが明らかとなった。現在 SPEC1 のノックアウトマウスで腫瘍血管の解析を行っている。また、SPEC1 陽性細胞の特徴を明らかにするために、正常組織の SPEC1 陽性、陰性細胞で遺伝子発現の網羅的解析を行っている。この細胞を特異的に阻害することにより、効果的な血管新生阻害薬の開発が可能であると考えられる。

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 7 件)

Tahara H, Naito H et al.

Evaluation of PSF1 as a prognostic

biomarker for prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2015 Mar; 18(1):56-62.

DOI: 10.1038/pcan.2014.46.

査読有

- ②Wakabayashi T, Naito H et al. Identification of Vascular Endothelial Side Population Cells in the Choroidal Vessels and Their Potential Role in Age-Related Macular Degeneration Investigative Ophthalmology & Visual Science, 54(10):6686-93.2013
DOI: 10.1167/iovs.13-12342.
査読有

- ③Kawahara H, Naito H et al. Tumor endothelial cell-specific drug delivery system using apelin-conjugated liposomes. PLoS One. 2013 Jun 14; 8(6):e65499.
DOI: 10.1371/journal.pone.0065499.
査読有

Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito H et al. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. PLoS One. 2013; 8(3):e58096.
DOI: 10.1371/journal.pone.0058096.
査読有

- ⑤Satoh T, Kidoya H, Naito H et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. Nature. 2013 Mar 28; 495(7442):524-8.
DOI: 10.1038/nature11930.
査読有

Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Naito H et al. Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose angiopoietin-1. J Biol Chem. 2013 May 3;288(18):12469-77.
DOI: 10.1074/jbc.M112.433979.
査読有

Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H et al. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. Am J Pathol. 2013 May; 182(5):1821-31.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.017.
査読有

[学会発表](計 4 件)

Hisamichi Naito

Identification of a new endothelial cell population in the peripheral blood vessels.

Gordon Research Conferences: Endothelial Cell Phenotypes in Health & Diseases ,2014年7月9日, Girona, Spain

② Hisamichi Naito

Identification of a new population of vascular resident endothelial cells.

The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014年4月15日, Kyoto, Japan

③ 内藤尚道

既存血管の内皮幹細胞と病態

第21回日本血管生物医学会学術総会,
2013年9月26日、大阪

Hisamichi Naito

Identification of Vascular Endothelial side Population and Its Role in Angiogenesis.

11th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, 2013年8月23日
Jeju, Korea

〔図書〕(計 1件)

Naito Hisamichi 他、Springer、Angiogenesis and Vascularisation、2013、416(67-87)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6802>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 尚道 (NAITO, Hisamichi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30570676