

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06147

研究課題名(和文)腫瘍血管形成モデルに新展開をもたらす「血管束移動」の提唱

研究課題名(英文)Tumor blood vessel formation by "vascular strand invasion"

研究代表者

木戸屋 浩康(Kido, Hiroyasu)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00543886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織が成長するためには、血管を介した酸素や栄養分の供給が必須であり、腫瘍内には多くの血管が作り出されている。そのため、腫瘍の血管形成を抑制することで栄養路を断ち、癌の成長を止めるという治療方法が提案されている。しかしながら、これまでに開発された血管形成の抑制剤を用いても、際だった治療効果が得られていない。本研究では、「血管移動」という現象によって腫瘍組織が血管を獲得することが、血管新生阻害剤への治療抵抗性に関与する可能性を見出した。さらに、その制御に血管制御ミエロイドと名付けた新しい細胞群が関与していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管を介した酸素や栄養の供給は、腫瘍を含めた全ての生体組織が成長するために必須であり、腫瘍血管の形成を抑制することで癌の治療を目指すというのは合理的な概念である。そのため、腫瘍に対する血管形成抑制剤がこれまでに際だった成果を上げていない理由を明らかにすることは、効果的な癌治療薬の開発を目指すためには重要な課題である。本研究によって発見された「血管移動」による栄養路の獲得と、それを制御する「血管制御ミエロイド」は、癌治療薬の新たな標的となると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Tumor blood vessels that supply the oxygen and nutrients to tumor tissues are necessary for tumor growth. Therefore, anti-angiogenic therapy has been considered promising therapeutic strategy for cancer treatment because inhibition of angiogenesis contributes to tumor progression. However, anti-angiogenic drug such as VEGF (Vascular endothelial growth factor) inhibitor have not bring remarkable therapeutic effects. In this study, we conducted research aimed at elucidating the Mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic therapy. As a result, we found a novel mechanism to acquire new tumor blood vessels by the movement of vessels. Moreover, we discovered that myeloid cell subsets are involved in the regulation of this phenomenon.

研究分野：血管生物学

キーワード：腫瘍血管形成 血管移動 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1)腫瘍血管に関する研究の現状

固形腫瘍の増大と血管形成は深く関連しており、そのために、腫瘍血管の抑制による「兵糧攻め」の考え方による癌治療を目指した研究が進められてきた。その結果、vascular endothelial growth factor (VEGF) や Angiopoietin-1 などの多数の腫瘍血管の形成を誘導する因子が同定されており、それらの分子に対する阻害剤の開発が進められている。しかしながら、大きな期待とともに 2004 年に抗がん剤として臨床に登場した VEGF に対する阻害剤は、単独使用では抗腫瘍効果が少なく、想定されていたような劇的な治療効果を示すことはなかった (Nat Rev Clin Oncol. 2009)。

(2)定説となっている腫瘍血管新生モデルへの疑問

1971 年に Judah Folkman 博士によって提唱された腫瘍血管新生モデルでは、腫瘍組織中に出現する新規の血管は、主に血管新生 (angiogenesis) と呼ばれる過程によって形成される (N Engl J Med. 1971)。血管新生とは、既存の血管から新たな血管が発芽するように生まれ、枝を伸ばすように血管を形成していく現象である。これまでに、血管新生の誘導には VEGF を介したシグナルが必須であると報告されているが、前述したように VEGF の阻害剤による抗腫瘍効果は限定的であった。さらに、申請者らによる担癌マウスモデルでの検証研究でも、VEGF の阻害剤の投与は腫瘍組織中の血管を十分に減少させることができなかった (Cancer Sci. 2012)。この研究結果は、腫瘍の増大には血管新生以外の未知の血管形成メカニズムが関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

申請者は、形成された後の血管の変化に着目し、血管がどのようにして成熟化・安定化して、階層的な構造が作られるかを解析してきた。その結果、血管成熟化を制御する因子 (Apelin) を世界で初めて同定し、機能の詳細を明らかにした (Kidoya H, et al. EMBO J. 2008. Blood. 2010. Oncogene. 2012)。さらに、胎生期における血管発生の解析から、新規の血管形成機構として、無血管領域へと血管が移動する「血管移動」を発見した (Kidoya H, et al. Dev Cell. 2015)。本研究では、血管新生に依存しない新しい血管形成過程である血管移動に着目し、腫瘍血管形成において血管移動が起きているのかを明らかにすることを目的とした。さらに、血管移動を制御する細胞・分子メカニズムの解明を進めた。これらの成果を基盤として、新たな概念に基づく腫瘍血管抑制療法の創出を目指す。

この目標の達成に向けて、生体イメージングによる組織学的な解析 (1: 腫瘍組織における血管移動の定義付け) と、細胞・分子レベルでの生物学的な解析 (2: 血管移動を制御する細胞群の解析) の両面から検討を進めた。

(1)腫瘍組織における血管移動の定義付け

多光子顕微鏡によるマウス担癌モデルの生体イメージング解析を進め、腫瘍組織において血管移動が起きているのかを明らかにする。また、血管新生阻害剤への治療抵抗性への関与についても検討した。

(2)血管移動を制御する細胞群の解析

これまでの解析から、発生期における血管移動には、ミエロイド系細胞群によるマトリックシリモデリングが働いていることが明らかとなっている。そこで、腫瘍組織における血管移動のメカニズムの解明に向けて、腫瘍組織に集積してくるエロイド系細胞群の特徴付けを細胞表面マーカーや発現分子から進め、血管移動に関与するミエロイド系細胞を同定した。

3. 研究の方法

(1)腫瘍組織における血管移動の定義付け

腫瘍組織での血管移動の検証は、多光子顕微鏡 (Leica, TCS SP8 MP) を用いた生体イメージングによる経時的な解析を基に進めた。血管にて特異的に蛍光を発する遺伝子改変マウス (apelin プロモーター-tomato BAC Tg マウス、以後は血管イメージングマウスとする) の頭蓋骨内表層部に GL261 グリオーマ細胞を同所移植して血管形成過程の経時的な撮影を行った。得られた画像から、血管の移動が腫瘍のどの領域で起き、どの方向に向かっているかを解析した。また、LLC 肺がん細胞の移植モデルにおいても血管イメージングマウスを用いて同様の解析を行い、血管移動が腫瘍血管形成において普遍的現象であるかを検証した。さらに、VEGF 阻害剤 (アキシチニブ) にて血管新生が抑制された場合に、血管移動の頻度等に変化が生じないかをイメージング解析にて検証した。

(2)血管移動を制御する細胞群の解析

発生過程においては、血管の周囲に動員される特殊なミエロイド系細胞群によるマトリックシリモデリング作用によって、血管移動が進行する。腫瘍血管の形成においてもミエロイド系細胞群の重要性は示唆されているが、血管形成における役割の詳細は解明されていない。そこでまず、腫瘍組織に集積してくるミエロイド系細胞群がどのような特徴を示すかを、フローサイトメーターによる細胞表面マーカーの解析から検討した。さらに、ミエロイド系細胞群をセルソーターにて回収し、10xgenomics によるシングルセル遺伝子発現解析をおこなった。近年、

ミエロイド系細胞には多様な表現型を示すサブセットの存在が報告されているため、このような分類形式に従って分別できるのかを検討した。また、ミエロイド系細胞群を血管周囲へ動員する分子機構の解明のため、シングルセル遺伝子発現解析から関与するケモカインの同定を進めた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍組織における血管移動の定義付け

血管イメージングマウスと2光子顕微鏡を用いた腫瘍血管の生体内イメージング解析を10日以上の上長期間にわたって行った結果、血管新生が腫瘍組織内の至る所で進む一方で、一部の血管が組織内を移動する様子が確認できた。また、腫瘍組織における血管の移動は、腫瘍辺縁部にある比較的成熟化している大きな血管が、腫瘍組織の中心部に向かって起きることが確認できた。さらに、血管新生阻害剤を投与した際には、血管の発芽が抑制される一方で、血管移動がより頻繁に起きることが生体内イメージング解析から示された。

(2) 血管移動を制御する細胞群の解析

腫瘍組織中のミエロイド系細胞をフローサイトメーターによる細胞表面マーカーの解析から検討したところ、CD11b陽性のミエロイド系細胞の中にはF4/80陰性、弱陽性、強陽性の細胞群が含まれており、さらにそれらの中にもLy6C陽性/陰性やLy6G陽性/陰性などの様々な細胞サブセットが含まれていることが

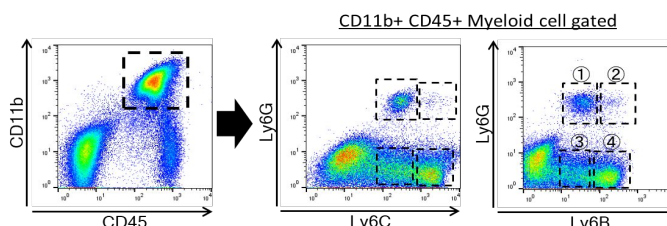


図1. ミエロイド系細胞の細胞表面マーカーの解析

示された(図1)。そこで、これらのミエロイド系細胞を回収してシングルセル遺伝子発現解析を進めたところ、フローサイトメーターによる解析結果と一致して、遺伝子発現プロファイルの異なる複数のミエロイド系サブセットが混在していた。血管移動はMMP9によって制御されていることが解っているため、これらの多様なミエロイド系サブセットの中でもMMP9を高発現するサブセットを同定し、血管制御ミエロイドと命名した。また、血管関連ミエロイド系細胞の生体イメージングを行うため、特異的に発現する遺伝子のプロモーター下で蛍光タンパク質を発現するイメージングマウスを作成した。さらに、シングルセル遺伝子発現解析から、血管制御ミエロイドにて特異的に発現する分子群を解析し、ケモカイン関連分子としてはCCL2の受容体が高発現していることを見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

Kivelä R, Hemanthakumar KA, Vaparanta K, Robciuc M, Izumiya Y, Kidoya H, Takakura N, Peng X, Sawyer DB, Elenius K, Walsh K, Alitalo K. Endothelial Cells Regulate Physiological Cardiomyocyte Growth via VEGFR2 -Mediated Paracrine Signaling. *Circulation*. 査読有, In press.

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036099.

Kidoya H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Hayashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S, Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. *Nat Commun*. 査読有, 2019, 10(1):1072.

doi: 10.1038/s41467-019-09028-w.

Hayashi Y, Jia W, Kidoya H, Muramatsu F, Tsukada Y, Takakura N. Galectin-3 Inhibits Cancer Metastasis by Negatively Regulating Integrin $\alpha 3$ Expression. *Am J Pathol*. 査読有, 2019, 189(4):900-910.

doi: 10.1016/j.ajpath.2018.12.005.

Naito H, Iba T, Wakabayashi T, Tai-Nagara I, Suehiro JI, Jia W, Eino D, Sakimoto S, Muramatsu F, Kidoya H, Sakurai H, Satoh T, Akira S, Kubota Y, Takakura N. TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity. *Dev Cell*. 査読有, 2019, 48(2):151-166.e7.

doi: 10.1016/j.devcel.2018.12.002.

Eino D, Tsukada Y, Naito H, Kanemura Y, Iba T, Wakabayashi T, Muramatsu F, Kidoya H, Arita H, Kagawa N, Fujimoto Y, Takara K, Kishima H, Takakura N. LPA4-Mediated Vascular Network Formation Increases the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy against Brain Tumors. *Cancer Res*. 査読有, 2018, 78(23):6607-6620.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0498.

Yamakawa D, Jia W, Kidoya H, Hosojima S, Torigata M, Zhang L, Takakura N. Visualization of Proliferative Vascular Endothelial Cells in Tumors in Vivo by

Imaging Their Partner of Sld5-1 Promoter Activity. *Am J Pathol*. 査読有, 2018, 188(5):1300-1314.

doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.015.

Wakabayashi T, Naito H, Suehiro JI, Lin Y, Kawaji H, Iba T, Kouno T, Ishikawa-Kato S, Furuno M, Takara K, Muramatsu F, Weizhen J, Kidoya H, Ishihara K, Hayashizaki Y, Nishida K, Yoder MC, Takakura N. CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties. *Cell Stem Cell*. 査読有, 2018, 22(3):384-397.e6.

doi: 10.1016/j.stem.2018.01.010.

Yoshida M, Ishioka Y, Ozawa T, Okuyama H, Iguchi M, Ota T, Ito T, Nagira M, Morita A, Tanaka H, Naito H, Kidoya H, Takakura N. Soluble HLA-associated peptide from PSF1 has a cancer vaccine potency. *Sci Rep*. 査読有, 2017, 7(1):11137.

doi: 10.1038/s41598-017-11605-2.

Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y, Iba T, Wakabayashi T, Muramatsu F, Kidoya H, Fukuhara S, Mochizuki N, Ishii S, Kishima H, Takakura N. Lysophosphatidic Acid Receptor 4 Activation Augments Drug Delivery in Tumors by Tightening Endothelial Cell-Cell Contact. *Cell Rep*. 査読有, 2017, 20(9):2072-2086.

doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.080.

Matsushita J, Inagaki S, Nishie T, Sakasai T, Tanaka J, Watanabe C, Mizutani KI, Miwa Y, Matsumoto K, Takara K, Naito H, Kidoya H, Takakura N, Nagai T, Takahashi S, Ema M. Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Angiogenesis in Flk1-Nano-lantern Transgenic Mice. *Sci Rep*. 査読有, 2017, 7:46597.

doi: 10.1038/srep46597.

Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N. Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J Biochem*. 査読有, 2017, 162(1):55-62.

doi: 10.1093/jb/mvx001.

Hiramatsu M, Hishikawa T, Tokunaga K, Kidoya H, Nishihiro S, Haruma J, Shimizu T, Takasugi Y, Shinji Y, Sugiu K, Takakura N, Date I. Combined gene therapy with vascular endothelial growth factor plus apelin in a chronic cerebral hypoperfusion model in rats. *J Neurosurg*. 査読有, 2017, 127(3):679-686.

doi: 10.3171/2016.8.JNS16366.

Yamane K, Naito H, Wakabayashi T, Yoshida H, Muramatsu F, Iba T, Kidoya H, Takakura N. Regulation of SLD5 gene expression by miR-370 during acute growth of cancer cells. *Sci Rep*. 査読有, 2016, 6:30941.

doi: 10.1038/srep30941.

Naito H, Wakabayashi T, Kidoya H, Muramatsu F, Takara K, Eino D, Yamane K, Iba T, Takakura N. Endothelial Side Population Cells Contribute to Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Drug Resistance. *Cancer Res*. 査読有, 2016, 76(11):3200-10.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2998.

[学会発表](計 20 件)

アンジオクラインファクターが織りなす腫瘍微小環境の調和、木戸屋 浩康、日本薬学会第 139 年会、2019 年

白血病の骨髄微小環境にて生じる負の連鎖の解明、木戸屋 浩康、第一回 日本医学会連合 Rising Star リトリート 2019 年

癌幹細胞を制御するアンジオクラインファクターの解析、木戸屋 浩康、第二回 がんと代謝研究会若手の会、口頭発表、2019 年

Reg1 による造血幹細胞の恒常性維持機構の解析、木戸屋 浩康、CVMW2018 心血管代謝週間 (第 26 回 日本血管生物医学会学術集会) 2018

腫瘍血管形成の時間軸を埋めるレトロスペクティブ 4D イメージング、木戸屋 浩康、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

Regnase-1 decides the fate of hematopoietic stem cells by regulating the balance between differentiation and proliferation、Hiroyasu Kidoya, Teppei Shimamura, Yumiko Hayashi, Fumitaka Muramatsu, Weizhen Jia, Nobuyuki Takakura、The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology、2018

Molecular and Cellular Mechanisms for the Regulation of Arterial and Venous Vascular Structure、Hiroyasu Kidoya, Yumiko Hayashi, Fumitaka Muramatsu, Nobuyuki Takakura、20th International Vascular Biology Meeting 2018 (IVBM2018)、2018 年

造血幹細胞のがん化に關与するリボヌクレアーゼの同定、木戸屋 浩康、島村 徹平、國崎 祐也、村松 史隆、林 弓美子、高倉 伸幸、第 6 回がん代謝研究会、2018 年

癌微小環境が生みだす負の連鎖、木戸屋 浩康、第 4 回血管生物若手研究会、2018 年

造血幹細胞の細胞運命を決定するリボヌクレアーゼの解析、木戸屋 浩康、島村 徹平、

林 弓美子、村松 史隆、高倉 伸幸、平成 29 年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、2018 年

血管に構造・機能的な多様性を生み出すアンジオクラインファクター (Angiocrine-factors bestow structural and functional diversity of blood vessels)、木戸屋 浩康、林 弓美子、村松 史隆、高倉 伸、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

血管束移動は腫瘍血管形成の概念を変えるか？ Do "vascular strand invasion" change the concept of tumor angiogenesis?、木戸屋 浩康、大阪大学医学系研究フォーラム 第 9 回若手研究フォーラム、2017 年

Regulation of blood vessel patterning through reciprocal signals, Hiroyasu Kidoya, 11th International Symposium of The Institute Network "Frontiers in Biomedical Sciences", 2017 年

造血幹細胞の分化運命を決定する新たな機構-リボヌクレアーゼ sReg1 の解析-、木戸屋 浩康、島村 徹平、村松 史隆、林 弓美子、高倉 伸幸、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

sReg1 decides the fate of hematopoietic stem cell and is responsible for leukemic progression. 木戸屋 浩康、島村 徹平、村松 史隆、林 弓美子、高倉 伸幸、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年

Regulation of arterial and venous vascular patterning through apelin-APJ system. Hiroyasu Kidoya. 19th International Vascular Biology Meeting. 2016 年

Thermoregulatory role of juxtapositional aligned arterial and venous vessels in the skin. Hiroyasu Kidoya. The 27thCDB Meeting-Body Surface Tactics. 2016 年

造血幹細胞の自己複製を制御する sReg1 は、急性白血病の原因分子となる、木戸屋 浩康、村松 史隆、買 維臻、林 弓美子、高倉 伸幸、第 7 回 Molecular Cardiovascular Conference II、2016 年

Molecular and Cellular Mechanisms for the Regulation of Arterial and Venous Vascular Structure. Hiroyasu Kidoya, Yumiko Hayashi, Fumitaka Muramatsu, Nobuyuki Takakura. The 12th International Congress of Cell Biology. 2016 年

Regulation of arteries and veins patterning through apelin-APJ system. Hiroyasu Kidoya. "New Era of Angiogenesis Research" symposium. 2016 年

〔図書〕(計 3 件)

木戸屋 浩康、村松 史隆、生体イメージング解析が解き明かす真の腫瘍血管形成モデル、月刊「細胞 (Cell)」(ニューサイエンス社)、11 月号、2018、p562-565

木戸屋 浩康、血管の「かたち」をつくる細胞たち、生命誌(JT 生命誌研究館)、Vol.92-95、2017、p110-112

木戸屋 浩康、学術交流を変革する、新しいカタチ、実験医学(羊土社)、Vol.34 No.8、2016、p1342

〔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://st.biken.osaka-u.ac.jp/member/kidoya>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：林 弓美子

ローマ字氏名：(HAYASHI, Yumiko)

研究協力者氏名：村松 史隆

ローマ字氏名：(MURAMATSU, Fumitaka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。