

平成 22 年 4 月 3 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014020

研究課題名（和文） がん組織における血管内皮細胞増殖のシグナリング機構

研究課題名（英文） Signaling mechanism of tumor angiogenesis.

研究代表者

渋谷 正史 (SHIBUYA MASABUMI)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10107427

研究成果の概要（和文）：血管内皮増殖因子 VEGF の受容体 2 (VEGFR2)からのシグナル伝達系の特徴を個体レベルで明らかにした。VEGFR1 も脳腫瘍をはじめ固形癌の増殖に重要な役割を果たすこと、その際、VEGFR-1 発現骨髄細胞が深く関与することを見出した。血管障害療法に対する癌細胞の抵抗性の機序として、細胞内代謝系の変化を明らかにした。内因性血管障害因子 TSP1 の新たな作用機序を見出した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that (1) vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) utilizes unique signaling via a single tyrosine by using mutant mouse model, and (2) VEGFR-1 plays an important role in growth of tumors including brain tumor in vivo mostly via activation of VEGFR-1+ bone-marrow-derived cells. Furthermore, we showed that resistance of tumors against antiangiogenic therapy is partly dependent on a metabolic shift under stresses. In addition, we found new pathway for the function of endogenous antiangiogenic protein TSP1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	33,700,000	0	33,700,000
2006 年度	34,100,000	0	34,100,000
2007 年度	34,100,000	0	34,100,000
2008 年度	34,000,000	0	34,000,000
2009 年度	34,000,000	0	34,000,000
総計	169,900,000	0	169,900,000

研究分野：血管生物学、腫瘍学、分子生物学

科研費の分科・細目：がん特定・がん特性

キーワード：VEGFR、マクロファージ、腫瘍血管、血管障害療法、低酸素・低栄養ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 2003-4 年に至り、VEGF に対する中和抗体が大腸癌に対する第 3 相臨床試験で有効と判定され、医学の歴史上初めて血管新生障害療法が成立した。これは極めて画期的なことであるが、血管新生制御の中心を担うと考

えられる VEGF-VEGFR 系の特徴やシグナルの詳細は不明の点が多かった。我々は 1990 年に、現在 VEGFR-1 として知られる新規チロシンキナーゼ型受容体 Flt-1 を世界に先駆けて発見していたことから、VEGF の受容体として血管内皮に発現する VEGFR-1 と

VEGFR-2 のシグナルの特徴を明らかにすることは必須と考えられた。

(2)さらに、VEGF 中和抗体などによる癌治療に対して癌細胞がどう反応し、どのような抵抗性獲得の経路をもつかも全く不明の状態であった。その問題の解明と解決法の検討は急務となりつつある。

(3)生物の体内には血管新生の促進物質とともに、抑制物質も存在してバランスを取っていると考えられる。しかし、その種類や作用機序については不明の点が多く、利用法も確立していない。

2. 研究の目的

(1) 血管新生のポジティブシグナル伝達において中心的役割を果たす VEGFR-2 について、1 アミノ酸変異をもつマウスを作成し、個体レベルでその特徴を明らかにする。

(2) チロシンキナーゼ活性はやや低いマクロファージ系細胞にも発現する VEGFR-1 について、癌の増殖や、炎症性疾患における役割を解明する。

(3) 癌細胞が血管新生阻害療法に晒された時に、どのような反応を生じて抵抗性獲得に結びつくかをモデル系を作成して検討する。

(4) 内因性血管阻害物質と考えられる TSP-1 (トロンボスポニン-1), BMP4 について、その作用機序を明らかにし、臨床応用への可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 血管内皮細胞培養系において VEGFR-2 の主要な増殖シグナルに関与すると考えられる VEGFR-2 1173 チロシンについて、フェニルアラニンへの 1 アミノ酸変異をもつノックインマウスを作成する。

(2) VEGFR-1 のシグナル伝達の重要性については、我々が既に作成した VEGFR-1 (Flt-1) チロシンキナーゼ欠損 (TK-/-) マウスを最大限利用する。すなわち、野生型マウスと VEGFR-1 TK-/- マウスをペアで用い、同じ癌細胞を皮下移植する。移植後、腫瘍の増殖速度を計測して比較する。骨髄移植により VEGFR-1 TK-/- マウス由来の骨髄を移植したマウスも利用する。

(3) 血管新生阻害療法を受けた癌細胞は、低酸素・低栄養の二重ストレスを受けると考えられる。そこで、*in vitro* 培養系において癌細胞に低酸素・低栄養二重ストレスを与える系を作成し、それを 5-10 回繰り返した後、癌細胞の代謝やシグナル伝達の変化、個体レベルの造腫瘍性の変化を調べる。

(4) TSP-1 や BMP ファミリータンパクを血管内皮細胞の培養系に添加し、それらが内皮細胞の細胞周期やアポトーシス経路に変化を与えるかを検討する。

4. 研究成果

(1) VEGFR-2 (Flk-1) の 1173 変異 (VEGFR-2 1173F/F) マウスは、VEGFR-2 受容体タンパクやキナーゼ活性は保たれているにも関わらず血管発生/新生に強い欠損を示し、E9.0 付近で胎生致死となった。一方、1212F/F 変異マウスでは特に異常は認められず、発生や生殖などもほぼ正常であった。これらのことは、1173 自己リン酸化チロシンからのシグナル (主には PLC-gamma-PKC-MAPK 経路) が個体レベルの血管新生にも極めて重要であることを示したもので、このような 1 アミノ酸変異マウスによる解析は世界的に最初のものである。

(2) VEGFR-1 TK-/- マウスにおいては、子宮癌 HSML やメラノーマ B16 の増殖が 30-60% 程度抑制されることを見出した。さらに骨髄移植により VEGFR-1 TK-/- 骨髄をもつマウスも同様の癌増殖遅延を示した。このことは、VEGFR-1 シグナルは癌の増殖に促進的作用をもつこと、その作用は主には骨髄細胞によって担われていること、を示している。VEGFR-1 チロシンキナーゼは、癌抑制のためのひとつの分子標的と考えられる。リウマチモデルマウスにおいても、VEGFR-1 TK-/- マウスでは症状の軽減が認められた。従って、関節リウマチにおいても、VEGFR-1 は症状の軽減のための重要な標的と考えられる。

(3) 低酸素・低栄養の二重ストレスに晒した癌細胞 (B16 メラノーマ) は細胞内代謝を変化させ、形態変化と生存シグナルの亢進、転移能の亢進、などを示すことが明らかとなった。また、ヒト癌細胞にも共通にヒストン修飾酵素ファミリーの一部の遺伝子発現亢進が認められ、バイオマーカーとなることが示された。

(4) TSP-1 は、従来報告されているアポトーシス誘導とは異なり、血管内皮細胞の G1 期停止を誘導することを見出した。BMP4 は、静脈系および毛細血管内皮細胞を効率よくアポトーシスに導くこと、一方、抑制性 Smad の発現の高い動脈系内皮細胞は BMP4 に対して抵抗性を示すことを見出した。内皮細胞の種類によって抑制性 Smad の発現に差があり、これが BMP4 感受性を規定する重要な因子と考えられた。これら内因性血管阻害タンパクの作用機序がかなり明らかになったことから、臨床応用が期待される。

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 67 件)

1. Beck H, Raab S, Copanaki E, Heil M, Scholz A, Shibuya M, Deller T, Machein M, Plate KH. VEGFR-1 signaling regulates the homing of bone

- marrow derived cells in a mouse stroke model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69:168-175, 2010.
2. Murohashi M, Nakamura T, Tanaka S, Ichise T, Yoshida N, Yamamoto T, Shibuya M, Schlessinger J, Gotoh N. An FGF4-FRS2 α -Cdx2 axis in trophoblast stem cells induces BMP4 to regulate proper growth of early mouse embryos. *Stem Cells.* 28:113-121, 2010.
 3. Osawa, T., Muramatsu, M., Watanabe, M., and Shibuya, M. Hypoxia and Low Nutrition Double Stress Induces Aggressiveness in a Murine Model of Melanoma. *Cancer Sci.*, 100:844-851, 2009.
 4. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med.* 206:1089-102, 2009
 5. Wittko IM, Schänzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, Raab S, Plate KH. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J. Neurosci.*, 29: 8704-8714, 2009.
 6. Xiong Y, Huo Y, Chen C, Zeng H, Lu X, Wei C, Ruan C, Zhang X, Hu Z, Shibuya M, Luo J. VEGF Receptor-2 Y1175 signaling controls VEGF-induced vWF release from endothelial cells via PLC γ 1- and PKA-dependent pathways. *J Biol Chem*, 284: 23217-2324, 2009.
 7. Murakami, M. Zheng Y, Hirashima M, Suda T, Morita Y, Ooehara J, Ema H, Fong GH, Shibuya M. VEGFR1 Tyrosine Kinase Signaling Promotes Lymphangiogenesis as Well as Angiogenesis Indirectly via Macrophage Recruitment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 658-664, 2008.
 8. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nature Cell Biol.* 10:1349-1355, 2008
 9. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nature Cell Biol* 10: 513-526, 2008.
 10. Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, Jugold M, Kiessling F, Heil M, Tchaikovski V, Waltenberger J, Shibuya M, Plate KH, Machein MR. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. *Cancer Res* 68: 7342-7351, 2008.
 11. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellstrom M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Yla-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 54: 656-660, 2008
 12. Zheng Y, Watanabe M, Kuraishi T, Hattori S, Kai C, and Shibuya M. Chimeric VEGF-E_{NZ7}/PIGF Specifically Binding to VEGFR-2 Accelerates Skin Wound Healing via Enhancement of Neovascularization. *Arterioscler, Thromb, Vasc. Biol.*, 27:503-511, 2007.
 13. Wirzenius, M., Tammela, T., Uutelaff, M., He, Y., Odorisio, T., Sambruno, G., Nagy, JA, Dvorak, HF, Yla-Herttuala, S., Shibuya, M., and Alitalo, K. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J. Exp. Med.* 204:1431-1340, 2007.
 14. Yamauchi, M., Imajoh-Ohmi, S., and Shibuya, M. A novel anti-angiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle. *Cancer Science*, 98:1491-1497, 2007.
 15. Kiyono, M. and Shibuya, M. Inhibitory Smad transcription factors protect arterial endothelial endothelial cells from apoptosis induced by BMP4. *Oncogene*, 25, 7131-7137, 2006.
 16. Zheng, Y., Murakami, M., Takahashi, H., Yamauchi, M., Kiba, A., Yamaguchi, S., Yabana, N., Alitalo, K., and Shibuya, M. Chimeric VEGF-E_{NZ7}/PIGF Promotes Angiogenesis via VEGFR-2 without Significant Enhancement of Vascular Permeability and Inflammation. *Arterioscler, Thromb, Vasc. Biol.*, 26, 2019-2026, 2006.
 17. Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophages. *Blood*, 108, 1849-1856, 2006.
 18. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Agnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshthi PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson

JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, Gerber HP, De Falco S, Witta J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 443, 993-997, 2006.

19. Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y., and Shibuya, M. Membrane-fixation of VEGFR1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis/angiogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 346-354, 2005.

20. Hiratsuka, S., Kataoka, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Morikawa, S., Tanaka, S., Katsuki, M., Maru, Y., and Shibuya, M. VEGF-A is involved in guidance of VEGF-receptor-positive cells to the anterior portion of early embryos. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 355-363, 2005.

21. Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shibuya M. Essential role of Flk-1 (vascular endothelial growth factor receptor-2) tyrosine residue-1173 in vasculogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1076-1081, 2005.

22. Niida, S., Kondo, T., Hiratsuka, S., Hayashi, S.-I., Amizuka, N., Noda, T., Ikeda, K., and Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling is essential for osteoclast development and bone-marrow formation in CSF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 14016-14021, 2005.

[学会発表] (計 50 件)

1. Shibuya, M. (invited speaker, plenary lecture), "A Unique Signal Transduction of VEGF Family Members, VEGF-A and VEGF-E." in the Int. Symposium on the Molecular and cellular mechanisms of angiogenesis, Chester Univ., UK, 15-17 July, 2009.

2. Shibuya, M. (invited speaker), "VEGF-dependent and -independent regulation of angiogenesis" in 7th Int. Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Vienna, Austria, September, 2-5 September, 2009

3. Shibuya, M. (invited speaker), "Involvement of VEGF-VEGFR System in the Progression of Cancer including Brain Tumors.", 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, Yokohama, Japan, 11-14 May, 2009.

4. Shibuya, M. (invited speaker), "VEGF-dependent and -independent regulation of angiogenesis" KSMBMB, Seoul, Korea, 29-30 October, 2009

5. Shibuya, M. (invited speaker) "VEGF-dependent

and independent regulation of angiogenesis." International Symposium, Vascular Differentiation and Remodeling, Frankfurt, Germany, 16-19 July, 2008.

6. Shibuya, M. (invited speaker) "VEGFR-1 is involved in tumor-growth and metastasis including melanoma." The IPCC (International Pigment Cell Conference)-Melanoma Meeting-, Sapporo, 7-11 May, 2008.

7. Shibuya, M. (invited speaker) "VEGF-dependent and -independent regulation of angiogenesis." The US-Japan Cancer Research Workshop, Kyoto, 19-21 March, 2008.

8. Shibuya, M. (invited speaker) "VEGFR1 is involved in a variety of diseases, tumor growth/metastasis and rheumatoid arthritis." ESH EuroConference on Angiogenesis, Albufeira, Portugal, 11-14 May, 2007.

9. Shibuya, M. (invited speaker) "A unique signal transduction of VEGF receptors involved in tumor angiogenesis and metastasis." The 22nd Nagoya International Cancer Treatment Symposium, Nagoya, 25 Oct., 2007.

10. Shibuya, M. (invited speaker) "VEGF-dependent and -independent regulation of angiogenesis" The Joint Scientific Meeting of Vascular Biology Organization in Asia Pacific Region, Tainan, Taiwan, 20-21 Oct., 2007.

11. Shibuya, M. (invited speaker) "A unique signal transduction of VEGF receptors is involved in tumor angiogenesis and metastasis", Third International Conference on Tumor-stroma interaction, Ascona, Switzerland, 27-31 Oct., 2007.

12. Shibuya, M. (invited speaker) "VEGF-dependent and independent regulation of angiogenesis". The First Pacific Meeting for Angiogenesis and Lymphangiogenesis, Jeju Island, Korea, 12-14 Nov., 2007.

13. Shibuya, M. (invited speaker), "VEGF-receptor signaling, and its application for pro-angiogenic therapy" ESH (European School of Hematology) Vascular Biology Meeting. Cannes, France, 13-16 May, 2006.

14. Shibuya, M. (invited speaker, chairman), "VEGF-dependent and independent regulation of angiogenesis." 20th IUBMB-Kyoto, Symposium on angiogenesis and lymphangiogenesis. Kyoto, Japan, 18-23 June, 2006.

15. Shibuya, M. (invited speaker), "VEGF signaling toward angiogenesis and vascular permeability."

KCIST 2006-Vascular Biology and Human Disease, Anmyondo, Korea, 20-22 July, 2006.

16. Shibuya, M. (invited speaker), "Involvement of VEGFR-1 in lymphangiogenesis in vivo" Gordon Research Conference on lymphangiogenesis, Les Diablerets, Switzerland, 2-8 Sept, 2006.

17. Shibuya, M. (invited speaker), "Involvement of VEGF and its receptor system in tumor growth and metastasis." The Joint Meeting of 3rd ISC-ICCT and 11th ISCC, Tokyo, 6-8 Dec., 2006.

18. Shibuya, M. (invited speaker), "VEGF-dependent and independent regulation of angiogenesis", ESH (European School of Hematology) Vascular Biology Meeting, Spain, 27-29 May, 2005.

19. Shibuya, M. (invited speaker, special lecture), "Molecular basis of angiogenesis", Korea-Japan Vascular Biology Meeting, Korea, 11-12 Aug., 2005.

20. Shibuya, M. (invited speaker), "VEGF-receptor signaling towards angiogenesis and vascular permeability", Gordon Research Conference, Angiogenesis and Microcirculation, Rhod-island, USA, 14-18 Aug., 2005.

21. Shibuya, M. (invited speaker, Keynote lecture), "Molecular Mechanism of Angiogenesis", Third European Symposium on Vascular Biology and Medicine, Hamburg, Germany, 30 Sept., 2005.

22. Shibuya, M. (invited speaker), "Novel VEGF family members define the differential signals for angiogenesis and vascular permeability", ESH Angiogenesis Meeting, Ascona, Switzerland, 1-5 Oct., 2005.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：骨形成因子をもちいた癌増殖抑制法

発明者：渋谷正史、土田里香、大澤 毅

権利者：東京医科歯科大学

番号：特願 2009-176442

出願年月日：2009 年 7 月 29 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 正史 (SHIBUYA MASABUMI)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10107427

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

(なし)