

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22562

研究課題名(和文)腫瘍血管における新しい内皮細胞の探索と新規血管阻害療法の開発

研究課題名(英文) Research on endothelial heterogeneity in the tumor vasculature and development of new anti-angiogenic therapy

研究代表者

内藤 尚道(Naito, Hisamichi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：30570676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス腫瘍モデルを用いて、腫瘍血管を構築する全血管内皮細胞を1細胞レベルで遺伝子発現解析を行い、腫瘍血管内皮細胞の多様性を解明することを目的とした。これまで血管内皮細胞は全て均一であると考えられてきたが、本研究で実施した1細胞遺伝子発現解析の結果、血管内皮細胞の遺伝子発現は多様性に富むことが明らかになった。また腫瘍血管内皮細胞には正常組織の血管内皮細胞とは明らかに遺伝子発現が異なる細胞集団が存在することが明らかになった。その腫瘍特異的血管内皮細胞集団で高発現している遺伝子と発現低下している遺伝子を同定した。今後これらの遺伝子を標的として、新たな血管新生阻害剤が開発できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎えた日本において効果的ながんの治療法の開発は、生活の質を向上させるために取り組むべき重要な課題である。腫瘍が増大するためには、腫瘍を栄養する血管が必要である。この腫瘍血管を標的とした治療薬は既に臨床応用されているが、その効果は未だ不十分である。本研究により、腫瘍血管内皮細胞の多様性が明らかとなり、さらには腫瘍血管に特異的な血管内皮細胞集団を同定することができた。今後、同定した血管内皮細胞を標的とする新たな血管新生阻害剤の開発につながる可能性が期待でき、学術的にも社会的にも意義のある成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to identify tumor endothelial cell (EC) heterogeneity by single cell analysis of whole ECs isolated from mouse tumor model. It is believed that all ECs are equal and possess high plasticity and proliferative potential. However, the result of single analysis suggests that they are heterogeneous in terms of gene expression and can be clustered to several distinct subpopulations. Interestingly, we found tumor specific EC subpopulation which is not detected in normal tissue. This subpopulation clearly shows different gene expression profile compared to that of any EC subpopulation in normal tissue. We identified several genes which are highly and lowly expressed in this specific EC subpopulation. These genes may be a new target for developing novel anti-angiogenic drugs in the future.

研究分野：腫瘍血管医学

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 血管新生阻害療法 細胞多様性 薬剤耐性 血管内皮幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

血管の内腔を覆う一層の扁平上皮細胞である血管内皮細胞は、定常状態では安定した休眠期にあることが知られている。しかし組織損傷や炎症などで、血管新生が誘導されると、既存の血管内皮細胞は短期間に活性化し、新たに多数の血管内皮細胞を産生して新規血管を構築する。この既存の血管から新たな血管が構築される過程は血管新生と呼ばれ、発生期における臓器の形成や腫瘍を含む様々な疾患の病態形成に深く関与していることが知られている。血管新生の過程は複数のステップに分けて考えることができる。最初に血管新生を誘導する要因が生じ、組織が低酸素状態となると、VEGFなどの血管内皮細胞の増殖を誘導するサイトカインが産生される。産生されたサイトカインにより血管内皮細胞は活性化し、Tip細胞と呼ばれる血管新生を先導する血管内皮細胞が形成され、さらにその後ろに増殖活性が高いStalk細胞が形成され、Tip細胞とStalk細胞が一体となって新規の血管を形成する。血管新生に関わるこれらの血管内皮細胞の表現型は環境依存的で一過性であるとされ、これまでの血管生物学では、血管新生に関わる血管内皮細胞は全て等しく、どの細胞も同じ能力を持つとされてきた。

申請者らは、このような概念は必ずしも正しくはなく、急速に大量の血管内皮細胞を産生する必要がある状況下では、幹細胞様の性質を持つ特殊な血管内皮細胞が、その役割を担うのではないかと仮説のもと、血管内皮細胞の多様性と幹細胞性に関する解析に取り組んできた。その結果、正常組織の末梢血管の血管内皮細胞には、幹細胞様の特殊な性質を持つ血管内皮細胞の存在を明らかにしてきた。

そしてこれまでの解析過程で、腫瘍の血管内皮細胞にも同様に増殖能という点で血管内皮細胞の多様性が存在する可能性を示す予備実験結果が得られている。腫瘍血管における特殊な血管内皮細胞は、他の腫瘍血管内皮細胞や正常な血管内皮細胞とは明らかに異なる遺伝子発現パターンを示し、薬剤耐性に関わる遺伝子を高発現していた。そのため、このような特殊な血管内皮細胞が存在していることや、未知なる血管内皮細胞の多様性が、既存の血管新生阻害剤に対する薬剤耐性化の一因ではないかと仮定のもと、研究に取り組んできた。腫瘍血管を構築する全ての血管内皮細胞の遺伝子発現特性を明らかにして、血管内皮細胞の多様性を明らかにすることができれば、新たながん治療標的が見つかることができ、がんの克服に貢献できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス腫瘍モデルを用いて、腫瘍血管を構築する全腫瘍血管内皮細胞を1細胞レベルで遺伝子発現解析を行い、①腫瘍血管内皮細胞中の内皮幹細胞の同定、②腫瘍血管内皮細胞の細分化による新しい内皮細胞分画の同定を目的とする。そして、③細分化された腫瘍血管内皮細胞の各分画の遺伝子発現情報をもとに、新たな血管新生阻害療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

8-12週齢のC57BL/6マウスに、Lewis lung carcinoma (LLC) 肺がん細胞株を皮下移植して腫瘍を作製して解析を行った。表面抗原の傷害を避け、遺伝子発現情報が変化しないように短時間で腫瘍を分散する方法を、既存の方法を改変し、新たな方法を確立して実験を行った。

### 1) 腫瘍血管内皮細胞の分離とシングルセル解析

マウス LLC 皮下腫瘍モデルから CD31+CD45-Podoplanin-の腫瘍血管内皮細胞を FACS にて分離した。10X シングルセルシステムを用いてプロトコールに則り解析を行なった。腫瘍血管内皮細胞のライブラリーを作製後 MGI seq を用いてシークエンスを行った。得られたデータは 10x 社の解析プラットフォーム Loupe Cell Browser と Seurat R パッケージを用いて解析した。

### 2) 腫瘍血管内皮細胞の細分化と内皮幹細胞の同定

遺伝子発現情報を Seurat R パッケージで解析し、死細胞除去、ダブレット除去を行った上で、主成分分析、t-SNE および u-MAP による高次元データの圧縮を行い、二次元座標上で腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現を可視化して、個々の腫瘍血管内皮細胞の位置づけをおこなった。また、階層的クラスタ解析による樹形図を作製した。正常組織血管内皮細胞のシングルセル解析の情報と比較して、遺伝子発現が類似するクラスタを抽出することで細分化された腫瘍血管内皮細胞の意義を明らかにした。腫瘍内皮細胞の各副次集団において、発現の高い遺伝子をリスト化して、それぞれの集団の特徴付けを行い、選択的発現を示す遺伝子を 10 個以上抽出した。

### 3) 腫瘍血管内皮細胞分画に特異的に発現する遺伝子の機能解析

抽出した遺伝子群の中から、免疫染色可能な因子を抽出して、市販の抗体で腫瘍血管内皮細胞の免疫染色をおこなった。また遺伝子発現情報を基に、細胞機能や増殖能力に関与すると考えられる因子を絞り込み、培養血管内皮細胞で過剰発現もしくはノックダウンを行い、遺伝子の機能解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 腫瘍血管内皮細胞の分離とシングルセル解析

これまで正常組織から血管内皮細胞を分離するためには、3種類の酵素（ジスパーゼと2種のコラゲナーゼ）を用いて、機械的刺激を与えることで、段階的に組織を分散して、フローサイトメーター（FACS）を用いて分離していた。腫瘍は正常組織とは異なり、機械的刺激は必要なく、短時間で容易に血管内皮細胞の分離が可能である。最初に組織分散方法の最適化を行い、短時間で腫瘍を分散する方法を新たに開発した。

その分散方法を用いて、マウス皮下腫瘍を1細胞レベルまで分散してFACSで解析した。腫瘍組織の細胞をFSC、SSCにて絞り込み、PI色素にて死細胞除去を行い、さらにダブレットの除去を行った。Podoplanin陽性の細胞を除外した後CD31、CD45で展開すると血管内皮細胞分画が約2%の比率で検出できた（図1）。血管内皮細胞をFACSで分離して、さらに1細胞となるように工夫を加えて細胞調整を行い、10xシングルセルシステムのプロトコールに則り、cDNAの合成とNGSライブラリを作製した。さらに1細胞あたり10万リード割り当てることを想定して、シーケンスを行なった。

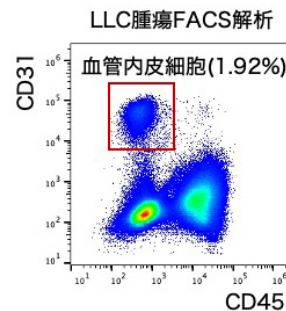


図1 マウスLLC腫瘍を分散して細胞のFACS解析結果。  
枠で囲まれた約2%の細胞集団が血管内皮細胞である。

##### 2) 腫瘍血管内皮細胞の細分化と内皮幹細胞の同定

得られた情報をSeurat Rパッケージで解析した。死細胞の除去、ダブレットの除去を行い、主成分分析、t-SNEおよびu-MAPによる高次元データの圧縮を行った（図2）。その結果、腫瘍血管内皮細胞は複数のクラスターに細分化できることが明らかとなった。各分画の遺伝子発現情報をもとに、それぞれのクラスターの性質を推測した結果、正常組織では認められない、明らかに異なる細胞分画が存在していた。また正常組織の血管内皮幹細胞マーカーは腫瘍血管内皮細胞では多数の細胞で認め、正常組織とは異なっていた。また細胞分裂の指標は一部の細胞で選択的に発現を認めた（図2）。

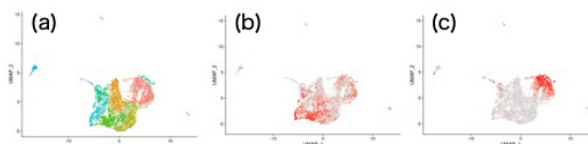


図2 マウス腫瘍血管内皮細胞のシングルセル解析結果。  
(a)血管内皮細胞は複数のクラスターに細分化される。  
(b)正常組織の血管内皮幹細胞マーカーの発現パターン。  
(c)細胞増殖の指標となる遺伝子の発現パターン。

##### 4) 腫瘍血管内皮細胞分画に特異的に発現する遺伝子の機能解析

正常組織では認めない血管内皮細胞分画に着目して解析を行なった。本分画で高発現している遺伝子、発現が低下している遺伝子を抽出した。高発現している遺伝子は、免疫染色可能な抗体を購入して、腫瘍切片を用いて免疫染色をおこなった。複数の遺伝子は一部の腫瘍血管内皮細胞で発現を認められた。発現を認めた遺伝子に関して、培養血管内皮細胞で発現を確認すると、培養血管内皮細胞でも発現している遺伝子を認めた。その遺伝子を、siRNAを用いてノックダウンを行い、細胞機能の解析を行なった。また発現が低下していた遺伝子はクローニングを行い、培養細胞で過剰を行なった。ノックダウンまたは過剰発現を行なった培養血管内皮細胞の薬剤に対する特徴を明らかにするために、既存の血管新生阻害剤の存在化で培養実験を行い、その応答性を解析した。これらの結果から統合的に判断すると、腫瘍血管内皮細胞には増殖能力の高い血管内皮細胞分画が存在し、その分画が薬剤耐性化の一因である可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naito Hisamichi、Iba Tomohiro、Takakura Nobuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naito Hisamichi、Wakabayashi Taku、Ishida Masako、Gil Chang-Hyun、Iba Tomohiro、Rahmawati Fitriana Nur、Shimizu Shota、Yoder Mervin C.、Takakura Nobuyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Isolation of tissue-resident vascular endothelial stem cells from mouse liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1066 ~ 1081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-019-0276-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iba Tomohiro、Naito Hisamichi、Shimizu Shota、Rahmawati Fitriana Nur、Wakabayashi Taku、Takakura Nobuyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Isolation of tissue-resident endothelial stem cells and their use in regenerative medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-019-0098-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naito Hisamichi、Takakura Nobuyuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Identification of vascular endothelial stem cells and endothelial heterogeneity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 489 ~ 495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2491/jjsth.30.489	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 血管内皮細胞の多様性と血管新生のメカニズム
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 腫瘍血管内皮細胞の薬剤耐性化機構と内皮細胞の多様性
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 血管内皮細胞の多様性の解明とその臨床応用
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 虚血時血管新生における内皮細胞の一細胞遺伝子発現動態解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学微生物病研究所情報伝達分野ホームページ  
<http://st.biken.osaka-u.ac.jp/>  
研究成果 (Nature Protocols) の詳細  
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/research/2020/136>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------