

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590910

研究課題名（和文） 骨髄由来血管内皮前駆細胞の制御によるがん治療の検討

研究課題名（英文） The study of cancer treatment by regulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells.

研究代表者

大崎 能伸 (OHSAKI YOSHINOBU)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30191935

研究成果の概要（和文）：骨髄由来血管内皮前駆細胞における PGI₂-IP signaling は新生血管の形成にきわめて重要であり、かつ腫瘍の増殖に重要な役割を果たしている。また、骨髄由来血管内皮前駆細胞を含めた骨髄由来細胞における PGI₂-IP signaling は肺癌の肺転移に大きく関与していることを立証した。本研究は PGI₂-IP signaling を標的としたこれからの肺癌治療の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：PGI₂-IP signaling in EPCs is crucial for neovascularization, and plays an important role for tumor growth. PGI₂-IP signaling in bone marrow-derived cells (BMDCs), including EPCs, participates in the process of the formation of lung tumor metastasis in lung very much. We showed the possibility of lung cancer treatment targeting PGI₂-IP signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：EPCs、PGI₂-IP signaling、肺癌

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来血管内皮前駆細胞（EPCs）は pro-angiogenic cytokines を放出し、血管形成を促し、neo-angiogenesis に貢献している。そして虚血性疾患、網膜症、癌のような血管新生に関わる疾患に関与していることが分かっている。

プロスタグランジン I₂ は血管拡張作用を有し、アナログ製剤は ASO などの治療に応用されている。我々はこれまでの研究で EPCs がプロスタグランジン I₂ に特異的な受容体である IP 受容体を発現していることを報告し、

骨髄細胞 IP 欠損マウスの wire injury model において血管リモデリングが障害され、下肢虚血モデルでは血管新生が阻害されることを報告した。

2. 研究の目的

EPCs の機能を制御することで骨髄における PGI₂-IP signaling が腫瘍増殖を制御するかを検証する。

3. 研究の方法

使用した cell lines

— LLC (non-small cell lung cancer derived from C57BL/6J mice)

- DsRed-labeled LLC (LLC/DsRed) (non-small cell lung cancer derived from C57BL/6J mice)
- MS-1-L (human small cell lung cancer)
- SBC-1 (human small cell lung cancer)
- A549 (human non-small cell lung cancer)
- GFP-labeled A549 (A549/GFP) (human non-small cell lung cancer)
- PC9 (human non-small cell lung cancer)
- WI38 (human lung fibroblast cell)

使用した薬剤

IP receptor antagonist

- CAY 10441 (CAY)

IP receptor agonist

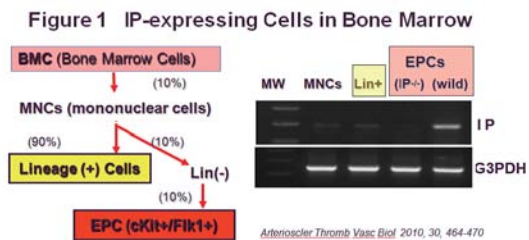
- Beraprost (BPS)

(1) 骨髄細胞の採取

C57BL/6J (8-10週齢のメスのwild typeもしくはIP knockoutのGFP-expressing transgenic マウス)から骨髄細胞を採取した。

(2) 骨髄細胞からEPCsの抽出

magnetic sorting systemを用いて、骨髄細胞からlineage (-)、cKit(+), Flk(+)の細胞を抽出しそれらの細胞をEPCsとした。



(3) Ex vivo angiogenesis assay

・マウスの胸部大動脈リングを単離し、GFP陽性のEPCsを含んだマトリジェル内に定着させた。

(4) Bone Marrow Transplantation and Tumor Xenograft Mouse Model

・骨髄細胞 (wild typeもしくはIP knockout)を放射線照射し前処置したレシピエントマウス (ICR nu/nu)に移植した。

・その骨髄移植マウスの皮下に腫瘍細胞を移植した。

・ドナーマウス; 8週齢のメスのC57BL/6Jマウス

そのマウスの genetic backgrounds

- Wild type (WT)
- Wild type-GFP expressing (WT/GFP)
- IP knockout (IPKO)

・レシピエントマウス

- 8週齢のメスのC57BL/6Jマウス
- 8週齢のメスのICR nu/nuマウス

(5) Bone Marrow Transplantation and Mouse Lung Metastasis Model

・骨髄細胞 (wild typeもしくはIP knockout)を放射線照射し前処置したレシピエントマウス (C57BL/6JもしくはICR nu/nu)に移植した。

・その骨髄移植マウスに腫瘍細胞を尾静脈静注することで肺転移モデルを作製した。

・ドナーマウス; 8-10週齢のメスのC57BL/6Jマウス

そのマウスの genetic backgrounds

- Wild type (WT)
- Wild type-GFP expressing (WT/GFP)
- IP knockout (IPKO)
- IP knockout-GFP expressing (IPKO/GFP)

・レシピエントマウス

- 8-10週齢のメスのC57BL/6Jマウス
- 8-10週齢のメスのICR nu/nuマウス

(6) In vitro study

- 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) cell proliferation assay

- Clonogenic cell assay

- Cytokine antibody array

4. 研究成果

PGI₂アナログであるBeraprost (5 nM)入り、もしくは無しの無血清培地でEPCsを2日間培養し、cytokines/angiogenic growth factorsをantibody-array system (RayBio)を用いて測定した (図1)。

BeraprostによりwildのEPCsからは cytokines/angiogenic growth factorsが産生され、IPKOのEPCsからは産生されなかった。

Beraprost	Wild		IPKO	
	+	-	-	+
L-selectin	3.61	0.40	0.42	
IL6	2.46	0.54	0.50	
IL5	2.38	0.51	0.56	
VEGF	2.05	0.75	0.82	
P-selectin	1.72	0.34	0.22	
GM-CSF	1.70	0.46	0.22	
M-CSF	1.67	0.52	0.40	
TNF α	1.67	0.87	1.22	
IL1 β	1.53	0.93	0.66	
bFGF	0.92	0.69	0.52	

図1 EPCs における cytokines/angiogenic growth factors 産生に対するPGI₂の効果

マウスの胸部大動脈リングを単離し、GFP陽性のEPCs (5x10⁴/20 ml gel) を含んだマトリジェル内で培養した。1週間培養後、大動脈リングから伸展した血管を明瞭に認めた (図2)。青のエリアが血管の密度の濃い部分で、赤のエリアが血管が伸展していている部分である。 Bar=250 μ m。

Wild の EPCs を含んだマトリジェル内で培養したほうが control (EPCs を含まないマトリジェルで培養) や IPKO の EPCs を含んだマトリジェルで培養したものより伸展血管の範

囲全体も密度の高い範囲も広がった。

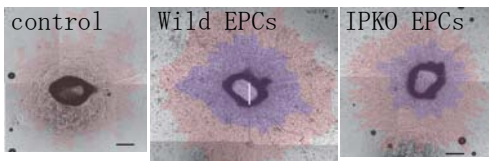


図2 Ex vivo angiogenesis assay

ここまでの結果から、EPCsは血管形成を促進する効果を潜在的に持っており、その効果はPGI₂-IP signalingにより制御されていることがわかった。

次にBone Marrow Transplantation and Tumor Xenograft Mouse Model を用いて、PGI₂-IP signaling と腫瘍増殖の関係を検証した。骨髄移植操作を施したICR nu/nuマウスの両横腹に2×10⁶ cellsのヒト小細胞肺癌細胞を移植し、移植後腫瘍径を4週間計測した。その後、同マウスをsacrificeし、腫瘍重量と血管密度を評価した(図3)。IPKOの骨髄を移植したマウスで腫瘍増殖は抑制された。この腫瘍増殖の抑制は腫瘍内の血管密度の低下と相関した。そして、IPKOの骨髄を移植したマウスにwildのEPCsを尾静脈静注すると、腫瘍増殖はwildの骨髄を移植したマウスに近づいた。

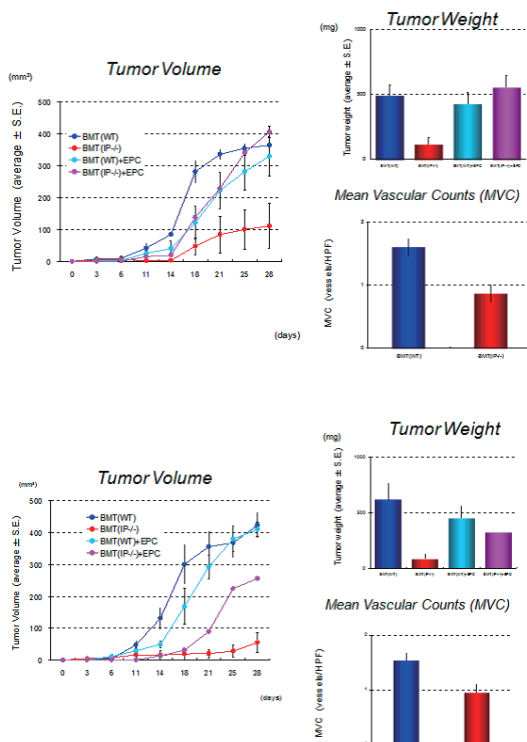


図3 Bone Marrow Transplantation and Tumor Xenograft Mouse Model (上; MS-1-L Xenograft、下; SBC-1 Xenograft)

骨髄移植したマウスにwildのEPCsを尾静脈静注したマウスの腫瘍を観察すると、EPCsは腫瘍移植2週間には腫瘍の周辺に局在していたが、4週間には消失していた。このことからEPCsは腫瘍血管形成の早期に関与していることが示唆された(図4)。

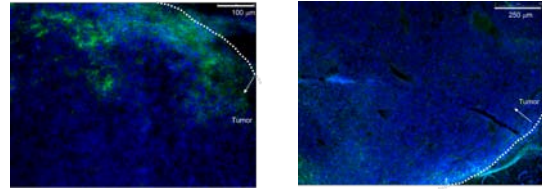


図4 LLC xenograft tumor (EPCsはGFPで標識している。左; 腫瘍移植2週間後、右; 腫瘍移植4週間後)

以上の結果から、PGI₂-IP signalingを阻害することで、早期の腫瘍血管新生が阻害され、そのことからさらには肺癌肺転移が抑制されるという仮説をたてた。

そこで、肺癌肺転移モデルを用いてPGI₂-IP signaling阻害による抗腫瘍効果を検証した。

骨髄細胞(wild typeもしくはIP knockout)を放射線照射し前処置したレシピエントマウス(ICR nu/nu)に移植した。その骨髄移植マウスにGFPで標識したヒトの肺腺癌細胞

(A549/GFP)を尾静脈静注することで肺転移モデルを作製した。

wildの骨髄を移植したマウスでは肺転移が形成され、IPKOの骨髄を移植したマウスでは肺転移は形成されないと予測した。

しかし、IPKOの骨髄を移植したほうのマウスで腫瘍細胞が異常増殖した(図5)。

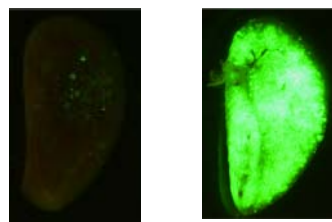


図5 左; wildの骨髄移植肺癌肺転移マウス、右; IPKOの骨髄移植肺癌肺転移マウス

この結果から我々は、腫瘍の影響によりPGI₂-IP signalingは抑制されており、腫瘍血管周囲の周細胞が減少(変化)し、そのことにより血管透過性が上昇し、腫瘍が増殖する。という仮説を立てた。

また、検討が必要な項目として以下のものがあげられた。

- ・移植された骨髄細胞が肺でトラップされて

いる可能性。
 ・骨髄移植という操作が結果に影響を与えている可能性。
 ・ヌードマウスとヒトの肺癌細胞ではなく、C57BL/6J (wild もしくは IPKO) と LLC/DsRed (マウス肺腺癌細胞) を用いた骨髄移植肺癌肺転移モデルを作製し、比較する必要性。

まず移植した骨髄細胞が肺にトラップされるか確認した。
 wild のマウスに GFP で標識された wild の骨髄細胞を尾静脈注射で移植した。GFP 陽性細胞は認めず、尾静脈注射した骨髄細胞は肺でトラップされないことを立証した (図 6)。

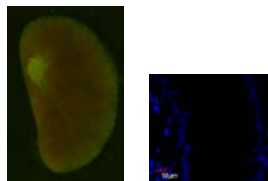


図 6 左; Macro fluorescence microscope、右; Confocal laser scanning microscopy (blue = Hoechst 33258、red = CD31)

次に骨髄移植操作による影響の有無を確認した。
 wild マウスにそのまま肺癌細胞を肺転移させたものと、wild マウスに wild マウス (GFP 陽性) の骨髄を移植し肺癌細胞 (LLC/DsRed) を肺転移させたものを比較した (図 7)。

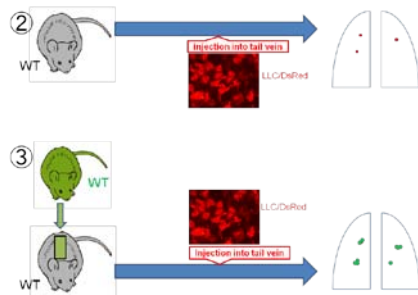


図 7

マクロでは転移は認められなかった。GFP 陽性の wild の骨髄を移植したマウスは緑の結節として骨髄由来細胞が認められた。同部位にミクロの転移があるものと考えた。ミクロでは両方に転移が見られた。GFP 陽性の wild の骨髄を移植したマウスをみると腫瘍の周囲に骨髄由来細胞が局在しており、またそれらの全てが周細胞のマーカーを発現しているわけではなかった。周細胞のマーカーの発現を比較すると骨髄移植操作をしていないマウスと骨髄移植操作を施したマウスで違いはなかった。骨髄移植操作は肺転移の形成に影響を与えないことが立証された (図 8)。

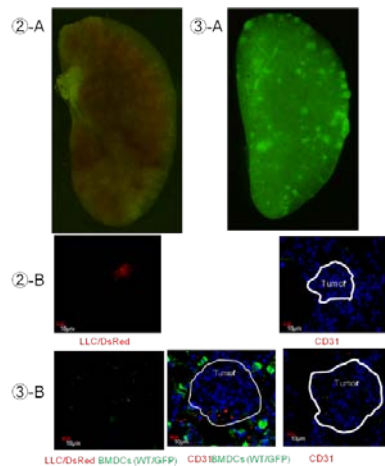


図 8

次に骨髄移植操作をしない wild と IPKO マウスの肺癌肺転移の比較を行った (図 9)。

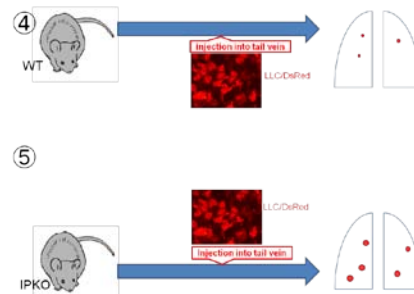


図 9

マクロでもミクロでも IPKO で腫瘍数・サイズともに増大した。また周細胞のマーカーの発現も増加した。PGI₂-IP signaling の欠損によって肺癌肺転移の形成が促進された (図 10)。

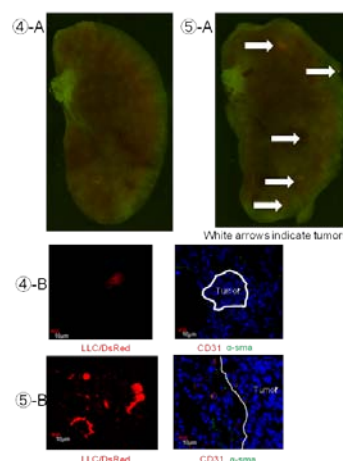


図 10

IPKO の骨髄移植操作による影響の有無も確認した。
 IPKO マウスにそのまま肺癌細胞を肺転移さ

せたものと、wild マウスに IPKO マウス (GFP 陽性) の骨髄を移植し肺癌細胞を肺転移させたものを比較した (図 11)。

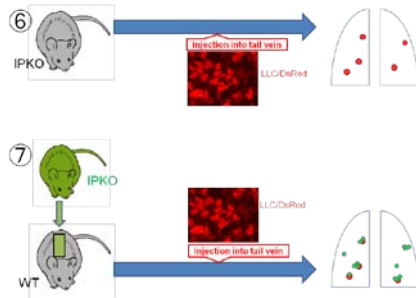


図 11

IPKO の骨髄移植操作でも肺転移の形成に影響を与えないことが立証された (図 12)。

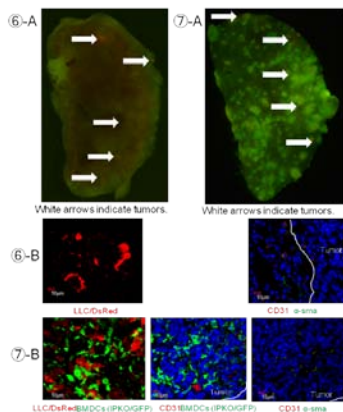


図 12

最後に wild と IPKO の骨髄移植モデルでの肺癌肺転移の比較を行った (図 13)。

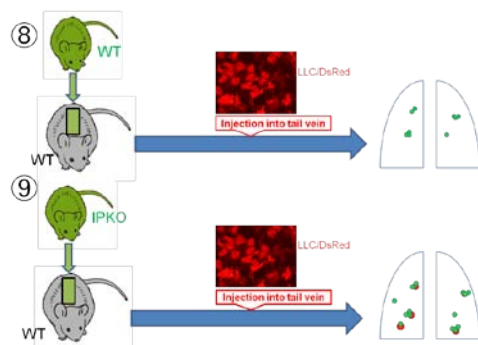


図 13

wild のほうはマクロで明らかな転移は認めなかったが、IPKO のほうはマクロで明らかに転移を認めた。骨髄由来細胞は腫瘍の周囲に存在し、その全てが周細胞マーカーを発現しているわけではなく、発現量は IPKO で増えている印象であった。骨髄由来細胞の PGI_2 -IP signaling の欠損に

よって肺癌肺転移の形成が促進された (図 14)。

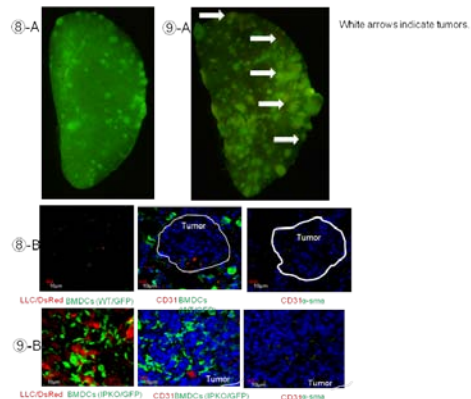


図 14

In vitro study

用いた細胞全てに IP 受容体が発現していた。各細胞に対し CAY 10441 (CAY)、Beraprost (BPS) の濃度で細胞増殖に影響があるかを BrdU cell proliferation assay で検討したが、細胞増殖に影響はなかった (図 15)。

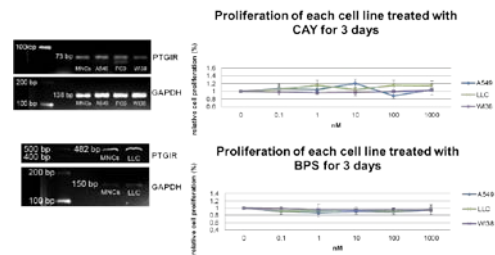


図 15

Clonogenic cell assay でも検討したが、CAY、BPS は癌細胞の増殖能自体に影響を与えないことが立証された (図 16、17)。

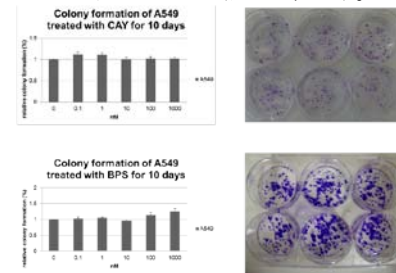


図 16 A549 に対する CAY、BPS

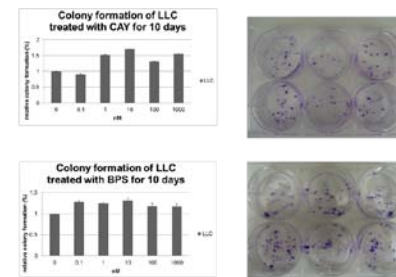


図 17 LLC に対する CAY、BPS

