

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791135

研究課題名(和文)腫瘍血管新生における間葉系幹細胞の役割

研究課題名(英文)Role of mesenchymal stem cells in tumor angiogenesis

研究代表者

茂木 精一郎(Motegi, Sei-ichiro)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20420185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：以前に分泌蛋白質MFG-E8が血管周皮細胞から大量に産生、分泌されること、MFG-E8が血管周皮細胞表面上のインテグリンと結合し、細胞運動、腫瘍血管新生を促進させることを見いだした。本研究では、間葉系幹細胞が悪性黒色腫の腫瘍血管新生を亢進させる機序にMFG-E8が関与することを明らかにした。MFG-E8は悪性黒色腫の病態を悪化させる因子であり、MFG-E8を抑制する抗体などを用いた治療への応用が期待させる。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that pericytes are major sources of the secreted glycoprotein and integrin-ligand MFG-E8 in B16 melanoma tumors, and that MFG-E8 promotes angiogenesis mediated by integrin-growth factor receptor cross talk. In this study, we identified that MFG-E8 up-regulated mesenchymal stem cells (MSC)-induced angiogenesis and tumor growth of B16 melanoma in mice, suggesting that inhibition of MFG-E8 might use the therapy of melanoma.

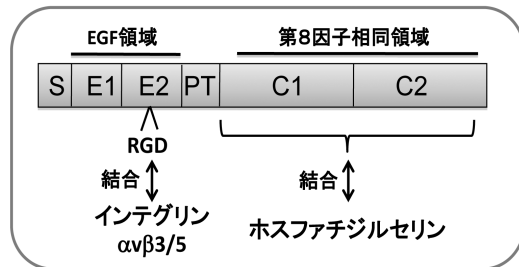
研究分野：腫瘍血管新生

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：血管新生 間葉系幹細胞

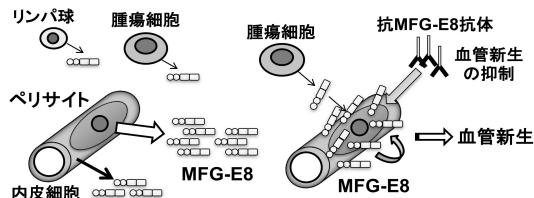
1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質 MFG-E8 は、右図に示すように、N 末端に 2 つの上皮成長因子様ドメイン (E1, E2) を持ち、E2 ドメインにはインテグリンとの結合に重要な RGD 配列を含む。



MFG-E8 は、この RGD 配列を介して、インテグリン $\alpha_v\beta_3/5$ と結合する。一方、C 末端には第 5, 8 凝固因子と相同性をもつドメイン (C1, C2) を有する。MFG-E8 は、アポトーシス細胞貪食の制御、精子と卵子の結合能やコラーゲン代謝能の制御など様々な機能の制御に関わっている。

申請者は、マウス悪性黒色腫内において、ペリサイトが MFG-E8 の主要な産生細胞であること、そして分泌された MFG-E8 が血管周囲に局在し、腫瘍血管新生を促進させることを明らかにした (Motegi S. et al. Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology 31: 2024-2034, 2011)。マウスに移植した悪性黒色腫内において、リンパ球、血管内皮細胞、ペリサイト、メラノーマ細胞が各々 MFG-E8 を産生するが、特にペリサイトから多く産生され、分泌された MFG-E8 がペリサイトや血管内皮細胞に結合することを明らかにした (下図参照)。また、MFG-E8 の野生型 (WT) および遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた検討によって、MFG-E8 が悪性黒色腫の腫瘍血管新生を促進させることを明らかにした。網膜における血管新生モデル (未熟児網膜症モデル) においても MFG-E8 が血管新生を促進させることを明らかにした。さらに、抗 MFG-E8 抗体の腹腔内投与によって、未熟児網膜症モデルマウスにおける血管新生が抑制されることを明らかにし、治療への応用の可能性が示唆された (下図参照)。



次に、申請者は、MFG-E8 によるペリサイトを介した血管新生制御のメカニズムを明らかにした (Motegi S. et al. Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology 2011)。MFG-E8 はペリサイト様細胞 10T1/2 cell より産生、分泌され、細胞膜上のインテグリン V と結合する。そして、PDGF 刺激によりリン酸化された PDGFR は FAK を介して、

インテグリン V と複合体を形成する。そして、PDGFR のコヒキチン化が抑制されることにより、PDGFR シグナル

(MAPK) が増強することを明らかにした。これらの結果より、MFG-E8 は、間葉系幹細胞由来細胞であるペリサイトより産生、分泌され、PDGFR シグナルの制御を介して、その細胞機能を制御することが示唆される。しかし、間葉系幹細胞の機能制御における MFG-E8 の役割は明らかになっていない。そこで、本研究では、間葉系幹細胞による腫瘍血管新生の制御における MFG-E8 の役割を明らかにすることを目的とした。

間葉系幹細胞は多能性幹細胞としての機能を持ち、脂肪細胞、骨、軟骨細胞への分化能を有する。腫瘍においては、間葉系幹細胞が血管周囲に遊走し、ペリサイトとしての役割を果たし、腫瘍血管新生を促進、腫瘍増殖を亢進させることが知られている。また、PDGFR β シグナルは間葉系幹細胞の遊走を促進させることが知られている。申請者がこれまでに得た研究成果とこれらの知見を合わせて考慮した結果、悪性黒色腫において、間葉系幹細胞による血管新生、腫瘍増殖において MFG-E8 が重要な役割を担っている可能性が高く、今回の研究構想の着想に至った。

2. 研究の目的

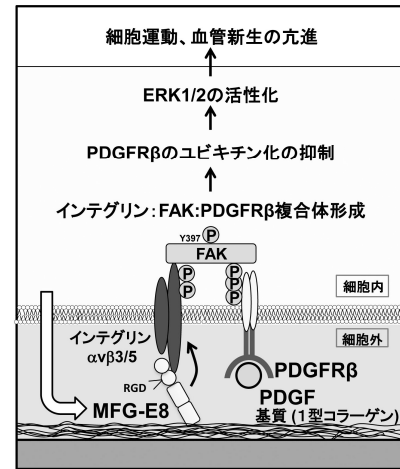
間葉系幹細胞による悪性黒色腫の血管新生機能における MFG-E8 の役割と病態的意義を明らかにする。また、抗 MFG-E8 抗体を用い、MFG-E8 の機能を制御することによる悪性黒色腫やその他の癌に対する治療への基礎研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

1. 骨髄由来間葉系幹細胞の機能制御 (増殖、分化能、血管構造形成能等) における MFG-E8 の役割を明らかにする。
2. 間葉系幹細胞による腫瘍血管新生における MFG-E8 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

骨髄由来間葉系幹細胞の機能制御 (細胞運動、増殖、分化能、血管構造形成能等) における MFG-E8 の役割

骨髄細胞より間葉系幹細胞を誘導する系を確立する。骨髄細胞より間葉系幹細胞を誘導した後に、real-time PCR 法によって MFG-E8



の RNA 量、ELISA 法によって分泌された MFG-E8 量を解析する。

次に間葉系幹細胞における MFG-E8 の役割を検討する目的で、MFG-E8 KO および WT マウスの骨髄より間葉系幹細胞を誘導し、間葉系幹細胞マーカーとして知られている Sca-1, CD44 などの発現について、比較検討を行う。また、MFG-E8 KO および WT マウスより誘導した間葉系幹細胞における脂肪細胞、骨、軟骨細胞への分化能を調べ、比較検討を行う。間葉系幹細胞は血管内皮細胞とのマトリジェル内の共培養によって血管様構造を形成することが知られている。申請者はすでに、間葉系幹細胞と血管内皮細胞の共培養により血管様構造を形成する実験系を確立している。そこで、MFG-E8 WT および KO マウス由来間葉系幹細胞において、血管様構造の形成について比較検討を行う。

間葉系幹細胞による腫瘍血管新生における MFG-E8 の役割

In vivo において、間葉系幹細胞は、マウスに移植した悪性黒色腫内の血管周囲に遊走し、ペリサイトとしての役割を果たし、腫瘍血管新生を促進させることが報告されている。そこで、間葉系幹細胞の腫瘍内への遊走能、血管新生能における MFG-E8 の役割について検討を行う。

MFG-E8 WT 及び KO マウスの骨髄由来間葉系幹細胞を悪性黒色腫細胞とともに B6 マウスに皮下注入、もしくは尾静脈より注入する。次に、直径 1cm に達した悪性黒色腫をマウスより切除し、血管内皮細胞マーカー CD31 やペリサイトのマーカー NG2, PDGFR を用いた免疫染色により間葉系幹細胞の局在、腫瘍内血管量（血管内皮細胞とペリサイトの定量）を比較検討する。また、腫瘍径の測定や、マウスの生存率についても比較検討する。

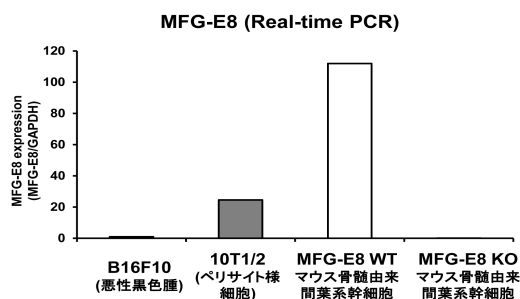
ヒト悪性黒色腫における MFG-E8 の局在

マウス悪性黒色腫を用いた免疫染色の結果、MFG-E8 は PDGFR⁺, NG2 陽性のペリサイトとの共局在がみられた。そこで、悪性黒色腫患者より得られた組織を用いて免疫染色を行い、ヒト悪性黒色腫における MFG-E8 の局在について検討を行う。ペリサイトとの関係については、SMA 抗体による染色を行い検討する。

4. 研究成果

まず、マウス骨髄細胞より間葉系幹細胞を誘導し、MFG-E8 が高発現していることを確認した（右上図）。次に、MFG-E8 WT および KO マウスの骨髄より間葉系幹細胞を誘導し、発現マーカー (Sca-1, CD105, CD44, CD45, CD11c) について検討したところ明らかな違いは見られなかった。増殖能は MFG-E8 WT マウス由来間葉系幹細胞の増殖が亢進していた。マトリゲルによる血管形成能においても、MFG-E8 WT マウス由来間葉系幹細胞で亢進し

骨髄由来間葉系幹細胞における MFG-E8 の発現



ていた。

間葉系幹細胞による腫瘍の成長と血管新生の促進効果における MFG-E8 の役割を検討するために MFG-E8 WT および KO マウス骨髄由来間葉系幹細胞と悪性黒色腫細胞を共にマウスに移植し、腫瘍の大きさ、腫瘍内血管量を比較検討した。その結果、間葉系幹細胞は悪性黒色腫の成長と血管新生を促進させた。また、MFG-E8 KO マウス由来間葉系幹細胞では、WT マウス由来間葉系幹細胞と比べて、この効果が低下していた。これらの結果より、MFG-E8 は、間葉系幹細胞による悪性黒色腫の血管新生を亢進させることが示唆された。

また、ヒト悪性黒色腫においても MFG-E8 は血管周皮細胞に多く発現が見られることを見出し、ヒト悪性黒色腫においても MFG-E8 が間葉系幹細胞の制御を担っている可能性が示唆された。これらの成果から、MFG-E8 を標的とした新たな癌治療への応用が期待できる。

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)

[学会発表](計 3 件)

- 山田和哉, 内山明彦, 上原顕仁, 荻野幸子, 横山洋子, 竹内裕子, Mark C. Udey, 石川 治, 茂木精一郎
間葉系幹細胞による悪性黒色腫の腫瘍血管新生の制御
第 20 回新群筑皮膚合同研究会 2013.10.18 前橋
- 山田和哉, 内山明彦, 上原顕仁, 荻野幸子, 横山洋子, 竹内裕子, 石川 治, 茂木精一郎
間葉系幹細胞による悪性黒色腫の腫瘍血管新生の制御
第 60 回北関東医学会総会 2013.9.26 前橋
- 茂木精一郎
腫瘍血管新生における間葉系幹細胞の役割
日本皮膚科学会総会 2013.6.14-16. 横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

茂木 精一郎 (MOTEGI, Sei-ichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20420185