

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830083

研究課題名(和文) NDRG1欠失変異による血管新生及び腫瘍関連マクロファージ機能の抑制機序の解明

研究課題名(英文) Role of NDRG1 in tumor angiogenesis through activation of tumor-associated macrophages and vascular endothelial cells.

研究代表者

渡 公佑 (Watari, Kosuke)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90596834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1)は細胞のストレス応答や増殖と分化の制御に関連する遺伝子として同定された43kDaのタンパク質である。当研究室からは、がん細胞でのNDRG1発現が腫瘍増殖や血管新生に関与することを報告してきた。しかし、宿主NDRG1の腫瘍の増殖や血管新生への関与については明らかにされていない。本研究ではNDRG1遺伝子ノックアウトマウスを用いることで、NDRG1は腫瘍関連マクロファージの浸潤と活性化を介してがん血管新生を制御し、また血管内皮細胞におけるVEGF選択的な血管新生に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) has been known to play pleiotropic roles in cell growth, development and differentiation. We have previously reported that NDRG1 expression levels in cancer cells are correlated with tumor growth and angiogenesis in both experimental model and human tumor. However, whether tumor growth and angiogenesis could be affected by NDRG1 in host remains unclear. This study demonstrated that NDRG1 deficiency suppressed infiltration and activation of tumor-associated macrophages in tumor. Moreover, NDRG1 deficiency specifically suppressed VEGF-induced angiogenesis in vascular endothelial cells. Thus, NDRG1 plays a critical role in tumor growth and tumor angiogenesis through tumor-associated macrophages and vascular endothelial cells.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：NDRG1 血管新生 マクロファージ 血管内皮細胞 VEGF

1. 研究開始当初の背景

- (1) N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)はストレス応答遺伝子、細胞の増殖、分化に關与する遺伝子として単離された 43KDa の蛋白質であり、その欠損は知覚・運動神経障害を引き起こすことが報告されている。
- (2) 当研究室では、がんにおける血管新生を制御するタンパクとしてNDRG1を同定した。ヒト腎癌、脳腫瘍、肺癌、骨肉腫、胃癌においてNDRG1の発現が血管密度やマクロファージの浸潤、がんの悪性進展と相關することを報告した。
- (3) NDRG1 ノックアウトマウスにおける肺癌細胞とメラノーマ細胞の皮下移植実験の結果、腫瘍増大の抑制と、血管新生密度や浸潤マクロファージ数の減少を觀察している。さらにノックアウトマウスの血中発現因子のマイクロアレイ解析を行ったところ、マクロファージ分化促進因子である M-CSF/CSF-1 の発現が約 1/3 に減少しており、また主にマクロファージにより産生される IL-1 , IL-10, IL-12, TNF- α などの因子の発現も著明に減少していることを觀察した。このことより NDRG1 ノックアウトマウスでマクロファージの機能異常が引き起こされている可能性が示唆された。
- (4) がんの悪性進展において特にマクロファージが極めて重要な役割を担っていることが様々ながん種において報告されている。腫瘍内へと浸潤してくるマクロファージはがん細胞や炎症などの刺激によって多様な性質を獲得することが報告されている。この腫瘍関連マクロファージの重要な機能の1つががんの血管新生を促進することである。これまで我々はマクロファージが炎症やがん細胞誘導の血管新生やリンパ管新生に重要な役割を担っていることを報告しており、さらにマクロファージ標的薬剤が腫瘍の血管新生や増大、転移を抑制することを報告している。

2. 研究の目的

- (1) 我々はがんの悪性進展におけるがん間質応答での NDRG1 の機能解明の目的で NDRG1 ノックアウトマウスを駆使して血管新生誘導およびマクロファージ浸潤への宿主 NDRG1 の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍皮下移植実験

野生型(WT)及び NDRG1KO マウスの右側腹部皮下に、LLC/3LL細胞(2.5×10^5 cells)、又は B16/BL6 細胞(2.0×10^5 cells)を移植した。移植後 7 日より 3 日おきに腫瘍径を

測定した。LLC/3LL 皮下腫瘍は移植後 17 日目に、B16/BL6 皮下腫瘍は移植後 21 日目に、麻酔下で腫瘍を回収した。腫瘍体積 (mm^3) は、長径 \times 短径² $\times 0.5$ として近似した。

(2) マトリゲルプラグアッセイ

B16/BL6 細胞を PBS に懸濁し、 1.0×10^5 cells/ $50 \mu\text{l}$ を $450 \mu\text{l}$ の growth factor reduced マトリゲルに懸濁し、マウス両側腹部に $500 \mu\text{l}$ 移植した。移植から 10 日後にマトリゲルを回収し凍結切片の作製及びマクロファージの単離を行った。

(3) マトリゲル内浸潤マクロファージ単離

WT 及び NDRG1KO マウスに皮下移植した B16/BL6 含有のマトリゲルを回収し、0.5% collagenase L、20unit/ml Dnase 含有の PBS 中で 37、60 分間湯浴で混和した。培地で中和後、 $70 \mu\text{m}$ 及び $40 \mu\text{m}$ のセルストレイナーに通し 40g で 5 分間遠心し組織片等の不純物を除去した。上清を回収し 1000rpm で 5 分間遠心した後、ペレットを MACS バッファー 1ml で懸濁し、FcR blocking 抗体に 4 で 10 分間浸した。PBS にて洗浄後、磁気標識抗 CD11b 抗体を添加し 4 で 15 分浸した後に遠心した。ペレットを MACS バッファーに懸濁し 25LS カラムにて単離を行った。

(4) マウス角膜法

ヒト VEGF-A (200 ng) 及び FGF-2 (100 ng) をそれぞれ $0.3 \mu\text{l}$ のハイドロンペレットに封入し、WT 及び NDRG1KO マウスの角膜に移植した。7 日目に Viewfinder 3.0 を用いて角膜の血管を撮影し定量化した。マウス角膜における血管新生の定量化分析には Image J を用いた。

(5) マウス肺組織からの血管内皮細胞の単離・培養

WT 及び NDRG1KO マウスより肺を摘出しフェザーを用い細かく切り刻んだ。その後 0.5% collagenase L、20unit/ml Dnase 含有の PBS 中で 37、60 分間湯浴で混和した。1600rpm で 10 分間遠心した。上清を破棄し、ペレットを 5%FBS 含有の Endothelial Growth Media-2 Microvascular (EGM-2MV) 培地で懸濁し型コラーゲンでコートしたディッシュに播種した。4 から 6 日間培養後、0.05%トリプシン/EDTA を添加し、細胞を剥離した。1000rpm で 5 分間遠心し、上清を破棄し、磁気標識抗 CD31 抗体を $10 \mu\text{l}$ 添加し 4 で 15 分間浸した後に、MACS バッファー 5ml を加え 1000rpm で 5 分間遠心した。上清を破棄し、ペレットを MACS バッファーで懸濁し 25LS カラムにて単離を行った。単離した細胞を 15%FBS 含有 EGM-2MV 培地で 4 から 6 日間培養した。再び磁気ビーズを用

いて CD31 陽性細胞の単離を同様に行い、単離した細胞を 15%FBS 含有の EGM-2MV 培地で培養し血管内皮細胞として用いた。

4. 研究成果

(1) NDRG1 KO マウスでのがん誘導血管新生数減少への腫瘍内マクロファージの関与の検討

マウス悪性黒色腫細胞含有マトリゲル皮下移植実験系で、WT と比較して NDRG1 KO マウス皮下移植マトリゲル内のがん血管新生密度及びマクロファージ浸潤数が有意に減少し、磁気ビーズを用いて精製したマクロファージは、血管新生促進因子 VEGF や成熟型マクロファージ産生因子の発現が有意に低下していた。

WT マウスと比較して NDRG1 KO マウスでは CD11b 及び F4/80 抗体を用いたフローサイトメトリー法での血中マクロファージ数の減少と、in vitro 系でのマクロファージ前駆細胞に富む骨髓細胞の M-CSF 誘導の増殖能の有意な低下が観察された。

放射線照射により骨髓抑制を行った WT マウスへ、がん細胞と WT または NDRG1KO マウス骨髓細胞より樹立したマクロファージを含有したマトリゲルの皮下移植を行った。その結果、WT マクロファージを含有したマトリゲル内にはがん細胞単独と比較して約 2 倍の血管密度の増加が観察されたが、NDRG1KO マクロファージを含有したマトリゲルでは増加は観察されなかった。

NDRG1KO マウスの骨髓及び腹腔内より樹立したマクロファージは、がん細胞培養上清刺激による VEGF や TNF- α 、IL-10 などの発現上昇が WT と比較して有意に低下していた。

(2) NDRG1 KO マウスにおける血管新生因子誘導の血管新生能の検討

角膜法及び大動脈リングアッセイ法を用いた血管新生促進因子 VEGF 及び FGF-2 誘導の血管新生能の検討では、NDRG1 KO マウスは WT マウスと比較して、FGF-2 誘導の血管新生能に差は見られなかったが、VEGF 誘導の血管新生能が有意に低下していた。

WT 及び NDRG1KO マウスの肺組織よりそれぞれ CD31 標識磁気ビーズを用いて血管内皮細胞を樹立した。これらの血管内皮細胞は形態及び通常培養条件下での増殖能に変化は観察されなかったが、VEGF 誘導の増殖能は NDRG1KO マウス由来の血管内皮細胞で有意に低下していた。しか

し FGF-2 誘導の増殖能には差はみられなかった。

以上の結果より、NDRG1 は腫瘍関連マクロファージの浸潤と活性化を介してがん血管新生を制御し、また血管内皮細胞における VEGF 選択的な血管新生に関与することを明らかにした。これらの事より NDRG1 はマクロファージと血管内皮細胞を介したがん血管新生抑制薬の新たな標的となることが期待できる。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Murakami Y, Watari K, Shibata T, Uba M, Ureshino H, Kawahara A, Abe H, Izumi H, Mukaida N, Kuwano M, Ono M. N-myc downstream-regulated gene 1 promotes tumor inflammatory angiogenesis through JNK activation and autocrine loop of interleukin-1 α by human gastric cancer cells. *J Biol Chem.* 2013; 30; 288(35): 25025-37. doi: 10.1074/jbc.M113.472068. 査読有

Watari K, Shibata T, Kawahara A, Sata K, Nabeshima H, Shinoda A, Abe H, Azuma K, Murakami Y, Izumi H, Takahashi T, Kage M, Kuwano M, Ono M. Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis through M2-type macrophages. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99568. doi: 10.1371/journal.pone.0099568. 査読有

[学会発表](計 10 件)

Kosuke Watari, Tomohiro Shibata, Akihiko Kawahara, Yuichi Murakami, Hiroshi Nabeshima, Ai Shinoda, Koichi Azuma, Hiroto Izumi, Masayoshi Kage, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono. Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis, and lymph node metastasis through activation of M2-type macrophages by lung cancer cells. *AACR Annual Meeting 2014, 2014.04.08. San Diego (USA).*

Kosuke Watari, Ai Shinoda, Tomohiro Shibata, Akihiko Kawahara, Takahito Nakama, Shigeo Yoshida, Masayoshi Kage, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) as a novel anti-angiogenic and therapeutic target for VEGF/VEGF receptor signaling by vascular endothelial cells. *26th EORTC-NCI-AACR Symposium on*

Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2014.11.21. Barcelona (Spain).

渡 公佑、柴田 智博、村上 雄一、桑野 信彦、小野 眞弓. がん血管新生は N-myc downstream regulated gene-1(NDRG1)によって特異的に制御される. 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会 2013.07.11. ホテルブエナビスタ(長野県・松本市)

渡 公佑、鍋島 弘嗣、福永 裕一、柴田 智博、篠田 あい、河原 明彦、村上 雄一、鹿毛 政義、桑野 信彦、小野 眞弓. NDRG1 はマクロファージの修飾を介してがん血管新生を誘導する. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.03. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

鍋島 弘嗣、渡 公佑、篠田 あい、柴田 智博、小野 眞弓. N-myc Downstream Regulated Gene-1(NDRG1)はマクロファージの機能化と成熟化に関与し腫瘍血管新生に影響する. 第 30 回日本薬学会九州支部大会 2013.12.08. 長崎国際大学(長崎県・佐世保市)

篠田 あい、渡 公佑、鍋島 弘嗣、柴田 智博、小野 眞弓. N-myc downstream regulated gene-1(NDRG1)は血管内皮細胞の機能に関与し、がん血管新生に重要な役割を果たす. 第 30 回日本薬学会九州支部大会 2013.12.08. 長崎国際大学(長崎県・佐世保市)

渡 公佑、中村 真美代、古野 綾奈、柴田 智博、村上 雄一、桑野 信彦、小野 眞弓. オクタヒドロナフタレン誘導体 AMF-26 は VEGF 受容体の膜発現と NF- κ B シグナルを阻害することによりがん血管新生を抑制する. 文科省新学術領域研究・がん支援「化学療法基盤支援活動」第 3 回シンポジウム 2014.05.12. 万国津梁館(沖縄県・名護市)

渡 公佑、柴田 智博、村上 雄一、桑野 信彦、小野 眞弓. 宿主 NDRG1 はマクロファージの分化と成熟を制御し、がん血管新生と転移の鍵をにぎる. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会 2014.07.10. 金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル(石川県・金沢市)

渡 公佑、篠田 あい、鍋島 弘嗣、柴田 智博、河原 明彦、村上 雄一、鹿毛 政義、桑野 信彦、小野 眞弓. NDRG1 欠失変異は血管内皮細胞の機能と VEGF 依存性血管新生を特異的に抑制する. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.09.25. パシフィコ横

浜(神奈川県・横浜市)

篠田 あい、渡 公佑、柴田 智博、桑野 信彦、小野 眞弓. N-myc downstream regulated gene-1(NDRG1)は血管内皮細胞の VEGF-A シグナルに関与し、がん血管新生を制御する. 第 31 回日本薬学会九州支部大会 2014.12.07. 第一薬科大学(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

渡 公佑、小野 眞弓. 日本臨牀社. 血管新生・血流正常化を標的としたがん治療. 最新がん薬物療法学-がん薬物療法の最新知見-. 2014. 日本臨牀 72 巻 増刊号 2. 66-71

〔その他〕

九州大学大学院薬学研究院創薬腫瘍科学講座ホームページ
<http://shuyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡 公佑 (WATARI, Kosuke)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 90596834