

研究報告書

研究課題：A (一般)

(平成26年度)

平成28年4月27日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 高山昭三 殿

研究施設 大阪大学微生物病研究所

住 所 大阪府吹田市山田丘3-1

研究者氏名 内藤 尚道



(研究課題)

腫瘍血管における血管内皮幹細胞システムの役割

平成27年 3月 31日付助成金交付のあった標記指定課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

(本研究の背景)

固形腫瘍の発育には腫瘍へ酸素・栄養分の供給を行う腫瘍血管新生が必須であり、その制御を目的とした研究および薬剤開発が行われている。その一つとして血管新生促進因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF) およびその受容体を標的とした血管新生阻害剤が開発され用いられている。これらの薬剤は血管内皮細胞を死滅させることにより血管を破壊し抗腫瘍効果を示す。また腫瘍そのものを標的としないので副作用の軽減や、薬剤耐性の問題が克服できると期待されていた。しかし実際には腫瘍は薬剤耐性を示し十分に満足の得られる結果は得られていない。

私たちは以前より血管新生を血管内皮細胞の多様性という観点からとらえ研究を行い、末梢血管内皮細胞に組織常在型の幹細胞様の特殊な内皮細胞が存在することを明らかにしてきた。血管新生阻害療法に血管内皮幹細胞システムという概念を導入することにより、血管新生阻害剤に対する薬剤耐性及び薬剤無効化という、血管新生阻害療法を行うにあたって大きな問題となっている現象を細胞・分子レベルで解明し、血管内皮幹細胞を標的とした治療法の開発を目指している。

(目的)

腫瘍血管における血管内皮幹細胞システムの同定と解析を行い、臨床応用されている血管新生阻害剤との関係を解明する。血管新生阻害剤への耐性機序の原因となっていないか検討を行う。さらに現在行っている腫瘍血管内皮幹細胞の同定方法とは別に、新たに腫瘍血管内皮幹細胞特異的因子の同定を行う。その因子を標的とした治療法の基礎的な実験を行う。さらに VEGF-VEGFR 経路以外の血管新生阻害経路の探索を行う。

(研究方法)

8-12 週齢の C57BL/6 マウス、DBA/2 マウス、Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞株、KLN205 細胞株を用いた。組織は酵素処理、機械的処理により単細胞に分離しフローサイトメトリー (FACS) を用いて解析を行った。また幹・前駆細胞の同定法としてヘキスト色素による Side Population (SP) 解析を用いて以下の解析を行った。

1. マウス肺血管内皮 SP 細胞の同定

野生型マウス肺 CD31+CD45-内皮細胞のヘキスト染色を行い FACS 解析をおこない内皮 SP 細胞を同定した。内皮 SP 細胞の表面マーカー解析、feeder 細胞を用いての培養、RT-q PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。

2. マウス肺腫瘍における腫瘍血管内皮 SP 細胞の同定

肿瘍中の CD31+CD45-内皮細胞の SP 解析を行った。血管内皮 SP 細胞と腫瘍細胞の共移植をおこない内皮 SP 細胞の腫瘍血管への貢献度の評価を免疫染色にて行った。

3. 血管内皮 SP 細胞の遺伝子発現の網羅的解析

血管内皮細胞 SP と MP 細胞のマイクロアレイ解析の結果から、SP 細胞特異的因子の探索を行い、さらに VEGF-VEGFR 経路以外の血管新生阻害作用の期待できるシグナルの探索を行う。

(研究結果)

1. マウス肺血管内皮 SP 細胞の同定

肺血管内皮細胞の SP 解析を行うと、約 0.7% の割合で血管内皮細胞分画中に血管内皮 SP 細胞が存在することが明らかになった。血管内皮 SP 細胞と、その他大多数の内皮細胞である Main Population (MP) 細胞をそれぞれ FACS を用いて分離し培

養を行うと、血管内皮 SP 細胞は多くの CD31+ 血管内皮細胞コロニーを形成した。さらに表面マーカー解析遺伝子発現解析を行った。

2. マウス肺腫瘍における腫瘍血管内皮 SP 細胞の同定

次にマウス肺がん細胞を肺に同所移植し、肺腫瘍モデルを作製した。腫瘍を酵素処理、機械処理により分解し FACS 解析を行い CD31+CD45-血管内皮細胞を同定し、SP 解析を行った。腫瘍環境下では血管内皮 SP 細胞の比率は約 10 倍に増加し約 7 %になっていた。次に血管内皮 SP 細胞が腫瘍血管構築に貢献するか検討するために、GFP マウス由来の肺血管内皮 SP 細胞または MP 細胞を肺がん細胞と混合し野生型マウスに移植した。10 日後、腫瘍を固定し切片を作成の上、GFP 陽性血管の存在の有無を確認した。血管内皮 SP 細胞共移植腫瘍では GFP 陽性の血管構造が多数認められたが、MP 細胞共移植腫瘍ではほぼ認めなかった。このことは内皮 SP 細胞が腫瘍中で血管内皮細胞の供給源になっている可能性を示唆している。

3. 血管内皮 SP 細胞の遺伝子発現の網羅的解析

血管内皮 SP 細胞の網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ解析で行った。その結果、アポトーシスに関連する経路が新たな治療標的になるのではないかとわかつてき。VEGF-VEGFR 経路に非依存的な血管新生制御法につながる結果がでている。今後も引き続き解析を進めていく。

(考察)

腫瘍血管における血管内皮幹細胞様の内皮細胞の同定と、その機能解析を行った。腫瘍血管内皮細胞は clonal expansion を示すことが他のグループの解析で最近報告された (Cancer Research 2016)。私たちの解析結果もある一群の内皮細胞が中心となって増殖し新生血管の内皮細胞を供給していることを示唆している。また血管新生阻害剤投与後の腫瘍ではこの幹細胞様の内皮細胞が選択的に残存することも明らかにでき、上記内容を含めて論文発表を行った。今後、腫瘍血管内皮 SP 細胞を標的とした治療の開発を引き続き行っていきたい。

(論文発表・著書)

Hisamichi Naito*, Taku Wakabayashi, Hiroyasu Kidoya, Fumitaka Muramatsu, Kazuhiro Takara, Daisuke Eino, Keitaro Yamane, Tomohiro Iba, and Nobuyuki Takakura* (*co-corresponding author)
Endothelial side population cells contribute to tumor angiogenesis and anti-angiogenic drug resistance, Cancer Research (in press), 謝辞記載あり

内藤尚道, 高倉伸幸

血管内皮細胞の多様性・不均一性

実験医学 Vol.33, No.5, pp118-123 (2015)

(学会発表)

Hisamichi Naito

The role of vascular resident endothelial side population cells in pathophysiological angiogenesis

Asia-Australia Vascular Biology, October 17, 2015, Busan, Korea

(Invited speaker)

(謝辞)

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝致します。