Endothelial Stem Cell System in the Tumor Vasculature

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-06-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Naito, Hisamichi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00062011

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　２　日現在

機関番号：　１４４０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ１８４０９

研究課題名（和文）腫瘍血管における血管内皮幹細胞システムの破綻

研究課題名（英文）Endothelial Stem Cell System in the Tumor Vasculature

研究代表者
内藤　尚道（Naito, Hisamichi）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：３０５７０６７６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞には多様性が存在し、一部には幹細胞様の性質を持つ内皮細胞が存在することが分かっている。今回腫瘍血管内皮細胞中の内皮幹細胞をより詳細に検討し、腫瘍血管内皮細胞が通常の内皮細胞とどのように異なるか解析を行った。腫瘍血管では内皮幹細胞が非常に高い割合で存在することが明らかとなった。また移植実験から、腫瘍血管内皮細胞も階層性を持つ内皮細胞集団であることが分かった。さらに遺伝子解析で薬剤耐性に関与する蛋白の上昇を特に幹細胞分画で認めた。薬剤耐性能に関わる蛋白の阻害剤にて内皮幹細胞の増殖阻害を認め、さらには腫瘍縮小効果も認めた。今後、血管内皮幹細胞システムを標的とした治療が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have been studying the endothelial stem cell system in the vasculature. Here we identified this endothelial stem cell system in the tumor vasculature. In the tumor vasculature, the percentage of endothelial stem cells was significantly increased compared to normal tissue. Moreover, we showed endothelial hierarchy by transplantation model. By gene expression analysis, we found that endothelial stem cell in the tumor highly express drug resistance genes. Addition of an inhibitor which blocks the function of drug resistance protein inhibited the colony formation of endothelial stem cells. Furthermore, administration of this inhibitor to the tumor bearing mice induced regression of tumor size of these mice. Our results suggest the existence of endothelial hierarchy system in the tumor vasculature. Targeting this system may be a promising therapeutic target in the future.

研究分野：　血管生物学

キーワード：　腫瘍血管　血管内皮幹細胞　薬剤耐性　血管新生　SP細胞

１．研究開始当初の背景

癌は現在まで約 30 年にわたって我が国の死亡原因の 1 位である。様々な対策が行われているが、依然として国民の生命及び健康にとって重大な問題となっており、新規治療法の開発が望まれる。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。我々は末梢血管内皮細胞中に血管内皮細胞の供給源として血管新生時に中心的な役割を果たす組織常在型の血管内皮幹細胞が存在することを報告してきた。末梢組織を酵素処理により単細胞に分離し、様々な組織幹細胞の同定方法として知られているヘキスト解析法を用いてフローサイトメトリー解析を行うと、全身の多くの組織で約 1%の割合で血管内皮細胞分画中に血管内皮 side population（SP）細胞が認めた。この細胞はコロニー形成能、血管再構築能を示す幹細胞様の性質を持った細胞であり、内皮細胞は末梢血管において独自のヒエラルキーシステムを構築していることが分かってきた。

本研究においては正常組織の血管内皮幹細胞システムの解析を通じて得られた知見と、現在までに明らかとなった腫瘍の血管内皮幹細胞の性質を比較することにより、両者の違いを明らかとし、腫瘍血管内皮での内皮幹細胞ヒエラルキーがどのように構築されているか明らかにする。

２．研究の目的

本研究は血管内皮細胞が、血管内皮幹細胞システムを構成しているとの概念に基づいている。この幹細胞システムにおいて血管内皮の分化異常が生じていることが、腫瘍血管が異常である原因の一つであることを証明し、正常な血管内皮細胞の分化メカニズムの解明を通じて得られた知見をもとに、腫瘍血管内皮細胞の分化誘導を行い腫瘍血管の治療を目指す

腫瘍血管内皮細胞を詳細に検討することにより、抗血管新生阻害剤の効果をより高め、さらには既存の抗腫瘍療法との併用により既存の治療の効果を飛躍的に高めることができると期待される。

３．研究の方法

①腫瘍血管内皮細胞の解析

マウスの腫瘍移植モデルを用いて腫瘍血管内皮細胞の解析を行う。マウスに Lewis Lung Carcinoma (LLC)腫瘍細胞、KLN205 肺癌腫瘍細胞を皮下移植、肺内同所移植を行いフローサイトメトリーにて CD31+CD45-血管内皮細胞を分離する。分離した内皮細胞の遺伝子プロファイリングを行う。細胞表面マーカーの解析を行う。また分離した内皮細胞の増殖能を OP9feeder 細胞上で培養することにより解析する。

②腫瘍血管内皮細胞が血管内皮幹細胞を頂点としたヒエラルキーを構築していることを明らかにする。

腫瘍血管内皮細胞を分離して多くの組織で幹細胞を同定する方法として知られている、ヘキスト色素によるフローサイトメトリー解析を行う。フローサイトメトリーにより幹細胞分画は大多数の細胞集団（Main population; MP 細胞）とは別の Side population (SP 細胞)として同定されることが知られている。マウス腫瘍モデルを用いて CD31+CD45-腫瘍血管内皮細胞集団に、SP 細胞が存在することを証明する。

③腫瘍血管内皮幹細胞の特殊性、異常性の解明

腫瘍血管内皮細胞の遺伝子プロファイリングを行う、そのうえで腫瘍血管内皮幹細胞の遺伝子プロファイリングも行う。また内皮細胞の増殖を抑制する血管新生阻害剤を用いて、腫瘍血管内皮細胞、腫瘍血管内皮幹細胞の薬剤反応性を明らかにする。

④③で得られた結果を用いて腫瘍血管内皮幹細胞を阻害もしくは分化誘導する薬剤のスクリーニングを行う。

４．研究成果

①マウス腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現パターン解析を行うと、炎症反応に関する因子、細胞増殖に関する因子、細胞障害に関する因子の上昇を認めた。また、同時に薬剤耐性に関する遺伝子の発現上昇を認めた。OP9 細胞上では増殖能が亢進していた。皮下モデル、肺同所移植モデルの比較では今回の解析では大きな差を認めなかった。細胞表面マーカー解析でも正常内皮細胞と比べ著しく異なる所見は得られなかった。腫瘍血管内皮細胞全体の解析では内皮細胞の多様性に関する知見は得られなかった。そこで、正常組織の時と同様に、血管内皮細胞のヘキスト解析を行い腫瘍血管内皮細胞中にも SP 細胞が存在することが分かった。

②各種腫瘍の内皮細胞を解析すると腫瘍血管中には正常組織の血管と比べ非常に高い割合で血管内皮幹細胞様の性質を示す血管内皮 SP 細胞が存在することが明らかとなった。腫瘍血管内皮 SP 細胞を腫瘍細胞と共に再度マウス皮下に移植すると、これらの細胞は腫瘍血管を構築し（図１）血管内皮 MP 細胞を構築することが分かった。このことは、腫瘍血管内皮細胞も分化段階を持ったヒエラルキーを構築しているとの仮説

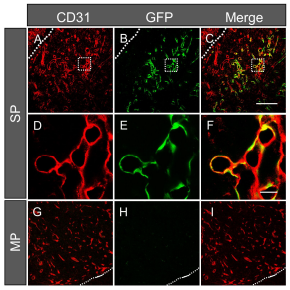


図１ EC-SP cells contribute to tumor angiogenesis.

に矛盾しない結果であった。また、SP 細胞の割合が正常組織に比べ非常に高いことから、血管内皮細胞の分化異常が腫瘍血管内では生じている可能性が示唆できた。

③、④そこで腫瘍血管内皮細胞の SP 細胞 MP 細胞の比較を行った。SP 細胞は腫瘍血管内皮細胞中でも特に薬剤耐性遺伝子の発現が高い。血管新生阻害剤を腫瘍にマウスに投与すると、この SP 細胞は比較的薬剤耐性能が高いのでより濃縮されて、比率が増える（図２）。

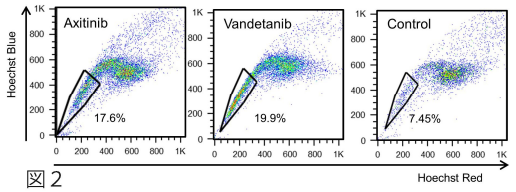


図２

この薬剤排出を司る因子の一つに ABC トランスポーターが存在することが遺伝子プロファイイング結果から明らかになった。そこで、ABC トランスポーターを阻害する薬剤を腫瘍血管内皮 SP 細胞培養に添加した。すると、腫瘍血管内皮 SP 細胞の増殖は抑えられた。また腫瘍移植マウスにも投与を行うと、やはり腫瘍の増大が抑えられた。SP 細胞を分化させて血管の正常化を誘導する方法ではないが、SP 細胞を標的とした効率の良い抗腫瘍機序が存在する可能性が示唆できた。
さらには、この ABC トランスポーター阻害剤と血管新生阻害剤を組み合わせると、より強く血管内皮 SP 細胞を阻害できることが分かった。

これらの結果から、腫瘍血管内皮細胞も階層性を持った血管内皮ヒエラルキーを構築している可能性が示唆できた。腫瘍血管内皮細胞が clonal expansion を示すことが他のグループの解析でも最近報告された。私たちの解析結果も血管内皮幹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、さらには薬剤の排出に関わるトランスポーターを阻害すると効率よく血管内皮幹細胞を傷害できる可能性が示唆できた。血管内皮細胞を階層性のある細胞集団として捉えることで、今まではわからなかった知見が得られ、今後の腫瘍血管内皮の薬剤耐性の克服につながる成果が得られたと考えらる。また今回の研究結果から腫瘍血管内皮細胞の遺伝子プロファイリングが明らかとなり、今までにない仕組みで血管内皮細胞を阻害する基となる成果が得られた。

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　６件）

①Matsushita J, Inagaki S, Nishie T, Sakasai T, Tanaka J, Watanabe C, Mizutani KI, Miwa Y, Matsumoto K, Takara K, Naito H, Kidoya H, Takakura N, Nagai T, Takahashi S, Ema M.
Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Angiogenesis in Flk1-Nano-lantern Transgenic Mice.
Sci Rep. 2017 Apr 20;7:46597.
doi: 10.1038/srep46597.
査読あり

②Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N.
Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin.
J Biochem. 2017 Feb 2.
doi: 10.1093/jb/mvx001.
査読あり

③Kanzaki R, Naito H, Kise K, Takara K, Eino D, Minami M, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Okumura M, Takakura N.
PSF1 (Partner of SLD Five 1) is a Prognostic Biomarker in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Treated with Surgery Following Preoperative Chemotherapy or Chemoradiotherapy.
Ann Surg Oncol. 2016 Nov;23(12):4093-4100.
https://link.springer.com/article/10.1245%2Fs10434-016-5392-z
査読あり

④Yamane K, Naito H, Wakabayashi T, Yoshida H, Muramatsu F, Iba T, Kidoya H, Takakura N.
Regulation of SLD5 gene expression by miR-370 during acute growth of cancer cells.
Sci Rep. 2016 Aug 8;6:30941.
doi: 10.1038/srep30941.
査読あり

⑤Naito H, Wakabayashi T, Kidoya H, Muramatsu F, Takara K, Eino D, Yamane K, Iba T, Takakura N.
Endothelial Side Population Cells Contribute to Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Drug Resistance.
Cancer Res. 2016 Jun 1;76(11):3200-10.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2998.
査読あり

⑥Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi

H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A, Takakura N.
APJ Regulates Parallel Alignment of Arteries and Veins in the Skin.
Dev Cell. 2015 May 4;33(3):247-59.
doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.024.
査読あり

〔学会発表〕（計　４件）

① Hisamichi Naito
Endothelial side population cells contribute to tumor angiogenesis.
International Vascular Biology Meeting, 2016年11月2日, Boston, USA

② Hisamichi Naito
Inhibition of TNF-α mediated apoptosis is an indispensable mechanism for survival of EC in adult mice.
Gordon Research Conferences: Endothelial Cell Phenotypes in Health & Diseases, 2016年7月17-22日, Girona, Spain

③ Hisamichi Naito
Role of vascular resident endothelial stem/progenitor cells in Pathophysiological angiogenesis
13th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, 2015年10月17日, Busan, Korea

④ 内藤尚道
腫瘍血管内皮幹細胞制御による新規血管新生阻害療法の開発
平成２６年度　「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」企画委員会
冬期シンポジウム, 2015年1月28日, 東京

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０件）

○取得状況（計　０件）

〔その他〕
ホームページ等

大阪大学研究者総覧
http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6802

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/

NCBI　Bibliography
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/myncbi/collections/bibliography/41556233/

６．研究組織
(1)研究代表者
内藤　尚道（NAITO, Hisamichi）
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：30570676