

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	笹島順平
<p>学位論文題目</p> <p>Transplanting normal vascular proangiogenic cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduces hypoxia in tumors. (正常血管新生誘導細胞の移植は腫瘍微小環境の血管再構築を誘導し低酸素環境を軽減する)</p> <p>共著者名</p> <p>水上裕輔、杉山祥晃、中村和正、河本 徹、小泉一也、藤井理恵、本村 亘、佐藤一也、鈴木康秋、丹野誠志、藤谷幹浩、佐々木勝則、清水範彦、唐崎秀則、河野透、川辺淳一、伊井正明、吉新寛樹、神山直久、蘆田知史、Nabeel Bardeesy、Daniel C. Chung、高後 裕</p> <p>Cancer Research 70(15):6283-92, 2010 平成22年7月13日</p> <p>研究目的</p> <p>腫瘍血管は幼若で漏出しやすく、系統だったネットワークを構築できないため、腫瘍内部では血流の不均衡が生じ極度の低酸素領域が形成される。このことは転移能や治療抵抗性に深く関わると考えられる。一方、正常な骨髄細胞は血管新生（再生）能を有し、組織修復を促進することが明らかになってきていることから、本研究では、低酸素に関わる癌の難治性を克服を目的として腫瘍血管の異常性が培養骨髄細胞の移植により修復されるのか、同時に、血管構築の正常化が低酸素環境、さらに癌細胞の薬剤抵抗性にどのような影響をおよぼすかについて解析した。</p> <p>材料・方法</p> <p>マウス骨髄単核球を血管内皮用培地（EGM2-MV+10%FBS）で7日培養して得られた紡錘形の付着細胞は血管内皮前駆細胞として報告されてきた。しかし、FACSでの表面マーカーの解析結果、CD11b/Flt-1(VEGFR1)/Tie2/c-Kit/CXCR4陽性であり、単球系細胞が中心となっている</p>			

と考えられた。本研究ではこの細胞群を正常血管新生誘導細胞 (nVPC) とし、担癌マウスへの移植実験に用いた。担癌マウスとしてBulb/cヌードマウス皮下にヒト膵癌細胞株KP1Nを移植したXenograftモデル、およびCre-loxP システムによる膵自然発癌マウスモデル (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{lox/+}*) を用いた。これらの担癌マウスに対し nVPC 5×10^5 /匹を経静脈的に移植した。移植後の腫瘍径の変化を観察するとともに、ソナゾイド (0.25 μ l/Kg; 第一三共) を用い、造影超音波法 (AplioXG; 東芝メディカルシステムズ) により腫瘍血流の評価を行った。また、CD31, NG2, Pimonidazol, carbonic anhydrase 9 (CA9), Ki67, cleaved-caspase-3に対する抗体を用いて血管内皮と壁細胞、低酸素、腫瘍増殖能、アポトーシスを免疫組織学的に評価した。さらにMasson-Trichrome染色を用いて線維化を評価した。またXenograftモデルでヒト特異的Taqmanプローブを用いて定量的RT-PCRを行い、癌細胞における血管新生因子、薬剤耐性およびStemness関連遺伝子の変化について解析した。

成 績

nVPC移植を行ったXenograftモデルでは、6週間までの腫瘍観察期間において腫瘍増大を促進せず、一時的な増殖遅延をもたらした。組織学的にはnVPC移植によりCD31陽性微小血管の密度が増加し、血管内腔面積の拡大とNG2陽性の壁細胞のcoverageの増加を認めた。また、造影超音波法による血流評価ではnVPC移植群において腫瘍内血流の増加を認め、Pimonidazol染色で示される低酸素領域が減少し、HIFの代表的な標的であるCA9の発現は低下していた。Ki-67 labeling-indexはnVPC移植で低下し、断片化Caspase3検出によるアポトーシスの評価では移植群で有意に増加していた。Masson Trichrome 染色による線維化の評価では、移植群でdesmoplasiaの有意な抑制が観察された。

更に、Xenograftモデルでは癌微小環境が忠実に再現されない可能性を考慮し、膵自然発癌モデル (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{lox/+}* strain) を用いた。本モデルマウスは、高度のdesmoplasiaを伴う管状腺癌を自然発症し、組織学的にも血流動態的にもヒト膵癌と類似した病変の形成をみる。12週齢の個体を用いてnVPC移植による腫瘍微小環境の変化を評価したところ、腫瘍血管はNG2 陽性の壁細胞のcoverageの増加を認め、xenograftと同様に腫瘍血管の成熟化が観察された。また、Pimonidazolにより可視化される低酸素域の縮小、造影超音波法による腫瘍内血流の増加、Masson Trichrome染色により示される線維化領域の減少も再現が可能であった。

最後にnVPC移植による癌微小環境の変化に伴う癌細胞の遺伝子発現を解析するために、xenograft腫瘍より採取したRNAを用いて定量的RT-PCRを行ったところ、血管新生促進因子で

あるVEGFやIL8の発現が抑制され、血管新生抑制因子であるPEDFの発現が増加した。またMDR1やABCG2といった薬剤抵抗性遺伝子、OCT4ならびにSOX2などのStemness関連遺伝子の発現低下を認めた。

考 案

腫瘍血管を標的とした治療戦略は大腸癌や腎臓癌などで成功を取めている。一方で膵癌では抗VEGF療法の臨床的有効性は否定されており、別のアプローチが必要と考えられる。nVPC移植により、膵癌腫瘍血管は内腔拡大、壁細胞によるcoverage増加など組織学的な血管成熟化と考えられる所見が得られ、また造影超音波法による血流モニタリングの結果、腫瘍内の血流不均衡は是正され、機能的にも血管の正常化が誘導されたものと考えられた。このことは、血管を破壊し、癌細胞を兵糧攻めとする血管新生阻害という治療アプローチとは対照的であり、癌の異常血管を修復し、正常化させるという新たな治療戦略となりうる。すなわち、腫瘍血管の機能的正常化は、癌の悪性化因子の一つとして考えられている低酸素環境を解除し、HIFを介した生存シグナル、転移能、薬剤耐性の克服を可能とする。興味深いことに、腫瘍血管の正常化に伴う腫瘍増殖は認められず、逆に一時的な増殖遅延が認められた。in vitroにおいても低酸素環境に純化した膵癌細胞は正酸素下ではむしろ増殖能の低下がみられ、腫瘍組織の再酸素化は腫瘍増殖に抑制的に働くものと考えられた。ES細胞由来の血管系前駆細胞を担癌マウスモデルに移植するというモデルで、腫瘍増殖を伴わずに腫瘍内血流促進が得られたとする報告があり(3)、われわれの研究結果を支持ものと思われる。

nVPCは腫瘍内微小循環の改善と薬剤耐性遺伝子発現の減少という2つのメカニズムにより、難治性である膵癌の薬物治療への感受性を高める可能性がある。今後、塩酸ゲムシタビンやTS-1などの化学療法薬との併用による治療効果改善について検討を進める必要がある。

結 論

nVPC移植による腫瘍血管のリモデリング(異常血管の修復)の結果、腫瘍内血流は改善し、マウス膵癌組織内の低酸素領域を縮小させた。このような、細胞移植による血管正常化と、同時にみられるdesmoplasiaの軽減は、癌微小環境での薬剤送達を改善し、さらに低酸素に起因する薬剤抵抗性を解除すると考えられる。従って、腫瘍血管の正常化(修復)をもたらす細胞治療は、膵癌をはじめとする乏血性で低酸素環境にある難治癌に対する化学療法の効果を著しく高めることが期待される。

引用文献

(重要な引用文献3編以内を掲載すること。)




- (1) Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y, et al. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. PLoS One 2010
- (2) Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. Science 2008;319:195-8.
- (3) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, et al. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. Blood 2003;101:2675-8.

参考論文

(参考論文5編以内を掲載すること。)

- #1. Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y, et al. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. PLoS One 2010
- #2. Yamazaki M, Nakamura K, Mizukami Y, Ii M, Sasajima J et al. Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. Cancer Sci 2008;99:1131-8.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	笹島 順平
<p>審査委員長 <u>吉川博之</u> </p> <p>審査委員 <u>長谷部直幸</u> </p> <p>審査委員 <u>高後 信</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Transplanting normal vascular proangiogenic cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduces hypoxia in tumors</p> <p>(正常血管前駆細胞の移植は膵癌微小環境の血管再構築を誘導し低酸素環境を軽減する)</p>			
<p>笹島らは、ヒト膵癌細胞株 KP1N を移植した Xenograft モデル、および Cre-loxP システムによる膵自然発癌マウスモデルに、マウスから得られた培養骨髄単核球細胞(正常血管新生誘導細胞 nVPC)を 5×10^5/匹を経静脈的に移植した。nVPC 移植を行った Xenograft モデルでは、6 週間までの腫瘍観察期間において腫瘍増大を促進せず、一時的増殖遅延をもたらした。組織学的には、移植群で微小血管密度の増加、血管内腔面積の拡大、壁細胞の増加を認めた。造影超音波法による血流評価でも、腫瘍内血流の増加を認め、低酸素領域が減少し、低酸素のマーカである CA9 の発現は低下していた。また、腫瘍細胞の増殖 (Ki-67 labeling-index) は移植群で低下し、アポトーシスは増加していた。また、移植群では線維化も低下していた。さらに移植群では、血管新生因子(VEGF, IL8)が抑制され、血管新生抑制因子(PEDF)が増加、薬剤抵抗性遺伝子 (MDR1, ABCG2)、Stemness 関連遺伝子 (OCT4,SOX2) の発現低下が見られ、薬剤抵抗性遺伝子 (MDR1, ABCG2)、Stemness 関連遺伝子 (OCT4,SOX2) の発現低</p>			

下が見られ、ゲムシタビンのトランスポーターである hENT の増加をみた。腓自然発癌マウスモデルにおいても以上と同様の結果が得られた。

笹島らの検討より、腫瘍血管の正常化は腫瘍増殖を惹起せず、逆に一時的な増殖遅延を引き起こしており、*in vitro* においても低酸素環境に順応した腓癌細胞は正酸素化ではむしろ増殖能の低下がみられ、腫瘍組織の再酸素化は腫瘍増殖の抑制的に働くこともこれを裏付けている。また、移植群で薬剤耐性遺伝子の減少やゲムシタビンのトランスポーターの増加を惹起していることから、nVPC による腫瘍内微小循環の改善と相まって難治性である腓癌の薬物への感受性を高める可能性があり、臨床への応用が期待される研究である。

申請者に対して、各委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な解答が寄せられ、関連分野において広い知識を有していると判断いたしました。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論分は申請者が積み重ねた努力の結果であり、学術的にも充分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論しました。