

ヒト血管内皮前駆細胞の活性化制御による新規がん治療の開発

水上 裕輔 [旭川医科大学消化器・血液腫瘍制御内科学 / 助教]

背景・目的

申請者はこれまでに腫瘍血管新生を担う重要な分子の選択的阻害下においても、癌細胞は代替経路を介して血管新生を維持しながら生存することを明らかにしてきた(Nat Med 2005)。そこで癌微小環境における血管再生機構の理解に基づく新たな治療戦略が必要であることを認識した。

endothelial progenitor cell(EPC)は骨髄より末梢血へと動員され、虚血組織や腫瘍組織などの血管に選択的に集積する特性を有する。また腫瘍組織内の血管内皮細胞は正常組織とは異なる特異的な遺伝子発現を示すことが知られているが、申請者はEPCが癌細胞によって「活性化」され癌微小環境の構築に貢献する可能性を考えた。本研究ではヒトEPCを用いてこの仮説を検証し、癌細胞によるEPC活性化の分子機構を明らかにする。

内容・方法

インフォームド・コンセントの下に成人末梢血より単核球を分離し、血管内皮分化促進培地にて3 - 4日間培養し付着細胞としてEPCを得た。ヒト癌細胞株の濃縮培養上清(CM)によるヒトEPCに対する刺激効果(活性化)を観察した。まずCM刺激によってEPCで起こる血管新生関連遺伝子の発現の変化を定量的RT-PCRにて解析した。次にマトリゲル上でHUVECとEPCのco-cultureを行い、CM刺激を行ったEPCと未刺激のEPCとのHUVECの管腔形成能を比較した。

Tie2/LacZトランスジェニックマウスをドナーとして骨髄移植を行い作製したキメラマウスを用いて皮下にマトリゲル(CM添加群とPBS添加群)を移植し、骨髄由来のEPCのhomingを-gal免疫染色により定量した(matrigel plaque assay)。

結果・成果

ヒトEPCをヒト膀胱癌細胞株由来のCMで刺激したところ、VEGF, SDF-1, Ang-1 mRNAの発現が亢進した。これに対してHUVECやHMVECなどの成熟血管内皮細胞では同様の変化は見られなかった。興味深いことにEPCではCM刺激によってPTCH1の発現上昇が見られ、胎生期の器官形成や原始血管叢の発生に関与するHedgehog経路の活性化が示唆された。膀胱癌の発生段階においてHedgehog経路が活性化すること、膀胱癌細胞が産生するSonic hedgehog(Shh)がautocrinelに作用して自身の増殖を促すことが報告されている(Thayer SP, Nature 2003)。そこで膀胱癌切除標本を用いて免疫組織学的にPTCH1の発現を解析し

たところ、腫瘍血管内皮の約5%に発現を確認できた。これらの実験結果から腫瘍血管新生においてHedgehog経路がEPCを介して何らかの役割を担うことが示唆された。

Shhを発現するヒト膀胱癌細胞株KP-1Nを用いて調整したCMでEPCを刺激した際に見られたVEGFの発現増強は、Shh中和抗体(MAB4641)およびcyclopamineにより抑制された。ことから膀胱癌細胞由来のShhがEPCの血管新生能を促進すると考えられた。さらにEPCのサイトカイン供与体としての役割を解析するために、EPCとHUVECのco-cultureをマトリゲル上で行いHUVECによる管腔形成能を評価した。HUVEC単独ではわずかにしか見られなかった管腔形成はEPCの添加により増強した。さらにCM刺激を行ったEPCを添加した場合にはHUVECの管腔形成能はより顕著に増強され、MAB4641およびcyclopamineにより部分的に抑制された。膀胱癌由来のShhによってEPCが機能的に活性化されることが示された。

最後にShhによるEPCを介した血管新生促進効果をin vivoで確認するために、Tie2/LacZマウスからの骨髄移植キメラマウスの皮下にCMを添加したMatrigelを移植し、Matrigelへ動員されたEPC数を-gal免疫染色により計測した。KP-1NのCMを添加したMatrigelにはPBS群に比較して多数の-gal陽性細胞が認められ、膀胱癌細胞由来の因子による骨髄からのEPC動員が確認された。またEPCのMatrigelへの動員はMAB4641およびcyclopamineの添加により抑制された。

以上よりShhは成熟血管内皮細胞には作用しないものの、EPCを介して直接的・間接的に腫瘍血管新生を促進することが示された。

今後の展望

現在、癌組織におけるEPCの活性化をより網羅的に捉えるために、様々な癌種由来の培養上清によるEPC刺激後の遺伝子変化をマイクロアレイにて解析している。この結果、癌種による血管新生機構の違いがより明確になる可能性がある。また本研究で特定したShh以外にもEPCを活性化し、さらには腫瘍血管新生を促進する因子は多数存在することが予測され、これらを明らかにすることは新たながん治療標的の探索に結びつくと期待される。