

研究テーマ

骨髄由来細胞動員を介したがん関連ニッチ形成機構の解明

【はじめに】

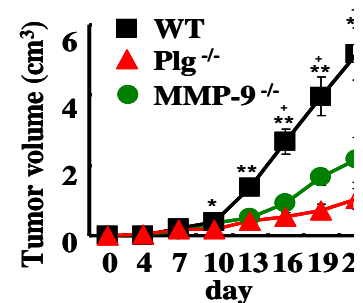
悪性リンパ腫はリンパ球に由来する悪性腫瘍で、本邦では年間二万人以上の発症があり、うち九千人以上が亡くなっている(2003年、2006年国立がんセンターがん対策情報センター)。悪性リンパ腫の病態と治療に関する知見は徐々に集まりつつあるもののすべての患者を治癒できるというレベルには程遠く、さらなる治療法の改善が望まれている。近年リンパ腫患者に於いて金属要求性蛋白分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の血中濃度の上昇が報告され¹、リンパ腫増殖とMMPの関連が示唆されている。MMPsは24種類以上のサブタイプが存在し、がん増殖において増殖、転移など様々なプロセスに関与していることが明らかとなっており、リンパ腫を含めたがん治療に有用な標的因子と考えられてきた。しかし現在までに開発されてきたMMP阻害剤は様々な副作用により治験中止に至っているケースが多く、MMP制御機構のより詳細な理解が急務とされている²。血液線維素溶解系(線溶系:図1)は血液中における血栓溶解作用が主に知られている一方、線溶系因子の一つであるプラスミノゲン

(Plg)/プラスミン(P1m)はMMP活性化の制御因子であることが近年 *in vitro*³で明らかにされている。また、臨床レベルでもリンパ腫患者において血液中での線溶系亢進を示唆する臨床報告が数多くなされ、MMPの上流に位置する線溶系のリンパ腫増殖における意義が注目され始めている。我々及び共同研究者らのグループはこれまでの研究で各種MMPs、特に血管基底膜の主に構成するIV型コラーゲンを基質とするMMP-9の活性化によって末梢組織中に動員される骨髄由来細胞がVEGFの供給を介して血管新生を促進し、組織再生を促進すること^{4,5}を報告してきた。

さらにMMPsの活性化が、こうした骨髄由来細胞群の増殖因子として機能するKit-ligand(KitL)のプロセッシングを促進する事実を明らかにしてきた⁶。1970年代よりFolkmanらによってがん増殖における血管新生の重要性が提唱され、リンパ腫を始めとしたがん増殖において血管新生の阻害はがん治療の重要な標的とされてきた。我々を含め近年いくつかの施設から、骨髄由来細胞が血管新生因子やケモカインの供給媒体として機能し、がん細胞に至適な微小環境「がん関連ニッチ」を構成していることが報告されてきている^{6,7}。そこで我々は生体内線溶系亢進をMMP活性化を介したリンパ腫細胞の浸潤あるいは転移、増殖の開始点と捕らえ、本研究においてはPlg/P1mによるMMP活性を介した骨髄由来細胞群のリンパ腫組織への浸潤とリンパ腫増殖ないしリンパ腫-がん関連微小環境(ニッチ)形成との関連性の解明、さらにこれらの知見を基礎とした、線溶系因子群を標的とした新規の分子療法の開発を目的とした。

【方法】

マウス悪性リンパ腫細胞であるB6RV2細胞をPlg(P1g^{-/-})、MMP-9(MMP-9^{-/-})遺伝子欠損マウス及びこれらの野生型の背部皮下へ移植し、担がんモデルを作製した。リンパ腫増殖、進展の状況をY0-2、トランネキサム酸などの線溶系阻害剤の薬効と照らし合わせながらその腫瘍径の測定及び線溶系、MMP-9リンパ腫増



(図1)

殖の関係を観察した。またこれらのリンパ腫モデルから一週間毎に血漿を採取し ELISA の手法を用いて KitL、VEGF などのサイトカインのレベルを測定した。なお組織染色に関しては各種骨髄由来細胞の染色を行いリンパ腫組織内における骨髄由来細胞の浸潤を評価した。

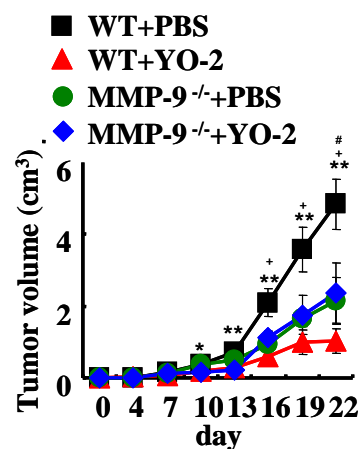
【結果】

1. リンパ腫増殖は P1g/P1m によって活性化された MMP-9 によって制御される。

WT と P1g^{-/-}、MMP-9^{-/-} でマウスリンパ腫の一種である B6RV2 の担がんマウスを作成し、その増殖を観察したところ、WT に比べ P1g^{-/-}、MMP-9^{-/-} では B6RV2 の増殖が抑制されることが確認された(図 1)。この結果から P1m 及び MMP-9 が B6RV2 の増殖を促進していることが確認された。我々は次に P1m によるリンパ腫増殖制御が MMP-9 を介して起こるものと考えた。そこで我々は WT と MMP-9^{-/-} で同様に B6RV2 の担癌マウスを作成し、P1m 阻害剤(YO-2)によるリンパ腫増殖抑制効果を観察した。その結果 WT では YO-2 によるリンパ腫増殖の抑制効果が見られたものの、MMP-9^{-/-} では見られなかった(図 2)。また、WT と P1g^{-/-} の担がんモデルマウスの末梢血中の MMP-9 を ELISA を用いて測定した所、WT ではリンパ腫細胞移植後 7 日目をピークに MMP-9 のレベル増加が観察されるのに対し、P1g^{-/-} ではこの増加が観察されなかった。また野生型に YO-2 を投与したモデルでは P1g^{-/-} 同様に血漿中の MMP-9 のレベルの上昇が観察されなかった。当初、仮説では P1m による MMP-9 の活性化がリンパ腫の増殖をコントロールしているものと考えていたが、これら ELISA の結果やマウス胚線維芽細胞は P1m による刺激で MMP-9 の産生量が増加することなどから P1m は直接 MMP-9 の産生量を増加させているものと考えられる。これらの結果から我々は P1m が MMP-9 の産生増加を通じてリンパ腫増殖に関与していることを示唆した。

2. サイトカイン産生及び骨髄由来細胞の組織内浸潤は P1g/P1m によって制御される。

我々は前章において用いたリンパ腫モデルを使い、KitL や VEGF などの血漿中のサイトカインの濃度測定を行った。この結果、KitL や VEGF は野生型ではリンパ腫細胞移植後 14 日前後をピークに血漿中のレベルが上昇するのに対して P1g^{-/-}、MMP-9^{-/-} 及び野生型、MMP-9^{-/-} リンパ腫モデルを YO-2 で治療したものはこの上昇が観察されなかった。これらの結果は、リンパ腫増殖と同様に KitL や VEGF の血漿中の濃度は P1m による MMP-9 の活性化によって制御されていることが明らかとなった。次に我々は CD45⁺VEGF-R1⁺CXCR4⁺ (hemangiocytes)¹¹, CD45⁺VEGF-R1⁺Gr-1⁺ (neutrophils), CD45⁺VEGF-R1⁺CD11b⁺ (monocytes), CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺ (myelomonocytic cells) and CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ (macrophages and eosinophils) cells などの骨髄由来細胞のリンパ腫組織への浸潤の相違に注目した。我々は WT と P1g^{-/-}、MMP-9^{-/-} を使い B6RV2 リンパ腫モデルを作製し、リンパ腫移植後 7 日目にリンパ腫組織を破碎し、リンパ腫組織中に各種骨髄由来細胞の量をフローサイトメトリーを用いて計測した。その結果、CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ の細胞群のリンパ腫組織内への浸潤が野生型において顕著に観察され、野生型と比較し P1g^{-/-}、MMP-9^{-/-} におけるリンパ腫内への浸潤が有意に減少することが観察された。リンパ腫増殖同様これらの細胞群の浸潤が P1m による MMP-9 の活性化によって制御されている可能性を考え、WT と MMP-9^{-/-} のリンパ腫モデルにおける YO-2 の CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ 浸潤阻害効果をみた。この結果 WT においてはこれらの細胞群の浸潤が YO-2 よって阻害されるのに対し、



(図 2)リンパ腫の増殖 2

MMP-9^{-/-}のリンパ腫モデルではこれらの細胞群の浸潤を抑えることはできなかった。免疫組織染色においてもリンパ腫細胞移植後7日目のリンパ腫組織へのF4/80⁺細胞の浸潤が同様の傾向をしめしており、これらの結果から、骨髄由来細胞のリンパ腫組織への浸潤はリンパ腫増殖同様、PlmによるMMP-9の活性化によって制御されている可能性が示唆された。

【考察】

本研究によって我々は①リンパ腫増殖がPlmによるMMP-9の活性化によって制御されること、②リンパ腫組織中に浸潤しているCD11b⁺F4/80⁺細胞の数はPlmによるMMP-9の活性化によって制御されることを明らかにした。今後はリンパ腫増殖とCD11b⁺F4/80⁺細胞のリンパ腫組織への浸潤の関連性の解明、ならびに転移・悪性化へのPlmによるMMP-9の活性化の寄与の解明、及び各癌種のPlmによるMMP-9の活性化の寄与の大きさの検討を行っていきたい。本研究はリンパ腫細胞動態・増殖機構に関連性が高いMMPの活性を線溶系因子群によって制御することができる可能性に注目して始められた。トラネキサム酸に代表される線溶系阻害剤は従来から止血剤として一部臨床でも使用され、ある程度その安全性が確認されている。これら線溶系活性を標的する薬剤を、MMP制御を介したリンパ腫を始めとするがん治療へと応用を試みた本研究の着想は、次世代型がん治療法の基礎研究として、さらにがんの病態解明の面でも多くの意義を持っていると考えられる。なお本研究と平行して行われた線溶系亢進による血管新生誘導については、再生医療面での有用性が確認されており、本研究成果との整合性を認めている^{8,9}。

【参考文献】

1. Hazar B, Polat G, Seyrek E, Bagdatoglu O, Kanik A, Tiftik N. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Clin Pract.* 2004;58:139-143.
2. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, et al. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost.* 2005;93:676-681.
3. Rao CN, Mohanam S, Puppala A, Rao JS. Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255:94-98.
4. Heissig B, Lund LR, Akiyama H, et al. The plasminogen fibrinolytic pathway is required for hematopoietic regeneration. *Cell Stem Cell.* 2007;1:658-670.
5. Ohki Y, Heissig B, Sato Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J.* 2005;19:2005-2007.
6. Jin DK, Shido K, Kopp HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4⁺ hemangiocytes. *Nat Med.* 2006;12:557-567.
7. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate pre-metastatic niche. *Nature.* 2005; 438: 820-827.
8. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, et al. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis. during tissue regeneration. *Blood.* 2010; in press.
9. Ishihara M, Heissig B, Nishida C, et al. The fibrinolytic system regulates myeloid cell recruitment and lymphoma growth via MMP-9. *Blood.* 2010; revised.