

腫瘍血管内皮アポトーシス制御による治療法の開発

大阪大学微生物病研究所情報伝達分野

内藤 尚道

1. はじめに

固形癌の成長には血管新生が必須であり、新生血管を破壊する分子標的薬や中和抗体が臨床応用されている。現在、血管新生促進因子VEGFとその受容体VEGFRおよびそのシグナル経路を標的とする薬剤が使用されている。これらの薬剤はマウスでの実験結果から画期的な効果を示す治療薬になることが期待されていたが、実際には生命予後の劇的な改善は認めなかった。腫瘍がVEGF-VEGFR経路を標的とした血管新生阻害剤へ耐性化していることが、その原因として提唱されている。現在使用されている血管新生阻害剤は、同経路を標的としているために異なる抗血管新生薬の選択肢が存在しない。

TGF β activated kinase 1 (TAK1)はTNF受容体、TGF β 受容体、toll-like receptorなどいくつかのシグナル経路の下流因子として知られている分子である。TAK1のKOマウスは胎生期に血管形成異常を呈し胎生致死であることが知られている。TAK1は細胞の生死を調整する重要な分子であることが知られているが、成体の血管内皮細胞での機能は解明されていない。本研究では成体の血管内皮細胞におけるTAK1の機能解析を通じて、腫瘍血管内皮細胞でのTAK1の役割を解明し、血管内皮細胞に細胞死を誘導することにより腫瘍血管を破壊する方法の開発を目指した。

2. 方法

① 成体マウスの血管内皮細胞におけるTAK1の機能解析

血管内皮細胞特異的TAK1ノックアウトマウス (VEcadherin(BAC)-CreERT2/ TAK1^{flox/flox}マウス) の解析を行った。全身の臓器の血管を免疫染色で評価した。また血管の透過性の評価、電子顕微鏡を用いた構造の評価を行った。

② 血管内皮細胞培養系を用いたメカニズムの解析

マウスから血管内皮細胞をフローサイトメトリーで分離して、OP9細胞と共に培養した。この培養系に各種阻害剤を加えることにより血管内皮細胞のシグナル経路の解析を行った。

③ 腸における血管内皮細胞の解析

腸管の血管内皮細胞と腸内細菌との関係の解析を行った。腸内細菌を抗生剤を用いて減らすことにより血管内皮細胞にどのような影響が出るか免疫染色で解析した。

④ 炎症モデルの誘導による内皮特異的TAK1欠損マウスの解析

下肢筋肉に蛇毒を用いて炎症を誘導した。また肺にはLPSを用いて急性肺炎を誘導した。炎症を誘導された時の血管内皮TAK1の機能解析を行った。

⑤ 腫瘍への応用

マウス皮下腫瘍移植モデルを用いて内皮細胞TAK1の腫瘍血管における機能解析を行った。また、血管内皮細胞TAK1の阻害が腫瘍細胞の増殖にどのように影響を及ぼすか、免疫染色で評価した。

3. 結果

① 成体マウスの血管内皮細胞におけるTAK1の機能解析

成体の VECadherin(BAC)-CreERT2/TAK1flox/floxマウスにタモキシフェンを投与して成体の血管内皮細胞で特異的にTAK1遺伝子をknockdownした。最初のタモキシフェン投与から11日以内にマウスは著明な貧血を呈し死亡した。詳細に解析を行うと、肝臓および腸管で出血を起こしていることが明らかになった。免疫染色を行うと、腸管粘膜、肝臓の血管の崩壊を認めた(図1)。残存する血管内皮細胞はCleaved caspase3陽性でありアポトーシスが誘導されていることが分かった。

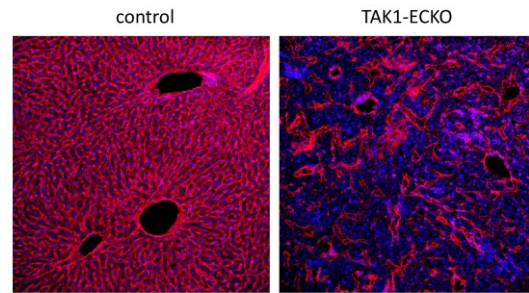


図1 肝臓血管内皮の免疫。血管内皮細胞を抗CD31抗体(赤)を用いて染色した。核を青で示している。血管内皮特異的TAK1ノックアウトマウス(TAK1-ECKO)では、血管ネットワークが崩壊している。

② 血管内皮細胞培養系を用いたメカニズムの解析

次にタモキシフェンを投与していないVECadherin(BAC)-CreERT2/TAK1flox/floxマウスの肝臓から血管内皮細胞を分離してOP9 feeder細胞上で培養した。10日間で血管内皮細胞は血管ネットワークを形成する。この培養系にタモキシフェンを添加すると、in vivoと同様に血管内皮ネットワークの崩壊と、アポトーシスを認めた(図2)。さらにこの内皮細胞の培養系にTAK1の上流因子の中和抗体を加えて、メカニズムの解析を行った。TAK1欠損による内皮細胞の崩壊はTNF α の中和抗体を添加した時に軽減された。TAK1の欠損による内皮細胞の崩壊にはTNF α -TNFR1シグナルを介した内皮細胞のアポトーシスが関与していることが分かった。

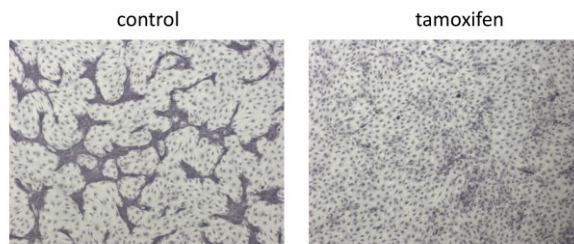


図2 血管内皮細胞培養。血管内皮細胞を抗CD31抗体(青)を用いて染色した。血管内皮特異的TAK1ノックアウトマウスから内皮細胞を分離して血管ネットワークを形成させたのちに、タモキシフェンを添加した。in vitroでも生体内と同様に血管ネットワークが崩壊する。

③ 腸における血管内皮細胞の解析

内皮細胞特異的TAK1欠損マウスでもTNF α -TNFR1シグナルが関与していることが考えられるため、次にTNF α の各組織における発現パターンの解析を行った。その結果、定常状態では、腸管粘膜にTNF α 発現細胞を認めた。

このTNF α 発現細胞はマウスに抗生剤を投与して腸内細菌を減少させると、著明に減少することから、腸内細菌に応答している細胞であることが分かった。

④ 炎症モデルの誘導による内皮特異的TAK1欠損マウスの解析

TNF α は炎症反応により誘導されるサイトカインである。TAK1の欠損により内皮細胞がTNF α 依存性のアポトーシスを起こすことが考えられるので、炎症下においてもTAK1が内皮の生存に必須である可能性を調べた。LPSを用いた急性肺炎モデルを作製し、TAK1をknockoutすると、肺でも血管の崩壊とアポトーシスを認めた。蛇毒を用いた筋炎モデルでも同様に血管の崩壊を認めた。このことから、血管内皮細胞のTAK1は全身で炎症が生じた時に血管内皮が死なずに、炎症反応を惹起させるために必要であることが示唆される。

⑤ 腫瘍への応用

腫瘍内では常に炎症が生じており、TNF α も産生されている。そのため、腫瘍血管内皮細胞のTAK1を阻害できれば、新たな血管新生阻害療法として利用できる可能性がある。血管内皮特異的TAK1knockoutマウスに腫瘍を移植し、腫瘍が大きくなった後に、タモキシフェンを投与して血管内皮細胞のTAK1をknockoutした。予想通り、血管の崩壊を認め腫瘍は縮小した。また、腫瘍細胞自体もKi67陽性細胞が減少し、Cleaved caspase3陽性細胞の増加を認めた。血管の崩壊は、腫瘍細胞そのものの死を誘導することが示され、腫瘍血管内皮細胞のTAK1は血管新生阻害療法のターゲットとなりうることが示された。

4. 考察

成体において血管内皮細胞の1遺伝子をknockoutするだけで、マウスの個体そのものが急激に維持できなくなるという報告はまれにしか認めない。今回注目したTAK1遺伝子は血管内皮細胞が炎症にさらされたときに細胞自身が生存するために必須な因子であることが分かった。定常状態では腸管では腸内細菌により局所的な炎症が生じているために、血管が崩壊することが考えられる、今後TAK1遺伝子の上流、下流因子をより詳細に検討していくことで、成体マウスで血管内皮細胞の維持に必要な因子が明らかとなることが期待できる。

TAK1は腫瘍血管新生阻害療法の標的にもなりうることが示された。全身の血管内皮細胞でTAK1を阻害すると、腸管での血管崩壊が生じるので、局所的にTAK1を阻害する方法が必要である。腫瘍細胞自身もTAK1を発現していることが知られている。TAK1の阻害は腫瘍細胞でも細胞死を誘導するとの報告がある。TAK1を腫瘍局所で阻害することにより強力な抗がん作用を示すことが期待できる。

5. 発表論文、参考文献

本内容は現在論文投稿中である。