

腫瘍血管を形成する新規機構「血管内皮滑走」の解析

大阪大学微生物病研究所情報伝達分野

木戸屋 浩康

生体の隅々まで張り巡らされた血管網は、最大の組織として生命活動を支えている。がんの増殖においても血管を介した酸素・栄養分の供給が必須となるため、腫瘍血管の抑制による癌治療法の開発が進められてきた。その結果、多数の血管新生誘導因子が発見され、血管形成を開始させるメカニズムが解明されている。さらに、各種の血管新生阻害薬が開発され臨床において用いられるに至っているが、当初期待されたような劇的な効果は得られていない。しかしながら、腫瘍組織における血管系の重要性は疑いようがなく、血管新生阻害剤の効果が限定的である原因の解明が望まれている。本研究ではその理由として、血管新生に依存しない新規血管形成メカニズムである「血管内皮滑走」の関与を提唱する。本研究では、腫瘍血管の形成における「血管内皮滑走」のメカニズムを明確にすることで、新たな概念に基づく腫瘍血管抑制療法の開発することを目的として研究を進めた。

がんは日本人の死因の第1位となっており、治療法の開発は社会的に重要な課題とされ、多くの取り組みがなされている。外科的に切除することが不可能な癌に対しては化学療法・放射線療法が行われているが、腫瘍細胞を完全に排除することは難しく、より効果的な治療法の開発が求められている。固形腫瘍の増殖には酸素や栄養の供給路として血管を腫瘍組織内へ引き込む必要があるため、腫瘍血管の抑制による「兵糧攻め」のコンセプトに基づく癌治療法の開発が進められてきた。腫瘍組織中の新規血管の発生は、主に血管新生と呼ばれる過程によって形成される。これまでの研究により、VEGF（血管内皮細胞増殖因子）ファミリーをはじめとする多数の血管新生誘導因子が発見され、血管形成を開始させるメカニズムが解明されている (Ferrara N, et al. Nat Med. 2003)。その成果を基に、腫瘍血管形成において中心的な役割を担うVEGFファミリーに対する阻害薬が開発され、臨床的にも利用されるに至っている。しかしながら、予想に反してVEGF系を標的とした血管新生抑制法では治療効果が限定的であることが明らかになりつつあり、新概念に基づく抗腫瘍血管治療薬の開発が待望されている (Grothey A and Galanis E. Nat Rev Clin Oncol. 2009)。

近年、腫瘍血管に対する研究は従来からの血管新生抑制という概念に変わり、血管の正常化誘導や正常血管を増やすことで抗がん剤の流入効率を改善して治療効果を高めるという考えが主流になりつつある (Bridges E and Harris AL. Cancer Cell. 2015)。そのため、血管研究のトレンドは血管の「数」から「質」の制御機構へと視点が変わっており、従来のVEGFシグナル以外の、特に形成後の血管の成熟化や安定化、および血管リモデリングに関する研究に注目が集まっている (Carmeliet P, Jain RK. Nature. 2011)。さらに、発生学的な研究などから血管形成機構の詳細が明らかになるにつれ、高次血管ネットワークの構築には微小環境が織りなす複雑なプログラムが存在することが示唆されてきた。

我々はこれまでに、血管の「質」や、さらには「高次構造」を制御する分子機構の解明のため、胎生期における血管の発生モデルを用いることで研究を行ってきた。その結果、世界に先駆けて血管成熟化を制御するapelin-APJ系を同定し、血管再生療法や抗腫瘍血管療法への応用がもたらす有効性を報告してきた (Kidoya H, et al. EMBO J. 2008, Kidoya H, et al. Blood. 2010, Kidoya H, et al. Oncogene. 2012)。さらに、動静脈の高次構造の形成過程で、血管が管腔構造を保ったままスライドするように移動することで無血管領域に出現してくる現象を見出した (Kidoya H, et al. Dev Cell. 2015) また、この「血管内皮滑走」と名付けた高次血管構造の形成過程において、既知の分類に当てはまらないミエロイド系細胞群が関与していることを発見している。本研究では、新規の血管リモデリング機構として発見した「血管内皮滑走」に着目し、腫瘍血管形成における役割を解明するとともに、血管内皮滑走を制御する未知のミエロイド系サブセットの特性などを解析した。さらに、その成果を基として、血管内皮滑走および新規ミエロイド系サブセットを標的とした癌治療法の開発を目指して検討を進めた。

本研究では、腫瘍血管の完全なる抑制による癌治療法の確立を目指し、血管新生に依存しない腫瘍血管のつくられ方の解明を目指す。この目的を達成するため、血管関連ミエロイドを癌の治療標的として検証を進める「1. 血管関連ミエロイドを標的とした治療法の検討」と、実際に生体内で血管内皮滑走や血管関連ミエロイドを解析する「2. 血管内皮滑走のイメージングと抑制法の検証」を並行して進めた。これらの成果を基に、血管関連ミエロイドを抑制する解析系を用いた生体イメージングを行うことで、世界に先駆けて血管内皮滑走を制御する癌治療法の開発を目指した。

(1) 血管関連ミエロイドを標的とした治療法の検討

これまでの成果から、腫瘍組織内の血管内皮滑走において、ミエロイド様細胞群が関与することを見出し

ている。この新規ミエロイド系細胞群について血球系細胞に対する各種細胞表面マーカーを用いた解析を行ったところ、これまでの分類形式に当てはまらない特徴的な細胞であることが示された。我々はこのミエロイド系細胞群を血管形成に働く新規の細胞群として、「血管関連ミエロイド」と命名した。近年、ミエロイド系細胞には多様な表現型を示すサブセットの存在が報告されており、血管関連ミエロイドは新規のサブセットである可能性があった。そこで、血管関連ミエロイドがどのような細胞群であり、どのように血管近傍にリクルートされて血管内皮滑走を制御しているかを明らかにするため、シングルセル遺伝子発現解析を行った。混合正規分布クラスタリングから細胞群を分類したところ、血管関連ミエロイドに特徴的な分子(VEGF、bFGF、MMPsなど)を特異的に発現する集団が見つかった。これらの細胞群はCCR2などのケモカイン受容体の特異的に発現していることから、これらが血管近傍へのリクルートに関与していると考え、阻害剤を用いた解析を検討している。さらに、血管形成への関与が示唆されている分子もいくつか特徴的に発現しており、血管内皮滑走にこれらの分子が働いている可能性がある。さらに、腫瘍増殖および腫瘍血管形成における血管関連ミエロイドの重要性を示すため、血管関連ミエロイドを欠失するマウスの作成に着手した。これまでの細胞表面マーカーの解析から、血管関連ミエロイドに特異的に発現している分子としてLy6B.2を同定している。そこで、Ly6B.2のプロモーター(4000bp)下にタモキシフェン誘導性のCre遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Ly6B.2-iCreERT2)の作成に着手した。このマウスとCre活性依存的にジフテリア毒素受容体を発現するマウスと掛け合わせることで血管関連ミエロイドを完全に除去することが可能となる。組み替えベクターを作成して受精卵にインジェクションすることでトランスジェニックマウスを作成した。このマウスとレポーターマウス(Rosa26-STOP-EGFP)と掛け合わせる事で、血管関連ミエロイドにて特異的にEGFPが発現するかをフローサイトメトリーおよび組織切片にて確認したが、EGFP陽性細胞はほとんど認められなかった。そこで、新たに血管関連ミエロイドに特異的に発現する分子として同定したVRM1(未公表データに付き分子名は別称)に着目し、プロモーター下にGFPとCre遺伝子が挿入されたノックインマウス(VRM1-EGFP-Cre)の作成を試みた。その前提として、VRM1ヘテロ欠損マウスは大きな異常を示さないことを確認している。遺伝子組み替えベクターを作成して変異ES細胞を作成し、3ラインのVRM1-EGFP-Creマウスが得られた。現在は出生したF1マウスを用いて血管関連ミエロイドがEGFPで標識されているかを検証しており、予備の実験ではあるが一部ではEGFP陽性が確認できている。今後、このマウスとCre活性依存的にジフテリア毒素受容体を発現するマウスと掛け合わせることで血管関連ミエロイドを完全に除去し、腫瘍増殖および腫瘍血管形成への影響を解析したい。その結果から、血管内皮滑走および血管関連ミエロイドが治療標的として有効であるかを検証していきたい。

(2) 血管内皮滑走のイメージングと抑制法の検証

多光子レーザー顕微鏡を用いたin vivoイメージングを行うことで、腫瘍組織内の血管のつくられ方を観察し、血管関連ミエロイドと血管がどのように作用しているかの解明に取り組んだ。血管内皮滑走が腫瘍組織中でも起きているかを検討するため、多光子共焦点レーザー顕微鏡(Leica, TCS SP8 system)を用いた生体イメージングによる経時的な解析を行った。我々が作成した血管イメージングマウス(apelinプロモーター-tdTomato BAC Tgマウス)を用いて、癌細胞の頭蓋骨内表層部への移植による担癌モデルを作成して撮影を行った。72時間以上の長時間にわたる撮影を行うことで、腫瘍組織内で血管内皮滑走が起きている様子が確認できた。また、腫瘍血管組織内の血管内皮滑走においても、血管近傍に特殊なミエロイド系細胞群が蓄積していることを組織学的な解析から明らかにした。さらに、このミエロイド系細胞が産生するMMP9によって、血管を固定している細胞外基質が分解されることが血管内皮滑走に必須であることを見いだした。前述したように、腫瘍組織中に認められるマクロファージなどのミエロイド細胞には、多様な役割を持つサブセットの存在が報告されている。そこで、血管内皮滑走に関与する「血管関連ミエロイド」として明確に定義付けするために、MMP9を高発現するサブセットの細胞表面マーカーを探索したところ、CXCR2陽性かつCD195陰性の細胞群であることが判明した。また、VEGFシグナルを阻害した場合の「血管関連ミエロイド」を解析するため、担癌モデルマウスに対してVEGF阻害剤を投与して解析を行った。腫瘍組織中のミエロイド画分について解析すると、CXCR2陽性CD195陰性のミエロイド細胞群の数と割合が増加していることが明らかとなった。VEGF阻害剤の投与は一過性に腫瘍増大を抑制するが、時間経過に従って腫瘍は再び増大が認められる。腫瘍の再増大と「血管関連ミエロイド」の増加との関連について解析すると、両者に相関が認められ、加えて血管数の再増加も血管関連ミエロイドの割合増加と相関していることが明らかになった。この結果は、血管新生阻害剤に対する治療抵抗性において、血管関連ミエロイドによる血管内皮滑走に関与している可能性を強く示唆している。現在は、前述した血管関連ミエロイドにて特異的にGFP遺伝子を発現するマウスを用いる事により、血管関連ミエロイドの可視化に着手している。また、VEGF阻害剤などの血管新生抑制剤を用いた生体イメージングも行い、血管新生を起こせない場合には、血管関連ミエロイドが血管内皮滑走を引き起こすことで腫瘍内の血管構造が形成されているかを検証していきたい。

発生期においては、無血管領域へと向かった「血管内皮滑走」が起きることで、成長に必要な血管ネットワークの形成が進むことが我々のこれまでの研究で明らかとなっている。また、この「血管内皮滑走」の過程において、ミエロイド系細胞群による細胞外基質の分解が起きていることが示されている(Kidoya H, et al. Dev Cell. 2015)。本研究は、腫瘍組織中においてもミエロイド系細胞群が「血管内皮滑走」を制御しており、腫瘍血管の形成や腫瘍の成長に働いているという仮説に基づいて開始した。研究の結果、腫瘍組織中においても血管内皮滑走が起きており、その際にミエロイド系細胞群が関与している可能性が示された。ミエロイド系細胞群と既存の細胞群との細胞的特性の差異を明確にするため、シングルセル遺伝子発現解析を行ったところ、VEGFやFGFb、MMPsなど血管形成への関与が報告されている分子群の発現に特徴のある新規

サブセットであることが明らかとなり、この細胞集団を血管関連ミエロイドと命名した。腫瘍組織中には多様なミエロイド系細胞サブセットが存在することが明らかになりつつあるが (Schupp J, et al. Cell Immunol. 2017)、本研究で発見された血管関連ミエロイドもそれらに新たに加わるものと思われる。今後の課題として血管関連ミエロイドがどのようにして腫瘍血管周囲に動員されるか、どのようにして血管内皮滑走を誘導しているかの分子機構が求められる。それら機序の解明が進み、血管関連ミエロイドに関する知見が蓄積されれば、血管関連ミエロイドを標的とした新規のがん治療法の開発が期待できる。また、血管新生阻害剤 (VEGF 阻害剤など) に耐性を示す腫瘍では、血管新生阻害剤の投与に反応して血管関連ミエロイドが腫瘍組織内に動員され、その結果として血管内皮滑走が起きていることが生体イメージング解析などから示された。これらのデータは、血管内皮滑走が血管新生阻害剤に対する治療抵抗性の獲得に関わっている可能性を示唆している。腫瘍増殖において血管を介した酸素・栄養分の供給が必要不可欠なことは自明であり、血管新生の阻害に加えて血管内皮滑走の抑制を誘導することで完全な腫瘍血管形成の抑制が可能となれば、1970年代に Judah Folkman 博士によって提唱された血管形成阻害療法 (Folkman J. N Engl J Med. 1971) が実現できるのでは考えている。本研究で得られた成果を発展させることで、がんの根治を可能とする治療法の開発へ向け今後とも腫瘍血管の解析を続けていきたい。