

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 2 年 4 月 1 7 日現在

機関番号：3 4 4 1 9

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：1 6 K 0 8 4 8 1

研究課題名（和文）特殊血管新生と免疫細胞動員による新規腫瘍抑制機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism underlying tumor inhibition by angiogenesis and immune cell recruitment

研究代表者

早坂 晴子（HAYASAKA, HARUKO）

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：7 0 3 7 9 2 4 6

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：腫瘍内血管は組織内に十分な酸素と栄養素を供給させることでがん細胞を増殖させており、がん細胞が遠隔臓器へ血行性転移する際の経路にもなっている。本研究では、転写因子Dach1 恒常的発現マウス（Dach1-Tg）に形成された腫瘍組織の解析から、Dach1 発現が腫瘍増殖と腫瘍内血管形成に促進的に作用する可能性が明らかになった。また、血管内皮細胞特異的に mTFP1 を発現するレポーターマウスを用いて、Dach1-Tgと野生型マウスに形成された腫瘍組織から単細胞を調製し、フローサイトメトリー法による腫瘍組織内 mTFP1 陽性細胞を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内新生血管は、癌組織に酸素や栄養を供給することで癌の生存を促進する。本研究では、リンパ球動員を媒介する高内皮細胞の形成期に特異的に発現するDach1分子が、腫瘍血管形成および免疫細胞動員を介して腫瘍形成に与える意義を検討した。Dach1の発現レベルが高い腫瘍では血管形成が促進したこと、Dach1は高内皮細胞形成期に発現することから、抗腫瘍免疫に関与する免疫細胞を癌組織へ動員する血管が形成された可能性がある。本研究から、癌組織と免疫組織の血管形成において共通に作用する転写因子の存在を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Intratumoral blood vessels support cancer cell proliferation by supplying sufficient oxygen and nutrients, and provide cancer cells with a pathway for metastasis. In this study, we revealed that transcription factor Dach1 expression might promote tumor growth and angiogenesis in tumors. We found that tumor with an increased number of blood vessels grow more vigorously in the mice that constantly expressing Dach1 (Dach1-Tg) compared with wild-type. By a flow cytometric analysis using reporter mice that specifically express mTFP1 in vascular endothelial cells, we compared the percentages of endothelial cells in Dach1-Tg- and wild-type-derived tumors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血管 腫瘍形成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1．研究開始当初の背景

高内皮細静脈（High endothelial venules: HEV）は、リンパ球の組織移動に関与するケモカインや接着分子を発現する特殊な血管である。HEV はリンパ節、小腸パイエル板に形成されるが脾臓では形成されないことから、二次リンパ組織でも特定の環境下で分化誘導されと考えられる。一方、乳癌、メラノーマ、肺がん、卵巣がんなどの癌組織にも、HEV の形態的特徴をもち HEV 特有の遺伝子発現パターンを示す血管構造（HEV-like vessels: HEV-LV）が形成される。例えばマウス造腫瘍モデルでは、癌組織内や周囲にリンパ節様構造が形成され、この構造内の HEV-LV 周囲にリンパ球浸潤がみられる。他にも動脈硬化モデルマウスにおいて、動脈硬化巣周囲に HEV-LV を含むリンパ節様構造体が形成される。この場合、制御性 T 細胞が HEV-LV から動脈硬化巣へ浸潤し、動脈硬化の進行を抑制する可能性が示唆されている。以上のように、HEV-LV 新生は、癌や動脈硬化などの病態制御に重要な役割をもつ果たすことが明らかになりつつある。一方、新生 HEV-LV は免疫細胞移動への関与が示唆されるが、実際に抗腫瘍免疫に対してどのように寄与するのかについては不明である。

## 2．研究の目的

癌組織内に HEV-LV が誘導されれば、免疫細胞が血管を介して癌組織内に積極的に動員され、腫瘍抑制効果が発揮されるという仮説が成り立つ。本研究では癌組織内 HEV-LV 新生を介した抗腫瘍効果を証明することを目的とする。このため、私たちが既に同定した新規 HEV 形成誘導因子の組織特異的な遺伝子欠損マウスおよび恒常的過剰発現マウスを用いて、「特殊血管新生誘導による腫瘍増殖調節」の実態を解明する。これまで私たちのグループは、形成途上のリンパ節における HEV-EC の網羅的遺伝子発現解析を行い、転写因子 *Dachshund1* (*Dach1*) が未熟 HEV-EC において非 HEV 血管の 20～50 倍高発現する遺伝子を同定した。その後の詳細な解析から、*Dach1* が HEV 形成に関与する可能性が考えられた。そこで本研究では *Dach1* 過剰発現マウスを担癌マウスとして使用し、*Dach1* 発現レベルの増加による癌組織内血管新生レベルの変化を解析する。また *Dach1* 高発現マウスにおける血管増加に伴い、癌組織内で細胞数・存在比率が変化する免疫細胞サブセットを特定するため、腫瘍組織由来細胞のフローサイトメトリー解析をおこなう。

## 3．研究の方法

4 週齢の野生型 (WT) マウスおよび *Dach1* 恒常的発現 (Tg) あるいは野生型 (WT) マウスにマウスメラノーマ細胞皮下注射し移植し、2 週間後の腫瘍重量を計測した。つぎに腫瘍組織を血管結合性レクチン I-B4 で染色し、腫瘍組織面積あたりの I-B4 陽性領域面積を Image J を用いて算出した。フローサイトメトリー解析では、血管内皮細胞特異的プロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現し、*mTFPI* 遺伝子をもつマウス (*mTFPI/Control*) および *mTFPI* 陽性 *Dach1* 恒常的発現マウス (*mTFPI/ Dach1-Tg*) に腫瘍を形成させ、酵素処理で単細胞懸濁液を調製し、解析した。

#### 4 . 研究成果

WT と *Dach1*-Tg 間で腫瘍重量を比較したところ、*Dach1*-Tg において有意な増加が見られた。このことから、*Dach1* が腫瘍形成を促進する可能性が示唆された。また WT マウスに比べ *Dach1*-Tg マウスで形成されたメラノーマ組織ではより多くの I-B4 陽性血管が検出された。腫瘍組織の CD34 染色画像と mTFP1 陽性画像を重ね合わせたところ、CD34 染色シグナルと mTFP1 陽性シグナルの重なりがみられたことから、mTFP1 が血管内皮細胞に特異的に発現していることが確認できた。さらに、WT と *mTFP1/Tie2* に形成された腫瘍組織で CD34 陽性細胞と mTFP1 陽性細胞の割合をフローサイトメトリー法により解析したところ、*mTFP1/Tie2* に形成された腫瘍組織で CD34 陽性/mTFP1 陽性の細胞集団が検出され、この集団を細胞分離することができた。以上のことから WT と *Dach1*-Tg の腫瘍血管内皮細胞の細胞分離による HEV-LV の遺伝子発現解析を進める基盤が整った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takaoka Yousuke, Uchinomiya Shohei, Kobayashi Daichi, Endo Masataka, Hayashi Takahiro, Fukuyama Yoshiaki, Hayasaka Haruko, Miyasaka Masayuki, Ueda Takumi, Shimada Ichio, Hamachi Itaru	4. 巻 4
2. 論文標題 Endogenous Membrane Receptor Labeling by Reactive Cytokines and Growth Factors to Chase Their Dynamics in Live Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.03.021">https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.03.021</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi D, Endo M, Ochi H, Hojo H, Miyasaka M, Hayasaka H	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-09113-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤原翔, 鈴木峻介, 大東いずみ, 高浜洋介, 早坂晴子
2. 発表標題 Ccl21a KO マウスにおけるB16F10メラノーマ増殖能の低下
3. 学会等名 日本がん転移学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早坂 晴子、永井 隼斗、酒井 智弘、曽根 麻由奈、野出 裕介
2. 発表標題 Dach1恒常的発現マウスを用いた高内皮細静脈形成メカニズムの解析
3. 学会等名 日本血管生物医学会
4. 発表年 2018年

1．発表者名 野出 裕介, 奥田 結衣, 永井 隼人, 酒井 智弘, 深井 祥子, 早坂 晴子
2．発表標題 リンパ節高内皮細静脈内皮細胞分化におけるDach1遺伝子の機能解析
3．学会等名 日本分子生物学会
4．発表年 2018年

1．発表者名 遠藤 正隆、黒蔭 馨、小林 大地、池本 光志、早坂 晴子
2．発表標題 ケモカイン刺激で誘導されるリンパ球遊走性物質の産生
3．学会等名 日本分子生物学会
4．発表年 2018年

1．発表者名 Haruko Hayasaka, Daichi Kobayashi, Masataka Endo, Hironobu Hojo, Masayuki Miyasaka
2．発表標題 CCR7 homo-dimerization regulates CCR7 ligand-dependent cell migration and signaling
3．学会等名 北米細胞生物学会（国際学会）
4．発表年 2017年

1．発表者名 藤原 翔、森 空悟、大東 いずみ、高浜 洋介、早坂 晴子
2．発表標題 メラノーマ組織に形成される高内皮細静脈様血管の検出
3．学会等名 日本癌転移学会
4．発表年 2017年

1．発表者名 遠藤 正隆、小林 大地、高岡 洋輔、 早坂 晴子
2．発表標題 ケモカイン依存的細胞遊走におけるケモカイン受容体の局在変化と脂質ラフトの役割
3．学会等名 日本分子生物学会
4．発表年 2017年

1．発表者名 酒井 智弘、長江 峻平、松本 萌、平野 晴香、早坂 晴子
2．発表標題 血管特異的 Dach1 ノックアウトマウスを用いた高内皮細静脈形成メカニズムの解析
3．学会等名 日本分子生物学会
4．発表年 2017年

1．発表者名 Kobayashi D, Miyasaka M, Hayasaka H.
2．発表標題 CCR7 homo-oligomerization plays an important role in CCR7-dependent signaling.
3．学会等名 第45回日本免疫学会
4．発表年 2016年

1．発表者名 早坂 晴子、松田 幸、宮坂 昌之
2．発表標題 ヒト乳がん細胞リンパ節転移におけるCCR7およびCXCR4リガンドケモカインの関与
3．学会等名 第28回 日本がん転移学会学術集会
4．発表年 2019年

1. 発表者名 黒藤 馨、遠藤 正隆、早坂 晴子
2. 発表標題 リンパ球感の細胞遊走を制御する走化性因子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井隼斗、新谷ありさ、酒井智弘、深井祥子、早坂晴子
2. 発表標題 リンパ節血管形成における転写因子Dach1遺伝子の関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生細胞で内在的に発現する細胞膜受容体の新規ラベル法を開発  <a href="https://www.kindai.ac.jp/sci/rd/018232.html">https://www.kindai.ac.jp/sci/rd/018232.html</a>          細胞走化性レベルの調節に受容体の多量体形成が関与することを発見  <a href="http://www.kindai.ac.jp/sci/rd/017309.html">http://www.kindai.ac.jp/sci/rd/017309.html</a></p>
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考