

論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍血管新生における骨髄由来血管前駆細胞の関与

指導教官 幕内雅敏教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士過程

外科学専攻

氏名 名取 健

固形腫瘍の増殖には血液の供給が必要であり、そのためには新しい血管を形成しなければならない。すなわち、腫瘍の増殖、転移は血管新生に依存しており、腫瘍血管新生の抑制は腫瘍の進展を抑制する治療戦略の一つとなりうると考えられている。

血管の発生する過程は大きく二つに分類される。すなわち *vasculogenesis* とそれに引き続いて起こる *angiogenesis* である。*Vasculogenesis* とは中胚葉細胞内の前駆細胞が血管芽細胞に分化し、さらに血管内皮細胞へと分化して原始血管網を形成する過程である。*Angiogenesis* とは既存の血管の成熟した血管内皮細胞が増殖、遊走することにより、既存の血管から新しい血管が発芽する過程である。従来、*vasculogenesis* は胎生初期のみに限定された現象であり、成体内での血管の発生は *angiogenesis* の結果によるものと考えられていた。しかし、最近、末梢血流内を循環する血管内皮前駆細胞の存在が確認された。骨髄から未分化な血管内皮前駆細胞が動員され、成体内

での血管新生に寄与していることが示されている。これまで腫瘍血管新生は既存の血管から新しい血管の分岐が発生する *angiogenesis* の過程で生じると考えられていたが、腫瘍血管新生においても *vasculogenesis* 型の血管形成も関与していることが推察される。しかし、腫瘍血管新生における骨髄由来血管内皮前駆細胞の位置付けは不明である。

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は糖蛋白分子からなる造血性サイトカインの一つである。G-CSF は白血球、とくに顆粒球の産生を刺激するが、末梢血に造血幹細胞を動員させることが知られている。G-CSF と同様な作用を有する造血性サイトカイン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) が血管内皮前駆細胞を末梢循環内に動員し、虚血組織内での血管新生を増強させることが報告された。G-CSF も骨髄から血管内皮前駆細胞を末梢血流内に動員し、血管新生を増強させることが予想されるが、これまでに G-CSF が腫瘍血管新生を増強し、腫瘍増殖を促進させたという報告はない。

以上をふまえ、本研究の目的は、骨髄幹細胞に作用する G-CSF を用いて腫瘍増殖および腫瘍血管新生に与える効果を検討することにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞が腫瘍血管新生において重要な役割を果たしている可能性を検証することである。

G-CSF による *in vivo* における腫瘍増殖への効果を調べるため、癌移植モデルを使用した。 2×10^7 個のマウス大腸癌細胞 CMT93 を C57BL/6J マウスの左大腿部に皮下接種した。G-CSF ($20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) もしくはコントロールとして生食をマウスに腹腔内投与した (各 $n=6$)。G-CSF 群において腫瘍増殖は有意に促進された ($p < 0.01$)。

次に、G-CSF が *in vitro* において癌細胞増殖を直接刺激するか調べた。培地に各濃

度 (10^{-14} ~ 10^{-6} M) の G-CSF を添加し、 7×10^4 個の CMT93 細胞を培養した (各 n = 4)。24 時間後の細胞数に有意な差は認められなかった。G-CSF は *in vitro* では細胞増殖に影響を与えなかった。

G-CSF が腫瘍血管新生に与える影響を調べるため、癌細胞移植後 21 日目に腫瘍を採取し、血管内皮を特異的に染色する抗 CD31 抗体による免疫組織染色を行った。腫瘍内に新生した血管の内皮細胞が CD31 陽性として明らかとなった。G-CSF 群の毛細血管密度はコントロール群と比較して有意に高かった (554 ± 44 capillaries/mm² 対 273 ± 15 capillaries/mm², $p < 0.01$)。

腫瘍内の新しい血管の形成に骨髄由来細胞が貢献している可能性を調べるために、マーカー遺伝子 LacZ が発現している ROSA26 マウスの骨髄で骨髄を置換した野生型マウスに 1×10^7 個の癌細胞 CMT93 を皮下接種した。マウスには G-CSF ($20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) を投与した。7 日後、腫瘍を採取し、抗 CD31 抗体および抗 LacZ 抗体による蛍光免疫二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。腫瘍内の CD31 陽性血管内皮に LacZ が発現している骨髄細胞由来のものがみられた。

本研究において、*in vitro* では G-CSF は癌細胞増殖に直接作用しないにもかかわらず、*in vivo* で G-CSF は腫瘍増殖を促進することが発見された。G-CSF による腫瘍増殖の促進は腫瘍血管新生の増強との関連が示唆された。すなわち、G-CSF は腫瘍血管新生を増強することにより腫瘍増殖を促進させることが示唆された。また、マーカー遺伝子導入マウスの骨髄移植モデルを用いて、骨髄由来細胞が腫瘍血管新生に寄与している直接的な証拠を示した。通常の組織染色では血管内皮細胞が既存の血管の内皮細胞由来か骨髄細胞由来かを区別することはできない。本研究では、マーカ

一遺伝子導入マウスと骨髄移植を巧妙に組み合わせることにより、腫瘍中に新生した血管の内皮細胞における骨髄由来細胞の視覚化に成功した。

G-CSF は CD34 陽性細胞を末梢血中に遊離させることが知られている。最近の研究では、末梢血内を循環する CD34 陽性または Flk-1 陽性細胞が血管内皮細胞に分化することが示されており、また G-CSF により遊離した CD34 陽性細胞により血管新生が増強されることが示されている。本研究では G-CSF は骨髄細胞が寄与している腫瘍血管新生を増強していることを示している。G-CSF が新生腫瘍血管に組み込まれる血管内皮前駆細胞の分化や動員に影響していると考えられる。

近年の幹細胞研究の進歩に伴い、G-CSF を用いて骨髄細胞から様々な細胞へ再生させる可能性に興味が高まっている。しかし、本研究の知見は G-CSF は直接的ではないにしる癌を増殖させる可能性を示しているため、再生医療における G-CSF の投与には十分な注意が必要であると考えられる。

本研究は、G-CFS により動員された骨髄細胞が腫瘍血管新生を増強し腫瘍増殖を促進する可能性を示唆している。この結果は骨髄由来血管前駆細胞が腫瘍血管新生、腫瘍増殖において重要な役割を果たしていることを支持している。