

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

印

(学位論文のタイトル)

MFG-E8 drives melanoma growth by stimulating mesenchymal stromal cell-induced angiogenesis and M2 polarization of tumor-associated macrophages

MFG-E8は間葉系幹細胞による腫瘍血管新生と腫瘍随伴性マクロファージを誘導して悪性黒色腫の成長を促進させる。

(学位論文の要旨)

分泌蛋白質MFG-E8は、N末端に2つの上皮成長因子様ドメイン (E1, E2) を持ち、E2ドメインにはインテグリンとの結合に重要なRGD配列を含む。MFG-E8は、このRGD配列を介して、インテグリン $\alpha v \beta 3/5$ と結合し、マクロファージによるアポトーシス細胞の食食促進機能やコラーゲン代謝能の制御など様々な機能制御に関わっている。

これまでに我々は、悪性黒色腫において、血管周皮細胞 (ペリサイト) がMFG-E8を多く分泌し、分泌されたMFG-E8がVEGFレセプターやPDGFレセプターシグナルを活性化させて血管新生を促すことを報告している。近年、ペリサイトの中に脂肪細胞、骨、軟骨細胞への分化能を持つ間葉系幹細胞(MSC) が含まれることが報告されていることや、腫瘍においては、MSCが血管周囲に遊走し、ペリサイトとしての役割を果たし腫瘍血管新生を促進させることも報告されていることから、悪性黒色腫においてMFG-E8がMSCの機能を制御しているという仮説を考えた。よって、この仮説を証明・解明することを目的とし研究を行った。

ペリサイトはMSC由来の細胞であることから、マウス骨髄細胞由来MSCにおけるMFG-E8の発現を調べた結果、骨髄由来MSCは、悪性黒色腫細胞やペリサイト様細胞10T1/2細胞と比べて、多くのMFG-E8を発現することを見出した。FACSにて、MFG-E8野生型(WT)マウス、MFG-E8欠損 (KO) マウスの骨髄より作成したMSCの細胞表面分子の発現量を比較した結果、MSCのマーカーとして知られているSca-1, CD105, CD44の発現量に差はみられなかった。次に悪性黒色腫細胞とGFPマウス骨髄由来MSCを混ぜてマウスに皮下移植し、MSCの局在について検討した。その結果、MSCは悪性黒色腫内で血管内皮細胞周囲に局在し、一部はペリサイトマーカーNG2やMFG-E8を発現していた。

次に、MSCの悪性黒色腫に対する影響を見るために、マウスの皮下に①メラノーマ細胞単独、②悪性黒色腫細胞とMFG-E8 WTマウス由来MSC、③悪性黒色腫細胞とMFG-E8 KOマウス由来MSCを移植する3群を作製し、腫瘍の成長を比較した。その結果、メラノーマ細胞単独①と比較して、MSCを移植した腫瘍 (②、③) は増殖が亢進することと、悪性黒色腫細胞とMFG-E8 KOマウス由来MSCを移植した腫瘍③は、悪性黒色腫細胞とMFG-E8 WTマウス由来MSCを移植した腫瘍②と比べて、増殖が抑制された。この結果より、MSCによる悪性黒色腫の増殖促進効果にMFG-E8が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

次に腫瘍内血管量について検討したところ、MFG-E8 WTマウス由来MSCを移植した腫瘍②で血管内皮細胞とペリサイトの量が亢進していた。また、MFG-E8 WTマウス由来MSCを移植した腫瘍②内には腫瘍随伴性マクロファージ (TAM: CD68+, CD206+細胞) の量がMFG-E8 KOマウス由来MSCを移植した腫瘍③より増加していた。クロドロネートリポソームによってマクロファージを除去したところ、MFG-E8 WTマウス由来MSC による腫瘍増殖亢進が抑制された。In vitroにてMSCによるマクロファージの分化能 (M1/M2マクロファージ) への

影響について検討した。MFG-E8 WTマウス由来MSCの培養上清で培養したマクロファージ（RAW264.7）は、M2マクロファージのマーカであるarginase-1, CD206の発現が増加したが、MFG-E8 KOマウス由来MSCの培養上清では増加しなかった。

これらの結果より、MSCによるM2マクロファージへの分化促進にはMFG-E8が関与している可能性が示唆された。さらに、MFG-E8 WTマウス由来MSCは、血管増殖因子（VEGFやエンドセリン-1）の発現が増加していた。ヒト悪性黒色腫内のMFG-E8の局在を検討した結果、MFG-E8 は血管周囲を中心に見られ、特にペリサイト中に見られた。これらの結果から、悪性黒色腫内に骨髄から遊走したMSCは血管周囲でMFG-E8やVEGFなどを産生して血管新生を亢進させることと、腫瘍随伴性マクロファージ（M2マクロファージ）を誘導し腫瘍の成長を促進させることが示唆された。抗MFG-E8抗体が上記の機序を抑制することにより悪性黒色腫の成長を抑制し、新たな治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。