



Title	腫瘍血管内皮マーカーであるCXCR7の腫瘍血管内皮における機能解析に関する研究
Author(s)	山田, 健司
Description	配架番号 : 2239
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12135号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12135
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63965
Type	doctoral thesis
File Information	Kenji_Yamada.pdf



学位論文

腫瘍血管内皮マーカーである CXCR7 の腫瘍血管内皮における機能解析に関する研究
(A functional analysis of CXCR7 expressed in tumor endothelial cells)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

山田 健司

学位論文

腫瘍血管内皮マーカーである CXCR7 の腫瘍血管内皮における機能解析に関する研究
(A functional analysis of CXCR7 expressed in tumor endothelial cells)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

山田 健司

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	10 頁
考察	29 頁
総括および結論	32 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の結果の一部は以下の論文に発表した

1. Kenji Yamada, Nako Maishi, Kosuke Akiyama, Mohammad Towfik Alam, Noritaka Ohga, Taisuke Kawamoto, Masanobu Shindoh, Norihiko Takahashi
Toshiya Kamiyama, Yasuhiro Hida, Akinobu Taketomi, Kyoko Hida

CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property
International Journal of Cancer: 137, 2825-2836 (2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 山田健司、間石奈湖、大賀則孝、秋山廣輔、川本泰輔、Mohammad Towfik Alam,
大村瞳、鳥居ちさほ、高橋典彦、樋田泰浩、進藤正信、武富紹信、樋田京子
腫瘍血管内皮における CXCR7 の機能解析

第 102 回日本病理学会総会 2013. 6. 6 札幌

2. Kenji Yamada, Nako Maishi, Noritaka Ohga, Kosuke Akiyama, Taisuke Kawamoto,
Mohammad Towfik Alam, Masanobu Shindoh, Norihiko Takahashi, Toshiya Kamiyama,
Yasuhiro Hida, Akinobu Taketomi, Kyoko Hida

The role of a chemokine receptor CXCR7 in tumor endothelial cells

第 21 回日本血管生物医学会学術集会 2013. 9. 26 大阪

3. Kenji Yamada, Nako Maishi, Noritaka Ohga, Kosuke Akiyama, Taisuke Kawamoto,
Mohammad Towfik Alam, Masanobu Shindoh, Norihiko Takahashi, Toshiya Kamiyama,
Yasuhiro Hida, Akinobu Taketomi, Kyoko Hida

The role of a chemokine receptor CXCR7 in tumor endothelial cells

第 72 回日本癌学会学術集会 2013. 10. 3 横浜

4. 山田健司、間石奈湖、大賀則孝、秋山廣輔、樋田泰浩、川本泰輔、Alam Towfik Mohammad,
高橋典彦、神山俊哉、武富紹信、樋田京子

腫瘍血管内皮マーカー CXCR7 の腫瘍血管内皮における機能解析

第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014. 4. 3 京都

5. Kenji Yamada, Nako Maishi, Noritaka Ohga, Kosuke Akiyama, Taisuke Kawamoto, Mohammad Towfik Alam, Masanobu Shindoh, Norihiko Takahashi, Toshiya Kamiyama, Yasuhiro Hida, Akinobu Taketomi, Kyoko Hida

The role of a chemokine receptor CXCR7 in tumor endothelial cells

The 18th International Vascular Biology Meeting 2014. 4. 15 京都

6. Kenji Yamada, Nako Maishi, Kosuke Akiyama, Noritaka Ohga, Taisuke Kawamoto, Masanobu Shindoh, Norihiko Takahashi, Toshiya Kamiyama, Yasuhiro Hida, Akinobu Taketomi, Kyoko Hida

CXCR7 as a novel target for anti-angiogenic therapy

第 73 回日本癌学会学術集会 2014. 9. 25 横浜

7. 山田健司、間石奈湖、大賀則孝、秋山廣輔、樋田泰浩、川本泰輔、Mohammad Towfik Alam, 高橋典彦、神山俊哉、樋田京子、武富紹信

腫瘍血管内皮マーカーCXCR7 の腫瘍血管内皮における機能解析

第 25 回日本消化器癌発生学会総会/第 8 回国際消化器癌発生会議 2014. 11. 13

緒言

近年, vascular endothelial growth factor (VEGF) 中和抗体に代表される血管新生阻害療法は様々ながん治療に用いられており, 生存率が向上している¹. しかし, VEGF は生理的な正常組織における血管新生にも重要な分子であり, VEGF 阻害による高血圧や創傷治癒遅延などの様々な副作用が報告されている². 我々はこれまでに腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell : TEC) を分離培養し, それらが正常血管内皮細胞 (Normal endothelial cell : NEC) と比較して染色体異常があること, 抗がん剤などの薬剤に対する感受性が低いこと, 様々な遺伝子の発現が亢進しており血管新生能が高いことなどを報告してきた³. これら異常性を獲得した TEC のみを標的とする治療法の開発が, より効果的で正常血管に対する副作用が少ない新規血管新生阻害薬の開発につながると考えた. 学位申請者が研究を行った本学遺伝子病制御研究所フロンティア研究ユニット・血管生物学教室では DNA microarray による網羅的解析を行い, TEC で特異的に発現するマーカーの同定を行い, 報告してきている⁴⁻⁷. その中で NEC に比べ TEC において発現が 200 倍以上高かった C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) に着目した. CXCR7 は 7 回膜貫通型タンパクであり, Stromal cell derived factor 1 (CXCL12) をリガンドとしている. 脳腫瘍や前立腺癌・肺癌など様々な癌細胞で発現が亢進していると報告されており⁸⁻¹⁰ 肺癌や大腸癌においては CXCR7 高発現と予後との関係が報告されている. また, 前立腺癌・腎細胞癌組織では腫瘍部の血管においても CXCR7 が発現していることが報告されている¹¹⁻¹². また, 本研究室では腎細胞癌より分離・培養した TEC において NEC よりも CXCR7 発現レベルが高い事を報告した¹³. しかし, TEC における CXCR7 の機能は未だ不明である. 本研究では TEC における CXCR7 の血管新生に対する機能を解析し, CXCR7 阻害による抗腫瘍効果を検討した. 過去の報告に一致して本研究においても CXCR7 は TEC に高く発現していることが示された. 次に TEC における CXCR7 の機能を解析した. siRNA ならびに CXCR7 阻害剤 CCX771 を用いて同分子を阻害すると, TEC の細胞遊走能や管腔形成能などの血管新生能が著明に低下した. また, マウス *in vivo* 腫瘍において CXCR7 阻害剤 CCX771 により血管新生が阻害され, 腫瘍の増殖が抑制された. これらの結果より, CXCR7 は TEC に発現亢進しており, その高い血管新生能に関与していることが示された. CXCR7 は腫瘍血管内皮選択的な血管新生阻害療法開発のための新たな標的分子として期待される.

略語表

本文中および図中に使用した略語は以下の通りである.

BSA	bovine serum albumin
CXCL12	stromal cell derived factor 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CXCR7	C-X-C chemokine receptor type 7
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole
EC	endothelial cell
EGF	epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorter
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1
hNEC	human normal endothelial cell
hTEC	human tumor endothelial cell
IVIS	in vivo imaging system
mNEC	mouse normal endothelial cell
mTEC	mouse tumor endothelial cell
MSC	mesenchymal stem cell
MVD	micro vessel density
NEC	normal endothelial cell
PBS	phosphate buffered saline
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TBS Tris	buffered saline
TEC	tumor endothelial cell
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

実験方法

がん細胞と培養条件

A375-SM（高転移性ヒト悪性黒色腫細胞株）はDr. Fidler（M.D. Anderson Cancer Center）の厚意により供与を受けた.A375（低転移性ヒト悪性黒色腫細胞株）はAmerican Type Culture Collection（Manassas, VA）より入手した.10%牛胎仔血清（10% FBS；PAA Laboratories, Pasching, Austria）添加 Minimum Essential Medium（MEM；GIBCO, Grand Island, NY, USA）で継代培養した.細胞は37℃, 5%CO₂-95%気相下において培養した.

抗体と試薬

種々の実験に以下の抗体, 試薬を使用した.rabbit anti-mouse CXCR7 antibody（Abcam, Cambridge, UK）; PE-mouse-anti-mouse CXCR7 antibody, Alexa Fluor 647-rat anti-mouse CD31 antibody（BioLegend, San Diego, CA）; mouse anti-human CXCR7 antibody, mouse anti-mouse CXCL12 antibody and rat anti-mouse CXCR4 antibody（R&D Systems, Minneapolis, MN）; rabbit anti-mouse CXCL12 antibody（eBioscience, San Diego, CA）; P-Akt antibody, Akt antibody, P-ERK1/2 antibody and ERK1/2 antibody, U0126; MEK阻害薬（Cell Signaling Technology, Boulder, CO）; mouse anti-VEGF antibody（IBL, Takasaki, Japan）.CXCR7阻害薬であるCCX771ならびにコントロールであるCCX704は共にChemocentryx社のご厚意により提供された.

実験動物

雌性ヌードマウス Balb（nu/nu）は日本クレア株式会社（Tokyo, Japan）より購入した.6週齢のマウスを購入し, 入舎日より1週間経過した後, A375SMを皮下した.本研究に関する実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会により承認された.動物の取り扱いは「北海道大学動物実験に関する規程」に従った.

血管内皮細胞の分離・培養

TECは7週齢の雌性ヌードマウスにA375SMを皮下移植し, 生着した皮下移植腫瘍から, コントロールとして, NECは正常ヌードマウスの背部皮膚組織から分離した.磁気細胞分離法（MACS system: MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany）により腫瘍ならびに皮膚のCD31陽性細胞を分離し, 15% FBS含有EGM-2 MV培地（Lonza,

Basel, Switzerland) でそれぞれ培養した. ヒト腫瘍細胞の混入の可能性を否定するために, ヒトHB-EGFに特異的に結合することでヒト細胞を死滅させるジフテリア毒素 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を利用した. 本実験には15 - 25代の細胞を用いており, 分離後も血管内皮細胞の特性を維持していることを確認し実験に使用した.

免疫組織染色

マウスにおける検討では, A375SM の皮下移植腫瘍ならびに皮膚組織からの凍結切片を用いた. ヒトにおいては医師主導自主臨床研究(「腫瘍血管内皮細胞の特異的マーカーの同定」, 自 009-0148, 平成 22 年 1 月 5 日承認)のプロトコールに従い, 同意書を事前に取得した患者の手術標本を用いた. ヒト肺がん・大腸がん・肝細胞がんならびにそれぞれの非がん部の組織から凍結切片を作製し, 血管における発現を抗 CD31 抗体と抗 CXCR7 抗体による蛍光二重免疫染色により解析した.

検体を摘出後, Tissue-TEK cryocompound (Miles, Elkhart, IN) に包埋し, 液体窒素で凍結させた. 10 μ m の薄切切片を作製し, 4% paraformaldehyde で 10 分間固定した. 2% ヤギ血清, 5% Bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) / PBS で 60 分ブロッキング処理をした. 一次抗体として抗 CXCR7 抗体を用い 4°C 下で 16 時間反応させた. 次に Alexa Fluor 647-rat anti-mouse CD31 antibody を用い, 室温で 1 時間反応させた. その後, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche, Indianapolis, IN) により核染色をした.

フローサイトメトリ解析

TEC・NEC をディッシュから回収した後, 細胞に PE-mouse-anti-mouse CXCR7 antibody を添加し 4°C で 20 分間インキュベートした. 細胞を PBS で洗浄後, FACS Aria II (Becton Dickinson; Franklin Lakes, New Jersey) で細胞を解析した. データ解析は Flow Jo (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて行った.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

細胞から RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) もしくは RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) と RNase-free DNase set (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出し, 5 μ g の RNA から ReverTra Ace, RT Buffer (ToYoBo, Osaka, Japan), Oligo dT primer, Random primer (Hokkaido System Science, Sapporo, Japan), dNTP mixture (Takara, Shiga, Japan) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した. 使用したプライマーの配列を以下に示す.

mouse CXCR7 Forward : 5' -CTACAAACTGCTCAGCACTGAAGG-3'

mouse CXCR7 Reverse : 5' -GCAGTCGCTGCTGTTACATGG-3'
 mouse CXCR4 Forward : 5' -AGAGCGAGTGTTGCCATGGAACC-3'
 mouse CXCR4 Reverse : 5' -TCCCGGAAGCAGGGTTCCTTGTT-3'
 mouse CXCL12 Forward : 5' -TGGCGCTTTGTAACCTCGCTCCTC-3'
 mouse CXCL12 Reverse : 5' -ACCAGGGCAGGAAAGCCTAAGCA-3'
 mouse GAPDH Forward : 5' -TCTGACGTGCCGCCTGGAG-3'
 mouse GAPDH Reverse : 5' -TCGCAGGAGACAACCTGGTC-3'
 human CXCR7 Forward : 5' -AGCATCAAGGAGTGGCTGAT-3'
 human CXCR7 Reverse : 5' -TGTGCTTCTCCTGGTCACTG-3'
 human GAPDH Forward : 5' -ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'
 human GAPDH Reverse : 5' -GCCCAATACGACCAAATCC-3'

Regular PCRは、GoTaq® Green Master Mix (Promega) を用いて、イニシャルインキュベーション (95°C 2分), 33サイクルの熱変性 (95°C 30秒), アニーリング (60°C 30秒), 伸長反応 (72°C 60秒) を行い、内部標準にはGAPDHを用いた. 2%アガロースゲルを用いて増幅産物の電気泳動を行い、エチジウムブロマイドを使用して紫外線光下で各バンドを観察した. Real-time PCRは、SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いて、イニシャルインキュベーション (95°C 300秒), 熱変性 (95°C 1秒), アニーリング (60°C 5秒), 伸長反応 (60°C) で40サイクル行い、CFX Manager (Bio-Rad, Richmond, CA) で増幅産物を定量した. 内部標準にはGAPDHを用い $\Delta\Delta C_t$ 法をもとに相対比を比較検討した.

ウエスタンブロッティング

EC を PBS で 2 回洗浄した後、RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM Na_3VO_4] を添加し氷上で 10 分間静置、10 分間の遠心後の上清を細胞抽出液として採取した. 細胞抽出液を BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) を用いて定量した. 10 μg のタンパクを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) の後、Immobilon-P membranes (Millipore, Bradford, MA) に転写した. 膜を 5%のスキムミルクと 0.1% Tween20 を含んだ Tris-buffered saline (TBS) により blocking した後、一次抗体を Solution 1 (Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution; TOYOBO) に加え、4° C で 16 時間反応させた. 二次抗体を Solution 2 (TOYOBO) に加えて、室温で 1.5 時間反応させ、Western Lightning (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて LAS-4000 mini image analyzer (FUJIFILM, Tokyo, Japan) により検出した.

CXCR7 の発現抑制

CXCR7 siRNA は, Lipofectamine (Invitrogen, Waltham, MA) を用いてリポフェクション法によりトランスフェクションした. 0.8ml EBM-2, siRNA 試薬 $1.44\mu\text{l}$, Lipofectamine $8\mu\text{l}$ を混ぜ 10 分間静置した後に, 9×10^4 cells/ml の細胞懸濁液を混合したのちにインキュベートした. 6 時間後に EGM2MV に培地交換した. control siRNA は non-targeting control を用いた. 用いた siRNA の配列を以下に示す.

CXCR7 siRNA1 : 5' -GGAUGUGCACUUGUUUGACUAUGCA-3'

siRNA2 : 5' -CACAGUAGCCGGAAGAUCAUCUUCU-3'

血管内皮細胞の遊走能評価

Boyden chamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD) を用いて EC の細胞遊走能を解析した. 1 穴あたり 1.5×10^4 の EC を 0.5% FBS 含有の EBM-2 に懸濁して chamber の上室に加えた. 下室にはそれぞれ CXCL12 100ng/ml 添加した 0.5% FBS 含有の EBM-2 で満たし, 上下室間に 0.5% Fibronectin でコーティングされた孔径 $8\mu\text{m}$ のポリカーボネート膜 (Corning Costar, Corning, NY) を挿入し, 37°C , 5% CO_2 -95% 気相下で培養した. 培養 4 時間後に膜を Boyden chamber より取り出し, 10%ホルムアルデヒドに浸漬固定し, 膜の下面に貼り付いた細胞をマイヤーヘマトキシリンで染色した後に顕微鏡で観察した. 膜下面の細胞数を倒立顕微鏡 (CKX41, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し 10 視野の平均を算出した

血管内皮細胞の管腔形成能評価

24 ウェルプレートに Growth factor-reduced matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) をコーティングし, 37°C で 30 分間インキュベートした後, 血管内皮細胞を 5×10^4 個/ウェルの密度で播種した. 培地は 0.5% FBS 含有 EBM-2 を用い, 12 時間インキュベートした. CXCR7 阻害剤を用いた実験では血管内皮細胞を CCX771 1 μg , CCX704 1 μg でそれぞれ前処置を行った後, 播種した. ジャンクション数は倒立顕微鏡 (CKX41, Olympus) で観察し 10 視野の平均を算出した.

血管内皮細胞の増殖能評価

EC の増殖を MTS assay (CellTiter-96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, WI) により解析した. EC を 96 ウェルプレートに 3×10^3 個/ウェルの密度で 5% FBS 添加の EBM-2 培地で播種した. siRNA のトランスフェクション細胞 (Control siRNA or CXCR7 siRNA) の増殖速度を 24, 48 時間インキュベートし

それぞれの時点で MTS solution を添加し 1 時間反応させ、吸光度を 490nm の波長にて測定し増殖能を解析した。

血管内皮細胞の無血清抵抗性の評価

TEC を無血清 EBM-2 培地で 72 時間培養したのち, propidium iodide (PI) を添加し 15 分間インキュベートしたのち, フローサイトメトリーを用いて PI 陽性細胞を計測した。CXCR7 阻害剤を用いた実験では血管内皮細胞を CCX771 1 ug, CCX704 1 ug でそれぞれ前処置を行った後, 無血清 EBM-2 培地で培養した。

In vivo における CXCR7 阻害実験

雌性ヌードマウス Balb (nu/nu) は日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。7 週齢のマウスを購入し, 入舎日より 1 週間経過した後, ルシフェラーゼを発現させたヒトメラノーマ細胞株 A375SM を皮下注した (1×10^6)。皮下注翌日より CXCR7 阻害薬である CCX771 とコントロールとして 10% Captisol を毎日 1 回皮下注した (20mg/kg)。本研究に関する実験プロトコルは北海道大学動物実験委員会により承認された。動物の取り扱い「北海道大学動物実験に関する規程」に従った。遺伝子組み換えに関しては「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従った。

抗腫瘍効果判定方法

腫瘍体積は長径 $\times$ 短径² $\times 0.5$ で計算した。

肺転移の有無については摘出した肺標本を IVIS system (Caliper Life Science, Waltham, MA) で観察した。

MVD 計測は NIH Image J software (Bethesda, MD) を用いて CD31 陽性範囲を測定し, 全視野における CD31 陽性範囲の割合で計算した。CCX771 群, コントロール群で 10 視野を測定し平均値を算出した。

統計解析

各群間の統計解析には Tukey-Kramer, Unpaired-Student's t test を使用した。解析の結果 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

実験結果

ヒト大腸がん、肺がん、肝細胞がんにおける TEC の CXCR7 の発現解析

ヒト大腸がん症例 2 例, ヒト肺がん症例 2 例, ヒト肝細胞がん症例 2 例において, がん組織ならびに非がん部組織の切片を用いて in vivo 血管における CXCR7 の発現を血管内皮マーカーである CD31 との蛍光二重免疫染色により解析した. 上記 3 種のがん組織の血管内皮において CD31 と CXCR7 が共発現していた (図 1A). 次に、ヒト大腸癌のがん組織・非がん部組織より hTEC・hNEC を分離・培養した. 培養後の EC が血管内皮マーカーである CD31, CD105, VEGFR2 を発現し, 汎血球マーカーである CD45 が発現しない事を RT-PCR で確認した. また, EC の特徴である管腔形成能が保たれており, 培養後 EC の性質が保たれている事を確認した (図 1B). ヒト大腸がんより分離・培養した TEC・NEC の CXCR7 発現を qRT-PCR で検討した結果, 2 症例とも NEC にくらべ TEC で CXCR7 の発現レベルが有意に高かった (図 1C). この事より, ヒト TEC において CXCR7 の発現が亢進していることが示された.

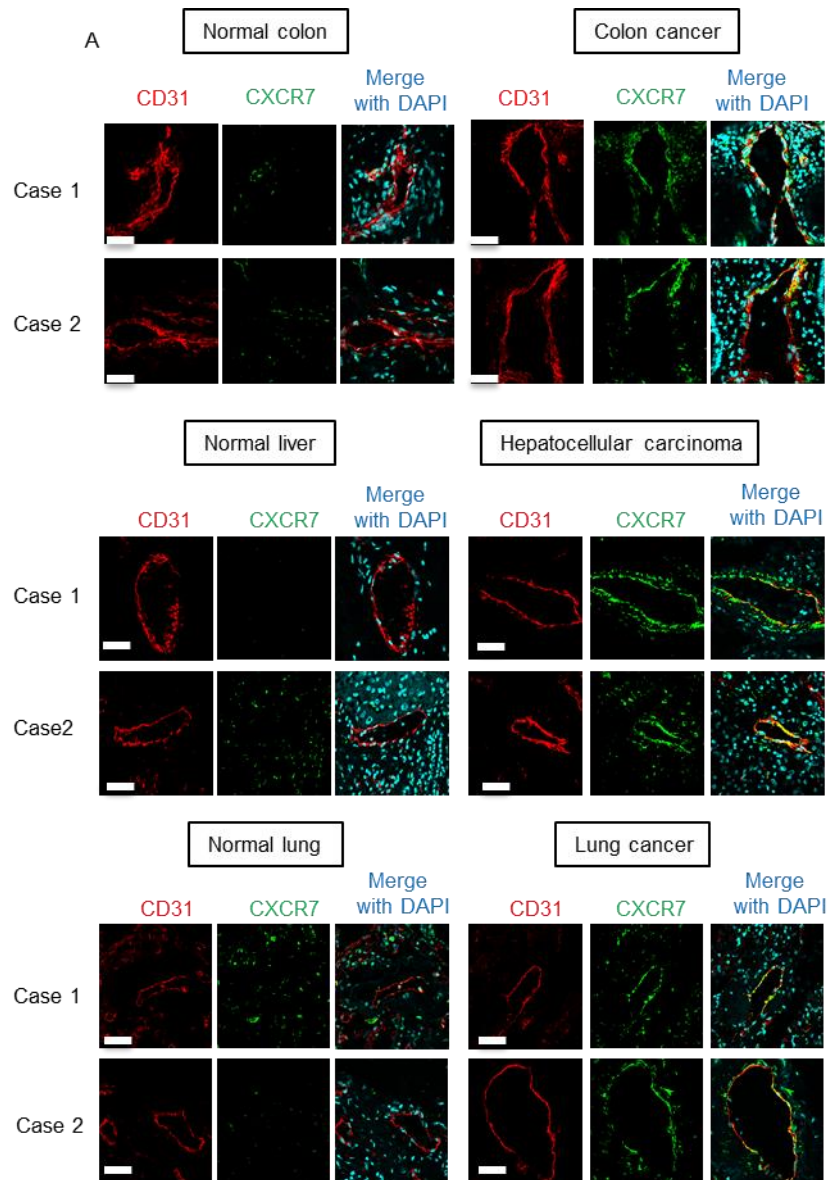


図 1A) 大腸がん・肝細胞がん・肺がんと各非がん部組織における血管の CXCR7 発現について、CD31 との蛍光二重免疫染色で比較した。がん組織において CD31 (赤) 陽性の腫瘍血管内皮に CXCR7 (緑) が強く染まった。Scale bar, 50 μ m。

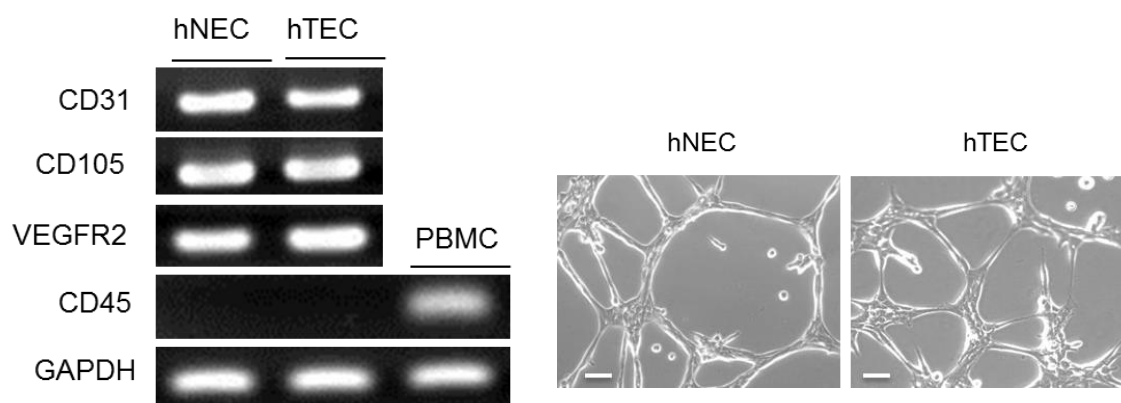


図 1B) ヒト大腸がん組織・非がん部組織より EC を分離・培養した。培養後の EC は血管内皮マーカーである CD31, CD105, VEGFR2 が陽性であった。また汎血球マーカーである CD45 は陰性であった。血管内皮細胞の特徴である管腔形成能は TEC, NEC とも保たれていることを確認した。

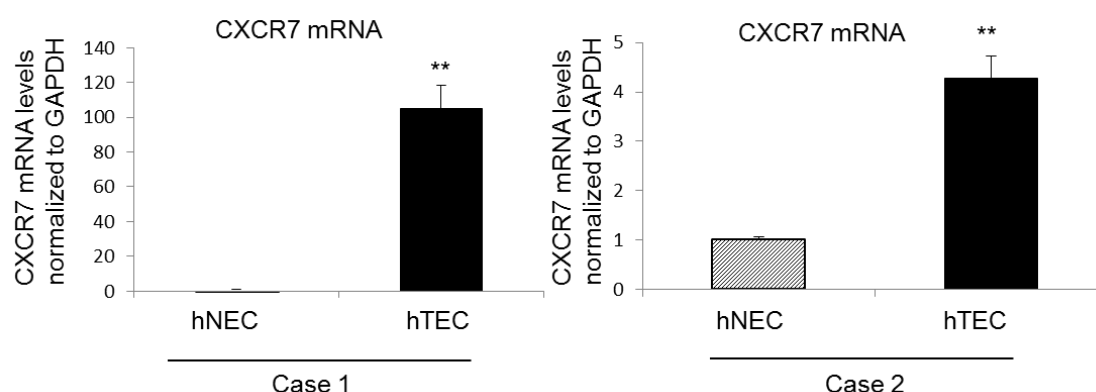


図 1C) 分離したヒト大腸がん TEC, NEC における CXCR7 の発現を qRT-PCR で解析した。2 症例ともに TEC において NEC よりも CXCR7 の発現が有意に高かった。** < 0.01

In vivo 腫瘍血管における CXCR7 の発現解析

ヒトがん組織において CXCR7 が TEC に高発現する事が示されたが、CXCR7 の TEC における機能解析を行う為の十分量のヒト TEC を確保する事が困難であるため、機能解析はマウス悪性黒色腫皮下移植腫瘍を用いて行う方針とした。そのため、マウス悪性黒色腫皮下移植腫瘍における TEC の CXCR7 発現を解析した。コントロールとしてマウス正常皮膚組織を用いた。

In vivo 血管における CXCR7 の発現を CD31 との蛍光二重免疫染色により解析した。ヒトがん組織同様にマウス腫瘍においても CXCR7 と CD31 の共発現を認めた (図 2A) 。マウス腫瘍より mTEC を、正常皮膚より mNEC を分離し培養した。培養後の EC は血管内皮マーカーである CD31, CD105, CD144, VEGFR1, VEGFR2 が発現しており、血球マ-

カーである CD45, 単球マーカーである CD11b が発現していないことを RT-PCR を用いて確認した. 培養後の mTEC においてヒト細胞に発現する Human HB-EGF 発現が陰性である事を確認しヒトがん細胞の混入を否定した (図 2). mTEC・mNEC の CXCR7 発現を qRT-PCR (図 2C), Western blotting (図 2D), フローサイトメトリー (図 2E) で解析し, 分離培養後の mTEC は mNEC に比べ CXCR7 の発現が高い事を確認した. この事よりマウス腫瘍においても CXCR7 は TEC で発現が亢進しており, 分離・培養後も発現が保たれている事を確認した.

今後の機能解析には mTEC ならびに mNEC を用いて実験を行った.

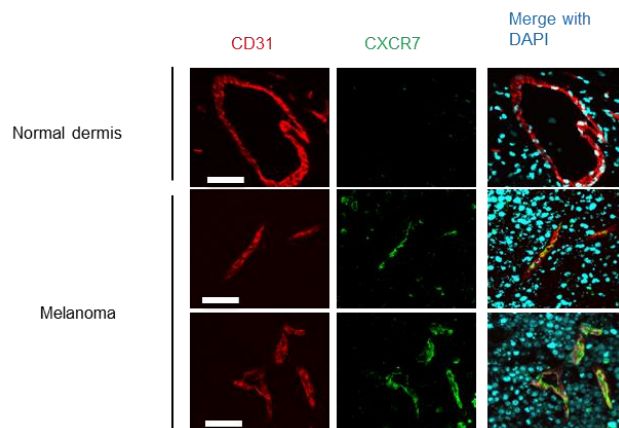


図 2A) マウス悪性黒色腫皮下移植腫瘍と正常皮膚における血管の CXCR7 発現について, CD31 との蛍光二重免疫染色で比較した. 腫瘍組織において CD31 (赤) 陽性の腫瘍血管に CXCR7 (緑) が強く染まった. Scale bar, 50 μ m.

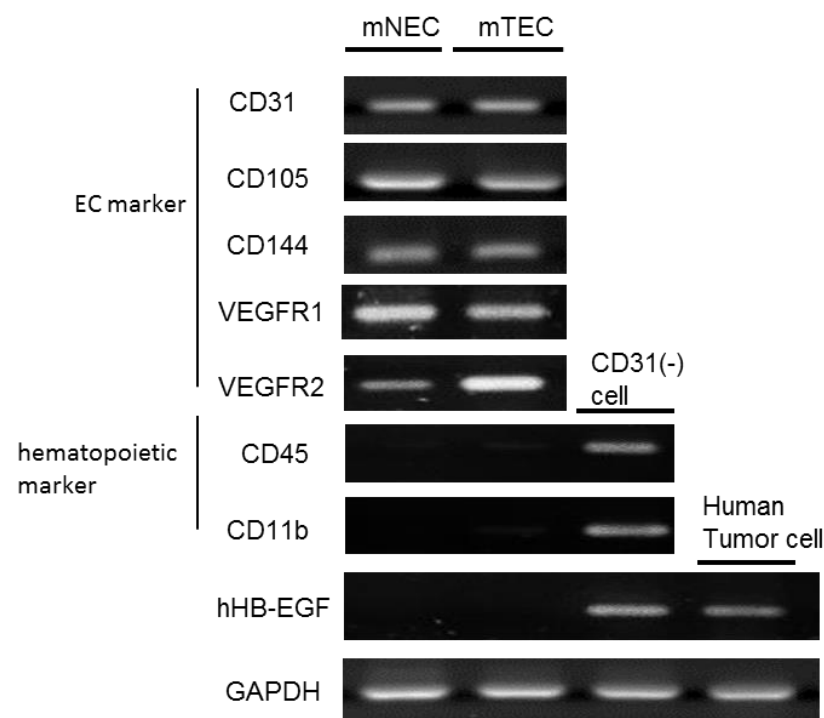


図 2B) mTEC・mNEC・ヒトがん細胞・CD31 陰性間質細胞において血管内皮マーカーである CD31, CD105, CD144, VEGFR1, VEGFR2, 血球マーカーである CD45, 単球マーカーである CD11b, Human HB-EGF の発現を RT-PCR により解析した. mTEC と mNEC において CD31, CD105, CD144, VEGFR1, VEGFR2 の発現を確認した. ヒトがん細胞では Human HB-EGF の発現が確認されたが, mTEC・mNEC では Human HB-EGF の発現が認められなかったことから mEC におけるヒトがん細胞の混入は否定された.

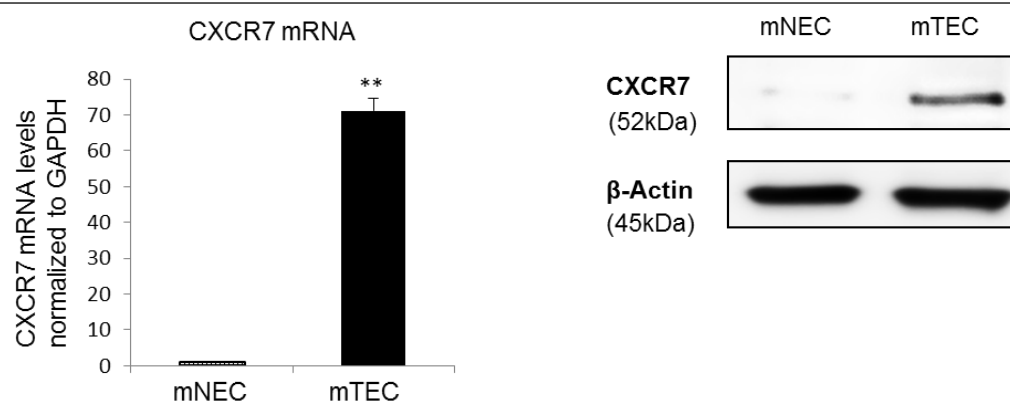


図 2C) 分離・培養した mTEC と mNEC における CXCR7 発現を qRT-PCR で解析した. mTEC において mNEC よりも CXCR7 の発現が有意に高かった. ** $P < 0.01$ 図 2D) mTEC と mNEC における CXCR7 発現を Western blotting で解析した. タンパクレベルにおいても mTEC で CXCR7 の発現が高い結果であった.

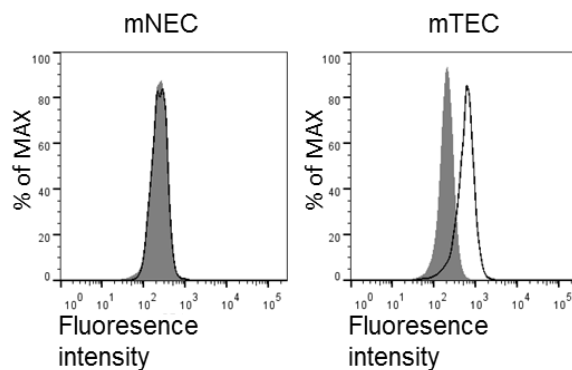


図 2E) mTEC, mNEC における CXCR7 の発現をフローサイトメトリーで解析した. mTEC で CXCR7 の発現を認めた. Isotype : gray CXCR7 : white

In vivo mTEC/mNEC における CXCR4 の発現解析

CXCL12 のレセプターとして CXCR7 の他に CXCR4 が報告されており, CXCR4 は様々ながんにおける増殖・転移に関わると報告されている. そのため, CXCR4 の *in vivo* 血管における発現を CD31 との蛍光二重免疫染色により解析した. CXCR7 とは異なり、腫瘍組織、正常皮膚とも血管内皮以外の部分にも強く染色された (図 3A). mTEC・mNEC における CXCR4 の発現を qRT-PCR で解析したが、両者に有意差を認めず、CXCR4 は腫瘍血管内皮に特異的に発現しているわけではないことが示された (図 3B).

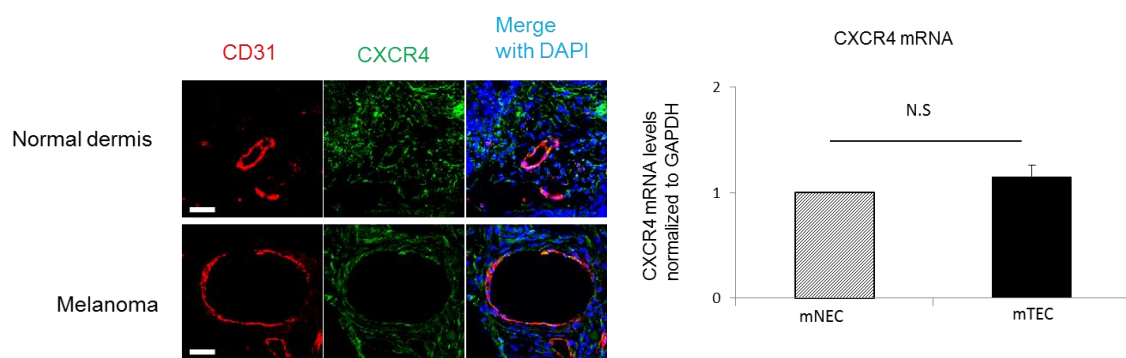


図 3A) マウス悪性黒色腫皮下移植腫瘍と正常皮膚における血管の CXCR4 発現について, CD31 との蛍光二重免疫染色で比較した. 腫瘍組織・正常皮膚において CD31 (赤) 陽性の血管内皮特異的に CXCR4 (緑) は染色されなかった. Scale bar, 50 μ m. 図 3B) mTEC・mNEC で CXCR4 発現を qRT-PCR で解析した. CXCR4 発現に有意差を認めなかった.

CXCR7 ノックダウンにより TEC の遊走能・管腔形成能および生存能は低下する

mTEC における CXCR7 の機能を解析するために siRNA を用いて CXCR7 をノックダウンした。CXCR7 siRNA のトランスフェクション後、mTEC における CXCR7 の抑制効果を qRT-PCR (図 4A) , Western blotting (図 4B) で確認した後に細胞増殖能・細胞遊走能・管腔形成能・無血清抵抗性を検討した。CXCR7 の発現抑制により mTEC の CXCL12 に対する遊走能は有意に低下した (図 4C) . mTEC の管腔形成能は CXCR7 発現抑制により有意に阻害され (図 4D) , CXCR7 阻害剤 ; CCX771 によっても同様に阻害された (図 4E) . mTEC は mNEC よりも血清飢餓に対して抵抗性があることがわかっているが、CXCR7 発現抑制ならびに CCX771 処理により無血清状態下での生存能が有意に低下した (図 4F, 4G) . これらの結果より CXCR7 は TEC の血清飢餓状態に対する抵抗性や血管新生能に関わっている事が示唆された。なお、CXCR7 の抑制による細胞増殖への影響はみられなかった (図 4H) .

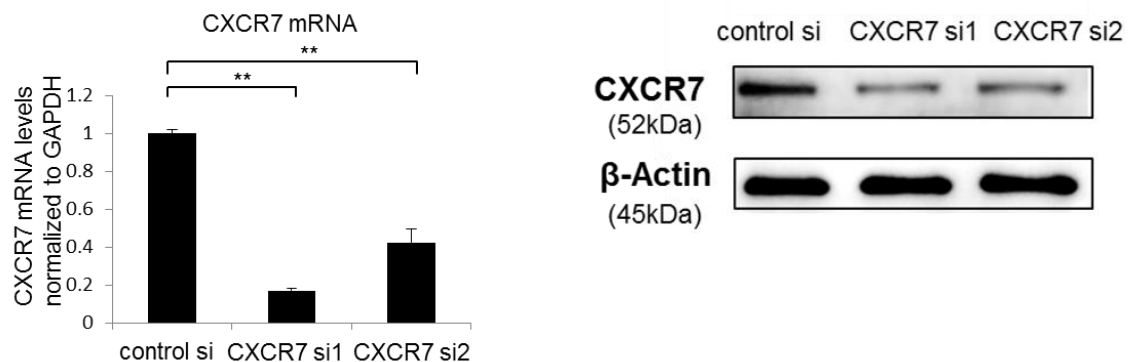


図 4A) CXCR7 siRNA トランスフェクションにより CXCR7mRNA 発現は有意に抑制された。 ** P<0.01 図 4B) CXCR7 siRNA トランスフェクションにより CXCR7 タンパク発現は抑制された。

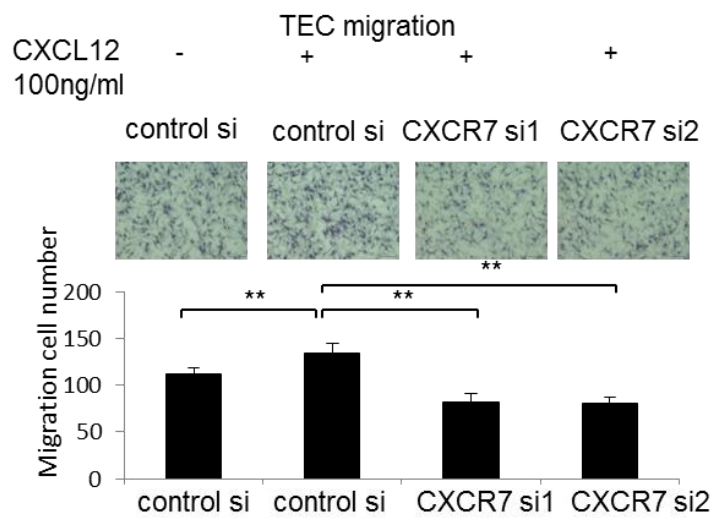


図 4C) CXCR7 siRNA トランスフェクションにより mTEC の遊走能は有意に低下した.
 ** P<0.01

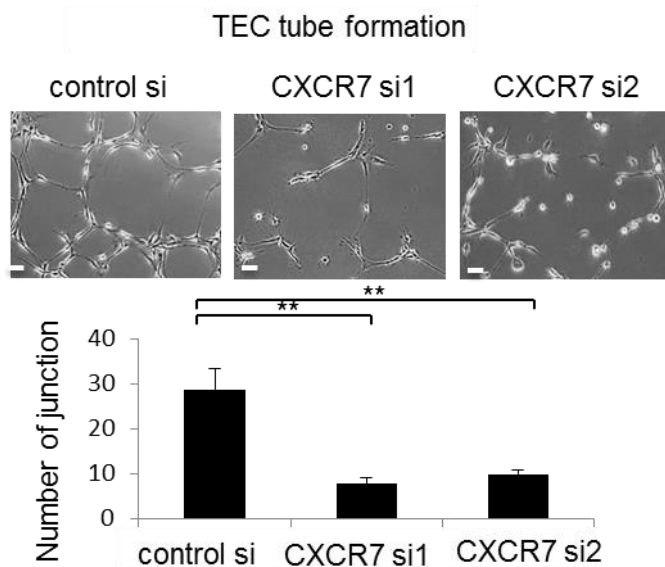


図 4D) CXCR7 siRNA トランスフェクションにより mTEC の管腔形成が有意に阻害され
 た. ** P<0.01

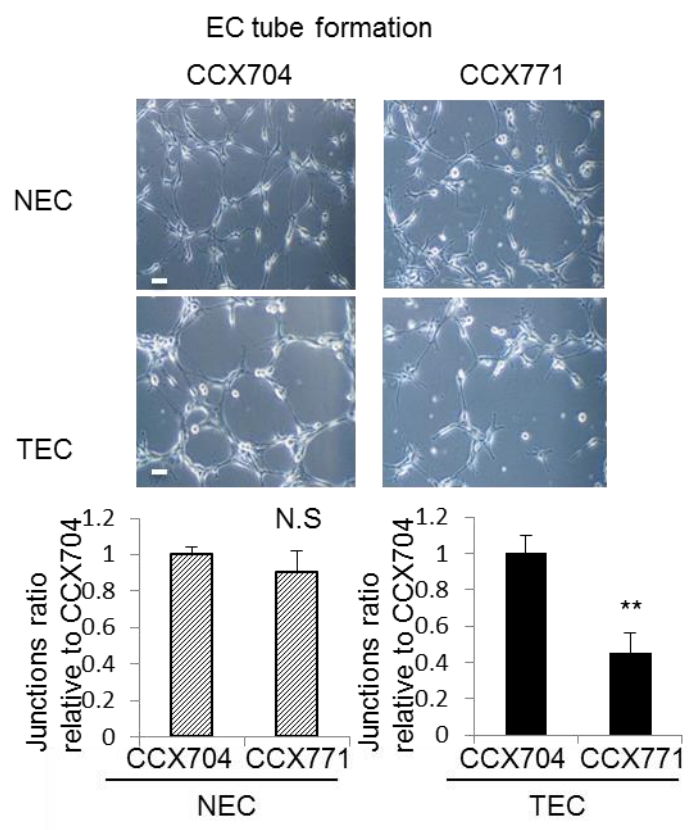


図 4E) CCX771 (1 ug) で mNEC・mTEC を処理することにより TEC において有意に管腔形成が阻害された. CCX704 はコントロール ** $P < 0.01$ vs CCX704

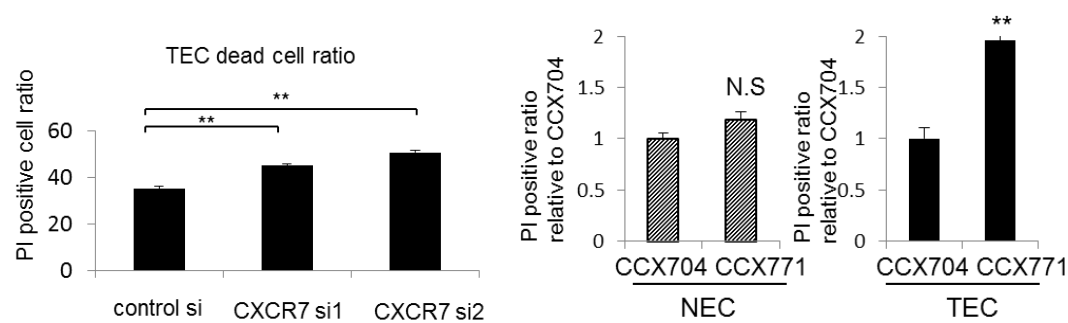


図 4F) CXCR7 siRNA トランスフェクションにより mTEC の無血清培養下における死細胞率は有意に増加した. ** $P < 0.01$ 図 4G) CCX771 (1 ug) で mNEC・mTEC を処理することにより TEC の無血清培養下における死細胞率は有意に増加した. CCX704 はコントロール ** $P < 0.01$ vs CCX704

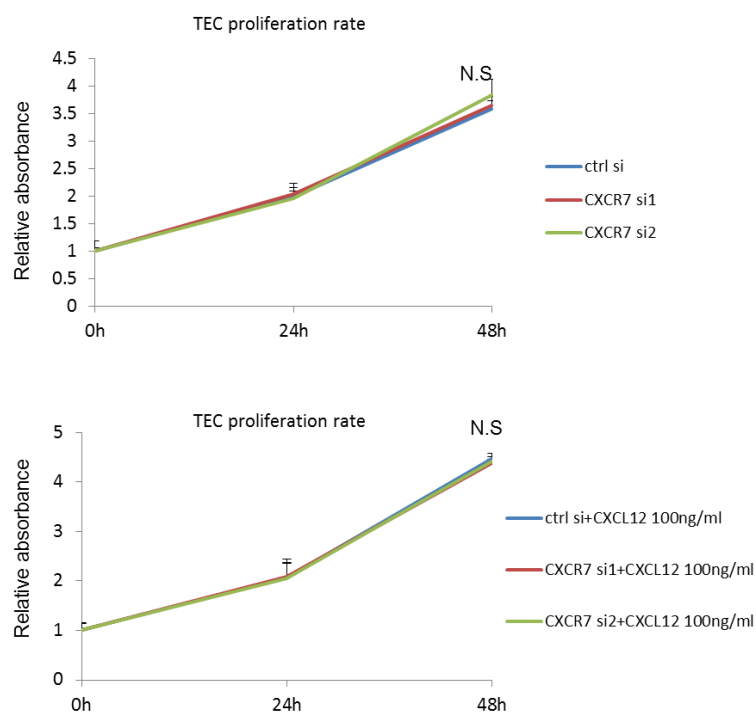


図 4H) CXCR7 ノックダウンは TEC の細胞増殖に影響を与えなかった.
上段: CXCL12 非添加群 下段: CXCL12 添加群

CXCL12-CXCR7 は ERK1/2 をリン酸化させる

前述の結果より, CXCR7 は TEC の血管新生能に深く関与している事が示唆された. 次に CXCL12-CXCR7 がどのようなシグナルを介して腫瘍血管新生に関わるかを検討した. がん細胞において CXCR7 は CXCL12 が結合することにより ERK1/2 をリン酸化させ, 増殖や転移に関わっていることが報告されている^{8,14}. そのため, ERK1/2 に着目してそのリン酸化を Western blotting を用いて検討した. mTEC を CXCL12 で刺激すると ERK1/2 はリン酸化したが, CXCR7 siRNA トランスフェクション後の mTEC においてはリン酸化はおこらなかった (図 5A). 次に ERK1/2 のリン酸化阻害による TEC への影響を解析した. MEK 阻害薬である U0126 が mTEC における ERK1/2 のリン酸化を阻害することを Western blotting で確認した (図 5B). ERK1/2 のリン酸化阻害により mTEC の生存能 (図 5C)・細胞遊走能 (図 5D)・管腔形成能 (図 5E) は有意に低下した. しかし, 増殖能には影響を与えなかった (図 5F). この結果は CXCR7 阻害による mTEC への影響と酷似していた. この事より, CXCL12-CXCR7 は ERK1/2 のリン酸化介して, 腫瘍血管新生に関わっている事が示唆された. 次に Akt のリン酸化について検討した. Akt のリン酸化は TEC の血管新生能に重要であることが報告されている¹⁵. しかし CXCL12 刺激後の mTEC における Akt のリン酸化を Western blotting を用いて検討したが, Akt のリン酸化への影響は認めなかった (図 5G).

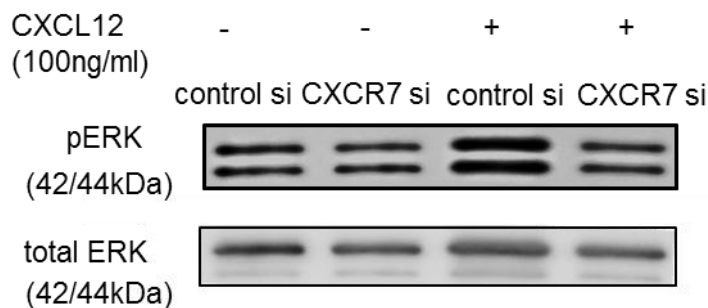


図 5A) mTEC を CXCL12 100ng/ml で 5 分間刺激後, CXCR7 si ノックダウン mTEC では ERK1/2 のリン酸化が阻害された.

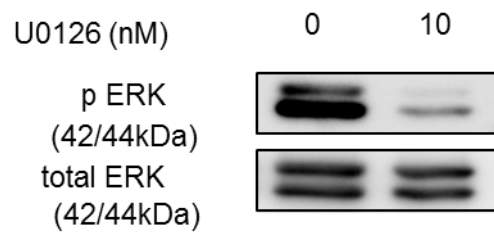


図 5B) MEK 阻害薬である U0126 10nM により mTEC の ERK1/2 リン酸化が阻害された。

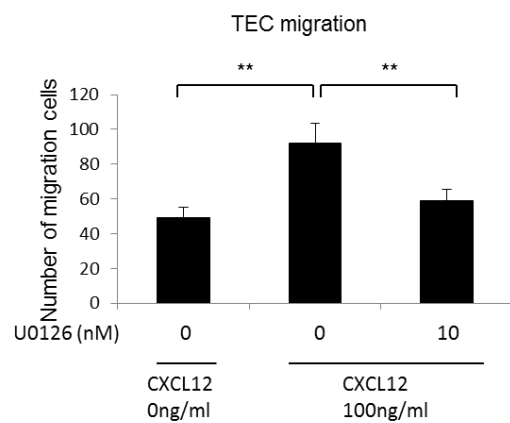


図 5C) U0126 10nM により mTEC の CXCL12 リコンビナントタンパクへの遊走能は有意に低下した. ** P<0.01

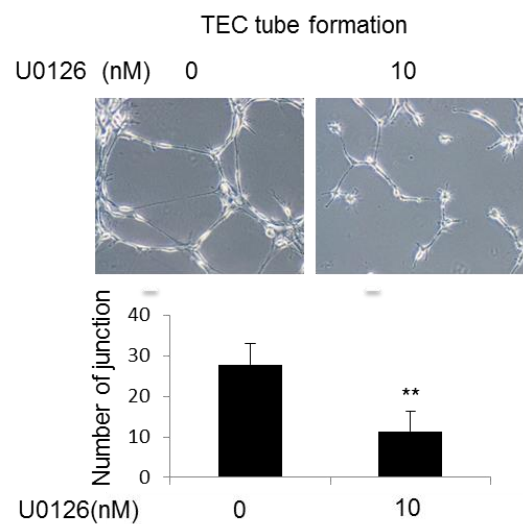


図 5D) U0126 10nM により mTEC の管腔形成は有意に阻害された. ** P<0.01

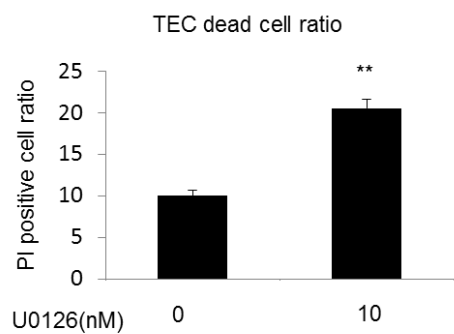


図 5E) U0126 10nM により mTEC の無血清抵抗性は有意に低下し，無血清培養下での死細胞率の増加を認めた. ** $P < 0.01$

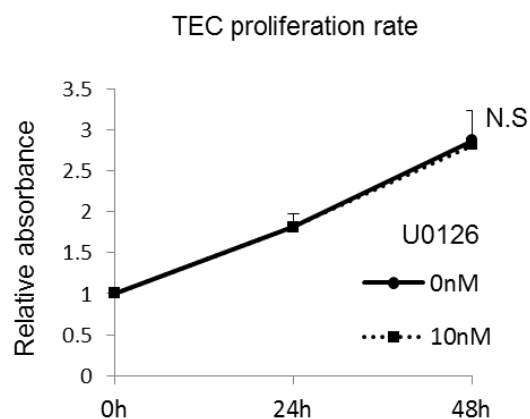


図 5F) U0126 は mTEC の増殖能には影響を与えなかった.

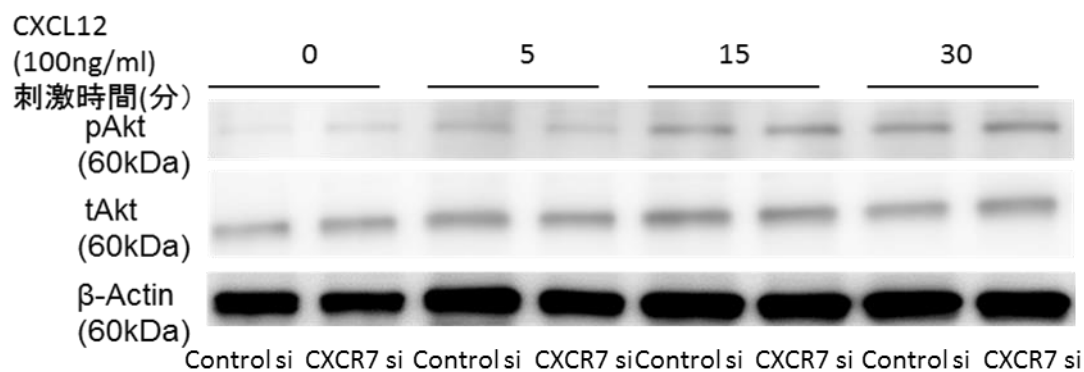


図 5G) CXCR7 ノックダウンは mTEC の Akt のリン酸化に影響を与えなかった.

TEC における CXCL12-CXCR7 オートクライン機構

これまでの結果により，CXCR7 は TEC の高い血管新生能に深く関わっている事が示

された. 次に CXCR7 のリガンドである、CXCL12 に着目した. mTEC と mNEC における CXCL12 発現を qRT-PCR, 蛍光 2 重免疫染色法を用いて解析した. mTEC は mNEC よりも CXCL12 の mRNA 発現レベルが有意に高く (図 6A), 免疫染色においても高頻度に認められた (図 6B). この事より, mTEC が CXCL12 を mNEC よりも高濃度に分泌している可能性が示唆され細胞培養上清中の CXCL12 レベルを ELISA 法により解析した. mTEC は mNEC よりも高濃度に CXCL12 を分泌していることが示され, mTEC は CXCL12-CXCR7 オートクライン機構をもっている可能性が考えられた (図 6C). CXCR7 ノックダウン mTEC を用いて運動能を解析した. CXCL12 非存在下で CXCR7 ノックダウン mTEC の運動能の低下を認めた (図 6D). 次に CXCL12 中和抗体で mTEC を処理したのち, 運動能を解析したところ, 同様に運動能低下が認められた (図 6E). この事より, TEC における CXCL12-CXCR7 オートクライン機構がその高い運動能に関与していることが示唆された.

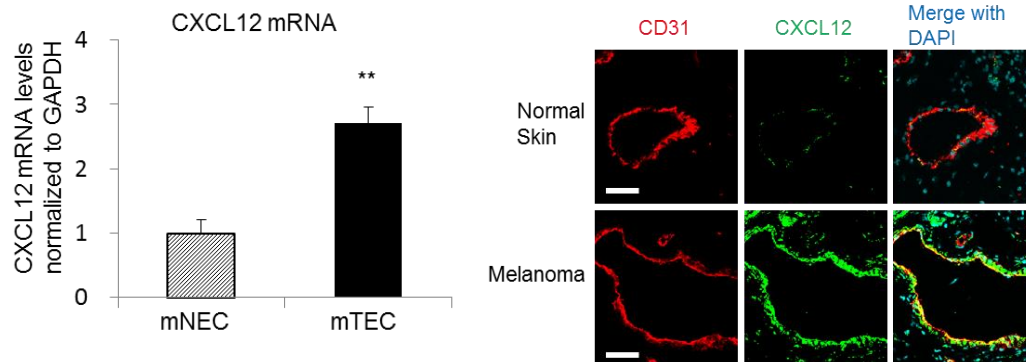


図 6A) mNEC, mTEC における CXCL12 の発現を qRT-PCR で解析した. mTEC で有意に発現が高かった. ** $P < 0.01$ 図 6B) マウス悪性黒色腫皮下移植腫瘍組織と正常皮膚における血管の CXCL12 発現について, CD31 との蛍光二重免疫染色で比較した. 腫瘍組織において CD31 (赤) 陽性の腫瘍血管に CXCL12 (緑) が強く染まった. Scale bar, 50 μ m.

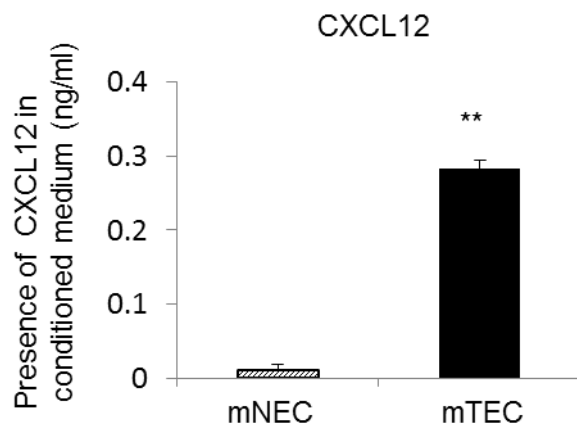


図 6C) mNEC, mTEC 培養上清中の CXCL12 濃度を ELISA 法を用いて解析した. mTEC 培養上清中に高濃度の CXCL12 を認めた. ** $P < 0.01$

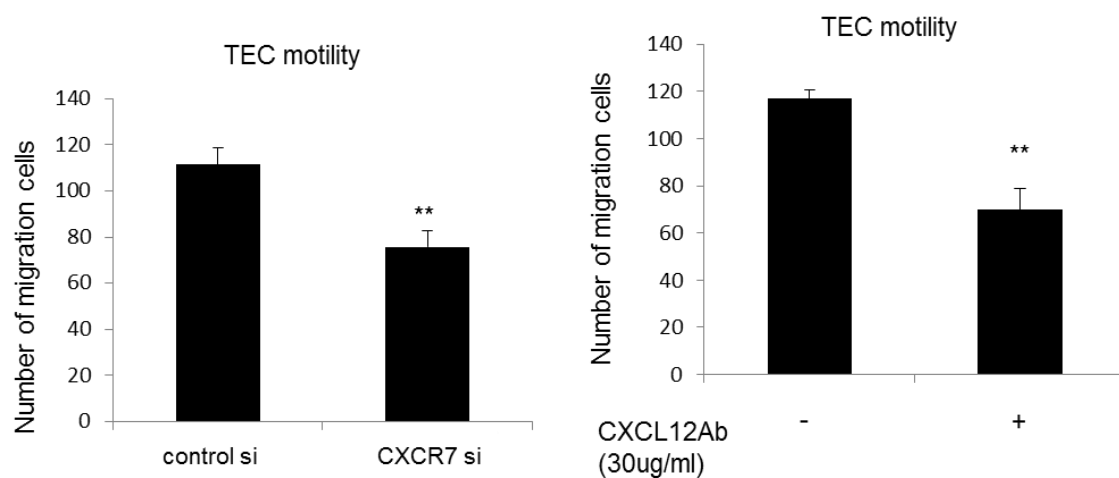


図 6D) CXCR7 ノックダウン mTEC では CXCL12 非存在下において運動能が有意に低下した. ** $P < 0.01$ 図 6E) CXCL12 中和抗体で mTEC を処理する事により mTEC の運動能が有意に低下した. ** $P < 0.01$

*In vivo*における CCX771 の抗腫瘍効果

In vivo マウス皮下移植腫瘍を用いて CXCR7 阻害剤による *in vivo* 治療実験を行った. 腫瘍移植後 7 日目では CCX771 群とコントロール群では明らかな差を認めず, 腫瘍の生着にたいしては CXCR7 阻害は影響しないと考えられた. 14 日目よりコントロール群に比較して, 徐々に CCX771 投与群で腫瘍増大速度が低下した. 26 日目では有意

差はないものの CCX771 群で腫瘍の成長が抑制される傾向を認めた (図 7A) . また, 26 日目で摘出した肺を IVIS で観察したところ, コントロール群と比較し CCX771 群で肺転移の減少がみとめられた (図 7B) . 腫瘍血管新生抑制効果について微小血管密度 (Microvessel density : MVD) により評価した. CCX771 群では有意差をもって, MVD の低下を認めた (図 7C) . 以上の結果より CXCR7 阻害は *in vivo* 腫瘍において血管新生阻害とともに抗腫瘍効果をもたらすことが示唆された.

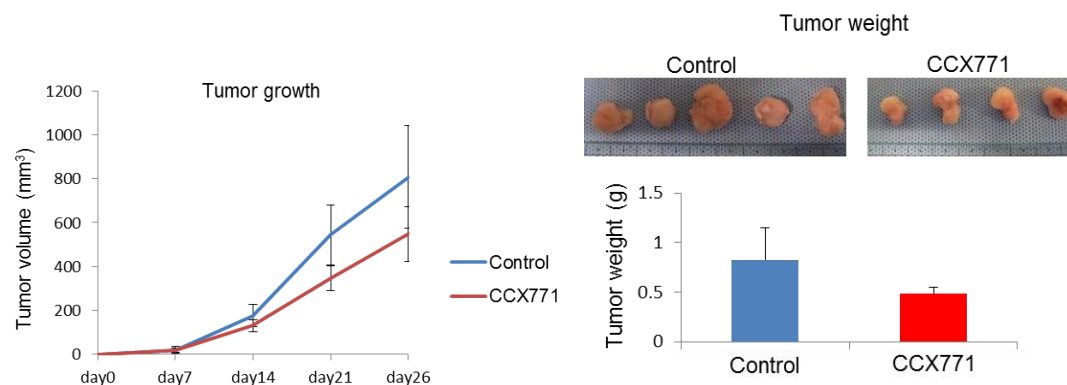


図 7A) 治療開始 26 日目 : CCX771 群において有意差はないが, 腫瘍増大が抑制される傾向を認めた.

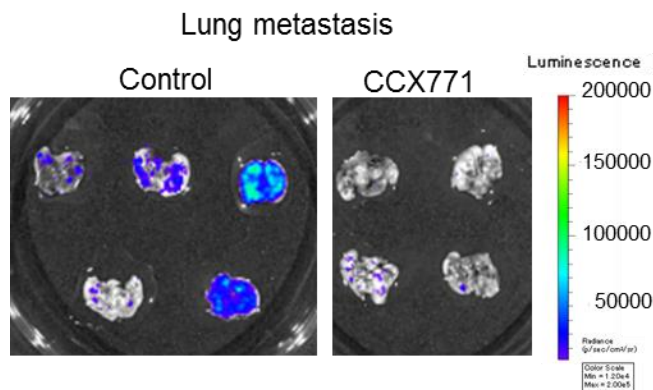


図 7B) CCX771 群では肺転移が抑制される傾向を認めた.

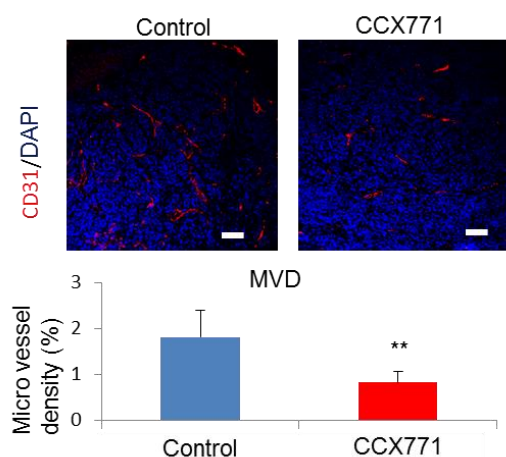


図 7C)

CCX771 群で有意に腫瘍内の MVD が低下した. ** $P < 0.01$

A375SM は CXCR7 の発現が低く, CXCR7 阻害は腫瘍細胞増殖に影響しない

次に *in vivo* における CXCR7 阻害剤による抗腫瘍効果が腫瘍細胞に対する抑制なのか, 腫瘍血管内皮に対する抑制によるものなのかを解析することとした. RT-PCR により CXCR7 mRNA の発現レベルを比較したところ, CXCR7 の発現レベルが高いことが知られている HeLa 細胞と比較し A375 SM はほとんど CXCR7 を発現していなかった (図 8A). また, MTS assay により, CXCR7 阻害が A375SM の細胞増殖になんら影響を与えないことも示された (図 8B). 以上より, CXCR7 阻害による *in vivo* における抗腫瘍効果は腫瘍細胞に対してではなく, 腫瘍血管内皮に対する抑制によることが示された.

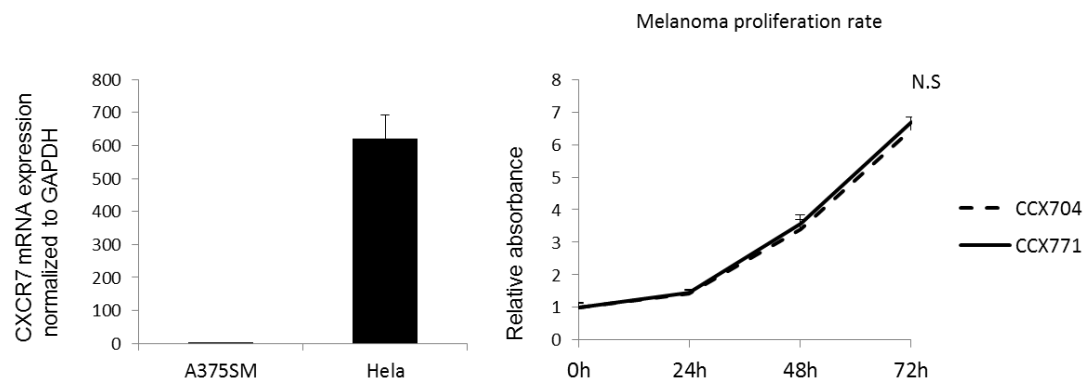


図 8A) A375SM の CXCR7 発現を qRT-PCR で解析した. HeLa はコントロールとして使用した. A375SM は CXCR7 をほとんど発現していない. 図 8B) CCX771 は A375SM の増殖能に影響を与えなかった.

VEGF 刺激により血管内皮における CXCR7 発現亢進

TEC において CXCR7 発現が亢進しているメカニズムについて腫瘍微小環境内の因子に

着目して検討した。本研究室では cytokine array により A375SM の培養上清に, VEGF が多く含まれていることを見出していたため, VEGF に着目した。高転移性悪性黒色腫 A375SM と低転移性悪性黒色腫 A375 における VEGF 発現を免疫染色で確認した。 *in vivo* A375SM 腫瘍は A375 腫瘍に比べ VEGF の発現が高い事が確認された(図 9A)。 mNEC を VEGF リコンビナントタンパクで刺激する事により, VEGF 濃度依存的に CXCR7mRNA 発現レベルが増加し, VEGFR2 キナーゼ阻害薬である Ki8751 によりその発現亢進が阻害された (図 9B)。 mTEC においては VEGF 刺激による CXCR7mRNA 発現亢進はみられなかったが, VEGF 非存在下において Ki8751 による CXCR7mRNA 発現の低下を認めた(図 9C)。次に低酸素に着目し, mNEC を 1%酸素下で 48 時間培養したところ, CXCR7 の発現が亢進した (図 9D)。これらの結果より, TEC において CXCR7 が高発現するメカニズムとして腫瘍微小環境中の少なくとも VEGF や低酸素環境が関与している可能性が考えられた。

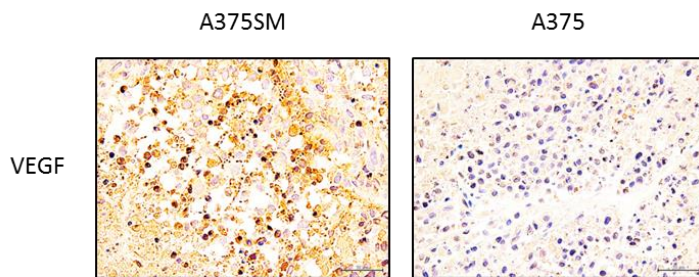


図 9A) 腫瘍微小環境における VEGF 発現を免疫染色にて解析した。 A375SM 腫瘍環境下では VEGF が高発現している事が確認された。

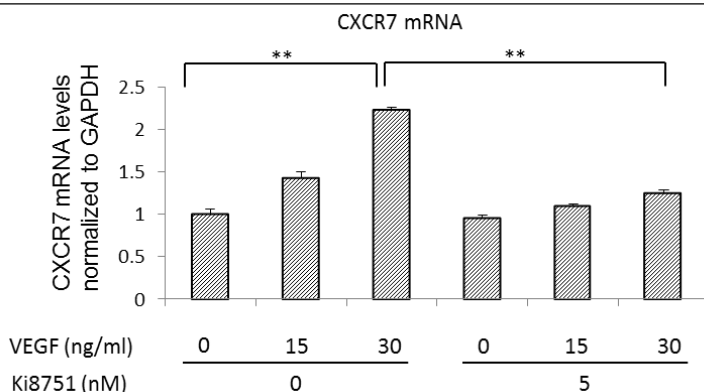


図 9B) mNEC を VEGF リコンビナントタンパクで刺激する事により濃度依存的に CXCR7 発現が亢進する。 VEGFR2 キナーゼ阻害薬である Ki8751 を用いる事により, VEGF 刺激による CXCR7 発現亢進が阻害される事が確認された。 ** P<0.01

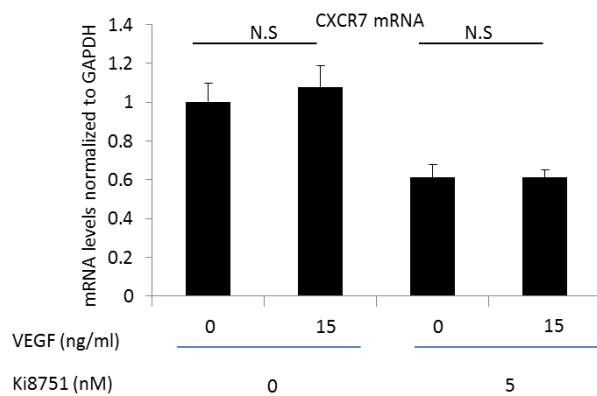


図 9C) mTEC は VEGF リコンビナントタンパク刺激で CXCR7 の発現亢進を認めなかったが、VEGF 非存在下において Ki8751 処理により CXCR7 の発現低下を認めた。

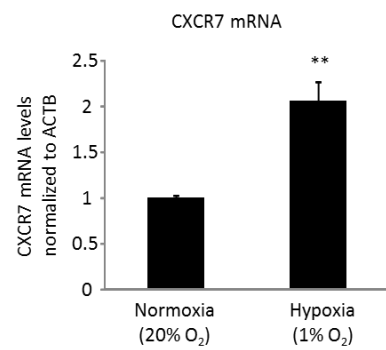


図 9D) mNEC を 1%酸素下で 48 時間培養する事により、CXCR7 発現が亢進された。
**<0.01

考察

近年、ヒトがん組織やマウス腫瘍組織より分離された TEC が NEC と比較して様々な異常性を獲得していると報告されてきている。2000 年に St.Croix らにより TEC の遺伝子異常が報告されて以来、TEC の高い血管新生能に関与する遺伝子がいくつか報告されてきている¹⁶。また、TEC は NEC と比較し高い血管新生能を獲得しており、TEC におけるそれら遺伝子の標的化は腫瘍血管特異的な創薬につながると考えた。本研究では TEC において発現が亢進している CXCR7 に着目して TEC の機能解析を行い、以下の事を明らかにした。

- 1) CXCR7 はヒト大腸がん・肺がん・肝細胞がんにおいて腫瘍血管内皮で発現が亢進している。
- 2) CXCR7 は TEC においてリガンド CXCL12 が結合することにより ERK1/2 を介して、運動能・管腔形成能・生存能亢進にはたらいている。
- 3) TEC は CXCR7 のリガンドである CXCL12 を分泌しており、CXCL12-CXCR7 オートクライン機構を自らの血管新生能に利用している。
- 4) CXCR7 阻害は *in vivo* において腫瘍血管新生を阻害し、腫瘍増殖・転移を抑制する
- 5) 腫瘍微小環境中の VEGF や低酸素が TEC における CXCR7 発現亢進のメカニズムのひとつである。

CXCR7 は CXCL12 をリガンドとする 7 回膜貫通型ケモカインレセプターであり、T 細胞などの血球細胞に発現すると報告されている¹⁷。近年、大腸がんや肺がん組織における CXCR7 の発現と予後が相関すると報告がされており¹¹⁻¹²、CXCR7 を標的とした治療がマウスにおける腫瘍増殖や転移を抑制すると報告されてきている^{9, 18-20}。また、がん組織における血管内皮で CXCR7 の発現が亢進しているとの報告も散見される^{18, 21-22}。しかし腫瘍血管内皮を構成する上で重要な TEC における機能に関しては未だ報告されておらず、本研究は TEC における CXCR7 の機能を解明した初めての報告である。

なお、本研究では CXCL12 の他のレセプターである CXCR4 の発現についても検討した。CXCR4 は種々のがん細胞において転移・増殖に関与していると報告されている²³。

しかし、CXCR4 の発現レベルはmTEC とmNEC での間に有意差を認めなかった。なお、CXCL12 は CXCR4 よりも CXCR7 により高い親和性があると報告されており¹⁹、CXCL12-CXCR7 が CXCL12-CXCR4 よりも TEC の血管新生能において重要であるのではないかと考えた。CXCR7 のリガンドである CXCL12 は腫瘍間質細胞から分泌され腫瘍増殖・転移に関与すると報告されている²⁴⁻²⁶、本研究では TEC が CXCL12 を分泌している事を ELISA 法で見出しており、CXCL12-CXCR7 オートクライン機構を獲得している可能性が強く示唆された。種々のがん細胞において CXCL12-CXCR7 が ERK1/2 をリン酸化させることを報告しているが⁸、TEC においても ERK1/2 をリン酸化させる事を示した。しかしながら、がん細胞などで CXCL12-CXCR7 による Akt リン酸化の報告や Akt のリン酸化が TEC における血管新生に関与する報告があるため¹⁴、TEC における Akt のリン酸化に関しても検討した。しかし、TEC においては CXCL12-CXCR7 の下流として Akt は関与していない事が示された。この事は細胞の種類により CXCL12-CXCR7 の下流シグナルが異なることを示唆している。腫瘍血管は未熟でもれやすく、血流に乏しい部分もあり、それにより腫瘍内は低酸素になっている箇所が多いことが知られている²⁷。近年、低酸素や HIF1 α が MSC において CXCR7 の発現を亢進させると報告されている²⁸⁻²⁹。本研究において NEC を低酸素状態で培養する事により CXCR7 の発現が亢進することがわかった。われわれは、TEC が NEC よりも HIF1 α の発現が高い事を報告しており³、TEC で CXCR7 の発現が高いことのメカニズムとして、腫瘍微小環境中の低酸素による HIF1 α の上昇による影響も示唆された。さらに、VEGF 刺激により CXCR7 発現が亢進し、VEGFR2 キナーゼ阻害剤によりそれがキャンセルされた事より CXCR7 は VEGF/VEGFR2 シグナルの下流に存在する可能性が示唆された。この事は CXCR7 阻害療法が現在使用されている VEGF 中和抗体を用いた血管新生阻害療法よりも腫瘍血管への選択性が高い治療に応用が可能であると考えられた。なお、CXCR7 阻害剤によって有意差はなかったものの腫瘍の増大は抑制される傾向を認めた。しかし腫瘍血管新生の抑制を伴う、肺転移抑制がみられたことから、CXCR7 阻害による *in vivo* 抗腫瘍効果に関しては今後マウスの匹数を増やしさらなる検討が必要と思われる。現在臨床で用いられているベバシズマブは他の抗がん剤と併用されており、今後 CXCR7 阻害療法と抗がん剤との併用療法による抗腫瘍効果の検討も必要と考えられた。今回の研究に

においては, *in vitro* 実験に使用する EC を確保するために, マウス皮下移植腫瘍から分離・培養した EC を用いた. ヒトのがんを研究するにあたり, 異種細胞を用いての実験結果の解釈には限界があることは知られている. しかし, 本研究で得られた CXCR7 の発現の結果はヒト腫瘍においても確認されている. 本研究において CXCR7 は腫瘍血管新生に重要であり, CXCR7 を標的とした治療が腫瘍血管特異的な血管新生阻害療法になりえる事が示唆された.

総括および結論

①本研究全体から得られた新知見

- ・ CXCR7 はヒトおよびマウスの腫瘍血管内皮で発現が亢進している.
- ・ CXCR7 は腫瘍血管内皮細胞の遊走能・管腔形成能・無血清抵抗性を亢進させる.
- ・ CXCL12-CXCR7 は ERK をリン酸化することにより, 血管新生能に関わっている.
- ・ 腫瘍血管内皮細胞は CXCL12 を高濃度で分泌しており, CXCL12-CXCR7 オートクライン機構を獲得している可能性がある.
- ・ CXCR7 を阻害する事で腫瘍血管新生が抑制され, 抗腫瘍効果が期待できる.

②新知見の意義

CXCR7 が腫瘍血管内皮に高発現している報告は散見するが, 腫瘍血管内皮細胞を用いて CXCR7 の機能解析を行った報告はなく, 初めて CXCR7 が腫瘍血管新生に関わることを報告した. また, CXCR7 阻害による抗腫瘍効果を検討しており, 今後腫瘍血管を特異的に標的とする創薬の開発に有用な知見であると思われる.

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

CXCR7 が腫瘍血管内皮に特異的に発現している事が証明されたが, がんの進行度による発現差を解析する事により, 今後がん診断・予後マーカーとしての可能性もあり得ると考えられる.

④今後の課題

CXCR7 は体内において単球やマクロファージなどにも発現しており, CXCR7 を標的とした創薬を検討するにあたり, 血球減少などの副作用に関してもさらなる知見が必要になると考えられた. また, 正常血管に対する副作用も検討しておらず, 今後のさらなる知見が望まれる.

謝辞

本研究にあたり、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科外科学講座消化器外科学分野Ⅰ武富紹信教授に謝意を表します。また、直接の御指導を賜りました、北海道大学遺伝子制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室 樋田京子特任准教授、間石奈湖特任助教に深く感謝申し上げます。また、今回の研究にあたり様々な面でご協力頂きました、北海道大学大学院歯学研究科歯学部口腔病態学教室 進藤正信教授、北海道大学大学院医学研究科循環器外科・呼吸器外科学講座 樋田泰浩講師、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅰの皆様および北海道大学大学院フロンティア研究ユニット血管生物学研究室内の皆様に心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1 McCarthy, M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* .**361**, 1959 (2003).
- 2 Giantonio, B. J. *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* .**25**, 1539–1544 (2007).
- 3 Ohga, N. *et al.* Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol* .**180**, 1294–1307 (2012).
- 4 Osawa, T. *et al.* Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer* .**109**, 2237–2247 (2013).
- 5 Osawa, T. *et al.* Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner. *Cancer Sci* .**103**, 1038–1044 (2012).
- 6 Kurosu, T. *et al.* HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. *Br J Cancer*. **104**, 819–829 (2011).
- 7 Yamamoto, K. *et al.* Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. *Br J Cancer*. **106**, 1214–1223 (2012).
- 8 Liberman, J. *et al.* Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PLoS One* **7**, e43665 (2012).
- 9 Miao, Z. *et al.* CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 15735–15740 (2007).
- 10 Wang, J. *et al.* The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*. **283**, 4283–4294 (2008).
- 11 Bild, A. H. *et al.* Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature*. **439**, 353–357 (2006).
- 12 Jorissen, R. N. *et al.* Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal

- Cancer. *Clin Cancer Res* .**15**, 7642–7651 (2009).
- 13 Maishi, N. *et al.* CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int.* **62**, 309–317 (2012).
 - 14 Kumar, R. *et al.* CXCR7 mediated Gialpha independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells. *Cell Immunol* .**272**, 230–241 (2012).
 - 15 Kawamoto, T. *et al.* Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis. *PLoS One* **7**, e34045 (2012).
 - 16 St Croix, B. *et al.* Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*. **289** (2000).
 - 17 Balabanian, K. *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* **280** (2005).
 - 18 Guillemot, E. *et al.* CXCR7 receptors facilitate the progression of colon carcinoma within lung not within liver. *Br J Cancer.* **107**, 1944–1949 (2012).
 - 19 Burns, J. M. *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* **203** (2006).
 - 20 Zheng, K. *et al.* Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* **29**, 31 (2010).
 - 21 Monnier, J. *et al.* CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells. *Eur J Cancer* .**48**, 138–148 (2012).
 - 22 Totonchy, J. E., Osborn, J. M., Botto, S., Clepper, L. & Moses, A. V. Aberrant proliferation in CXCR7+ endothelial cells via degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS One* .**8**, e69828 (2013).
 - 23 Rao, S. *et al.* CXCL12 mediates trophic interactions between endothelial and tumor cells in glioblastoma. *PLoS One* .**7**, e33005 (2012).
 - 24 Kollmar, O. *et al.* CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer.* **126**, 1302–1315 (2010).
 - 25 Muller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer

- metastasis. *Nature* .**410**, 50–56 (2001).
- 26 Maksym, R. B. *et al.* The role of stromal-derived factor-1—CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol.* **625**, 31–40 (2009).
- 27 McDonald, D. M. & Choyke, P. L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* .**9**, 713–725 (2003).
- 28 Liu, S. *et al.* CXCR7 silencing attenuates cell adaptive response to stromal cell derived factor 1alpha after hypoxia. *PLoS One* .**8**, e55290 (2013).
- 29 Liu, H. *et al.* Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* **401**, 509–515 (2010).