

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04941

研究課題名(和文) 腫瘍血管特異的マーカーを標的とした次世代肺癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of next generation lung cancer treatment targeting tumor vascular specific markers

研究代表者

樋田 泰浩 (Hida, Yasuhiro)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：30399919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌患者では健常者に比べて血清中ビグリカン濃度が高かった。肺癌患者では腫瘍径や浸潤形式との相関傾向が認められ、腺癌でその他の腫瘍よりも有意に低いビグリカン値を示した。腫瘍切片の免疫染色による検討では、肺癌腫瘍組織中の腫瘍血管内皮細胞にビグリカンの発現が認められ、血清中のビグリカン濃度と正の相関が認められた。ビグリカン高発現群で全生存率が有意に低かった。

マウス腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の大量調整を行い、腫瘍血管内皮細胞を特異的に阻害するヒット化合物を得ることが出来た。

ヒト血管内皮細胞にSV40とhTERTを遺伝子導入して長期間の培養を行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer patients showed higher serum Biglycan (BGN) than healthy control. In lung cancer patients, BGN level correlated with tumor size and invasiveness. Adenocarcinoma was associated with lower BGN than other lung cancers. In tumor tissue, BGN expression was observed in tumor endothelial cells. BGN expression in tissue correlated with serum BGN level. BGN expression in tumor tissue correlated with shorter overall survival. Large number of mouse tumor and normal endothelial cells were used for tumor endothelial cell specific inhibitor screening. We could find several hit compounds. We successfully induce SV40 and hTERT genes to human endothelial cells and grow them in long term.

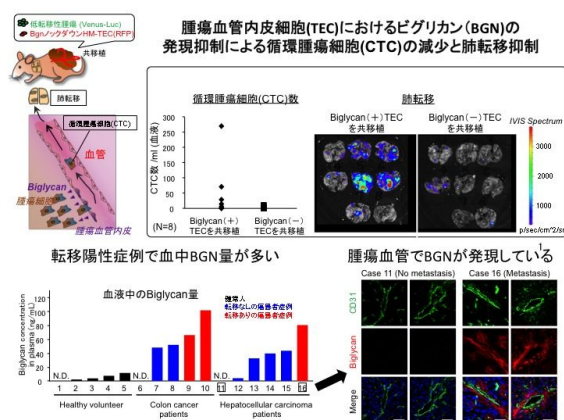
研究分野：呼吸器外科

キーワード：血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らはそれまで困難と考えられていた腫瘍血管内皮細胞(TEC, tumor endothelial cell)の分離培養に成功し、TEC に染色体異常や EGFR の過剰発現がみられることなどを報告してきた。また TEC と正常血管内皮細胞(NEC, normal endothelial cell)を比較して TEC 特異的な遺伝子を同定していた。そのうちのひとつであるビグリカン(BGN)の血管新生における役割と TEC 特異的な発現を申請者が初めて報告した。TEC 特異的な発現は分離培養したマウス TEC やヒト臨床検体でも認められ、マウスを用いた実験では TEC における BGN の発現を抑制すると転移が抑制された(下図)。



ヒト臨床例では転移陽性例で血清と組織中の BGN が高い傾向が認められ、診断や治療への応用が期待された。

TEC に特異的に作用して NEC に影響を及ぼさない理想的な阻害剤を同定するために低分子化合物や天然化合物ライブラリーのスクリーニングを行うことが必要である。そのためには安定した再現性の高いスクリーニング系の確立が必須である。ヒト由来の細胞はテロメラーゼ活性の低さのため、10 回継代前後が限界である。細胞そのものを用いた大規模な化合物のスクリーニングに使用できるよう細胞株の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は腫瘍血管内皮細胞(TEC)特異的マーカーを利用して、正常血管内皮細胞に影響を及ぼさない、腫瘍血管新生を特異的に阻害する治療薬とコンパニオン診断薬を開発する基盤を築くことである。

< 肺癌切除検体における TEC マーカー発現の解析 > 肺癌組織中の TEC における BGN の発現と臨床病理学的因子の相関を検討して、肺癌進展への寄与を検証する。

< TEC マーカー、BGN の血清診断 >

血清中 BGN を計測し、臨床病理学的因子、血管新生の指標との相関を検討する。

< TEC 阻害物質同定のためのスクリーニング系の樹立 >

ヒト TEC とコントロールとして正常 EC を不死化して細胞株化し、化合物ライブラリーなど阻害剤のスクリーニングを行えるようにする。

3. 研究の方法

< 肺癌切除検体における TEC マーカー発現の解析 >

肺癌切除検体切片を用いて BGN の免疫染色を行い、臨床病理学的因子や生存、再発の転帰との関係を検討する。

< TEC マーカーの血清診断 >

これまでの研究で確立した ELISA 法で肺癌患者の血液中の BGN 濃度を計測し、同一患者の切除組織における BGN の発現量の解析を進め ELISA 法による計測結果の妥当性、有用性を検証する。

< TEC 阻害物質同定のためのスクリーニング系の樹立 >

ヒト腫瘍から樹立した TEC に細胞不死化遺伝子を導入して、細胞そのものを用いた大規模な化合物のスクリーニングに使用できるように細胞株化を行う。

不死化したヒト TEC が遺伝子導入により本来の性質を失うことがひとつの懸念事項である。この点については、遺伝子導入後

に、血管内皮細胞の性質を保つことを確認することで試験材料としての適格性を評価する。

4. 研究成果

当研究グループが見出した腫瘍血管内皮細胞特異的な分泌タンパクであるビグリカンの健常人およびヒト癌患者の血清中濃度をELISAで解析した。肺癌患者46名と健常者8名の血清中濃度と臨床病理学的因子の解析を行った。肺癌患者では健常者に比べて血清中ビグリカン濃度が高かった。肺癌患者の中での検討では腫瘍径や浸潤形式との相関傾向が認められた。組織型別の検討では、腺癌で扁平上皮癌を含むその他の腫瘍よりも有意に低いビグリカン値を示した。腫瘍切片の免疫染色による検討では、肺癌腫瘍組織中の腫瘍血管内皮細胞にビグリカンの発現が認められ、血清中のビグリカン濃度と組織中の腫瘍血管内皮細胞のビグリカン発現の定量的解析の結果、正の相関が認められた。また、肺癌切除例155例の組織中ビグリカン発現と臨床病理学的因子の関係を解析した結果、ビグリカン高発現群で全生存率が有意に低いことが判明した。

腫瘍血管内皮細胞特異的阻害剤のハイスルーブットスクリーニングを行うために、初代培養細胞である腫瘍血管内皮細胞とコントロールとして用いる正常血管内皮細胞の大量調整が可能な細胞株の樹立を行った。これまでに分離培養に成功したマウス血管内皮細胞を用いて理化学研究所の376天然化合物ライブラリーのスクリーニングと国内製薬企業1社における3142化合物のパイロットスクリーニングで腫瘍血管内皮細胞を特異的に阻害するヒット化合物を得ることが出来た。

不死化ヒト腫瘍血管内皮細胞と不死化正常血管内皮細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に解析を行った。既に報告済みの腫瘍血管内皮特異マーカー

BGNなどに加えて、腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞で最も発現量の差がきつた遺伝子としてXを選出した。Xの発現は不死化正常血管内皮細胞に比べて不死化腫瘍血管内皮細胞では30倍以上高かった。Xは不死化前の腫瘍血管内皮と正常血管内皮細胞の間にも発現量の差が認められたことから、不死化前の性質を不死化腫瘍血管内皮細胞が維持していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計8件)

Shiyya H, Hida Y, Kaga K, Inoue R, Nakada-Kubota R, Matsui Y. Extrapleural pneumectomy of recurrent thymoma with pleural dissemination. *Respirol Case Rep*, 査読あり

2018 Feb 28;6(4):e00308.

Hida K., Maishi N., Akiyama K., Ohmura-Kakutani H., Torii C., Ohga N., Osawa T., Kikuchi H., Morimoto H., Morimoto M., Shindoh M., Shinohara N., Hida Y., : Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show drug resistance, *Cancer Sci*, 108(11), 2195-2203, 2017, 査読あり

Hida K., Kawamoto T., Maishi N., Morimoto M., Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Shinohara N., Hida Y. : miR-145 Promoted Anoikis Resistance in Tumor Endothelial Cells, *J Biochem*, 162(2), 81-84, 査読あり

Hojo T., Maishi N., Alam Mohammad Towfik, Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Hida Y., Minowa K., Fujisawa T., Hida K. : ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells, *Oncotarget*, 8(28), 45484-45495, 2017, 査読あり

Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K. : Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma, Anticancer Res, 37(3), 1219-1225, 2017, 査読あり

Hida K., Maishi N., Kawamoto T., Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Yamada K., Hojo T., Kikuchi H., Sato M., Torii C., Shinohara N., Shindoh M. : Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels, Pathol Int, 66(12), 687-694, 2016, 査読あり

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Yamamoto K., Kawamoto T., Inoue N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K. : Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan, Sci Rep, 6, 28039, 査読あり

Yamada K. §, Maishi N. §, Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and Hida K. : CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, Int J Cancer 137(12), 2825-2836 2015, 査読あり

〔学会発表〕（計 21 件）

Maishi N., Hida K. : Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via biglycan, Protein Island Matsuyama 2017 International Symposium (PIM 2017), 2017.9.13 (Matsuyama, Japan)

Kikuchi H., Maishi N., Akiyama K., Morimoto M., Yanagiya M., Miyajima N., Tsuchiya K., Maruyama S., Abe T., Hida Y.,

Harabayashi T., Ameda K., Matsumoto R., Kashiwagi A., Matsuno Y., Shinohara N., Hida K., : Analysis of multidrug resistant transporter expression in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, 2017 ASCO Annual Meeting, 2017. 6. 2-6, Chicago, Illinois

Dorcas A. Annan, 間石奈湖, 曾我朋義, Dawood Randa, 樋田泰浩, 樋田京子 : Glutamine Metabolism in Tumor Endothelial Cells, 第 116 回北海道癌談話会例会, 2017.10.21 (札幌)

Dorcas A. Annan, Maishi N., Soga T., Randa Dawood, Hida Y., Hida K. : Glutamine Metabolism in Tumor Endothelial Cells, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.9.30(横浜)

間石奈湖, 菊地 央, 森本浩史, 土屋邦彦, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子 : 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.9.29 (横浜)

森本浩史, 間石奈湖, 樋田泰浩, 西原広史, 畑中 豊, 松野吉宏, 中村 透, 平野聡, 樋田京子 : 肺癌症例における腫瘍血管内皮細胞マーカー-biglycan の発現解析, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.9.29 (横浜)

間石奈湖, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 森本真弘, 秋山廣輔, 吉岡祐亮, Alam Mohammad Towfik, 南 敬, 落谷孝広, 樋田泰浩, 樋田京子 : 高転移性腫瘍 miR による血管内皮における薬剤耐性誘導, 第 26 回日本がん転移学会学術集会, 2017.7.28 (大阪)

菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 森本真弘, 土屋邦彦, 丸山 覚, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 飴田 要, 松本隆児, 柏木 明, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子 : 尿路上皮癌における抗癌剤治療後の腫瘍血管 ABCB1 発現亢進, 第 26 回日本がん転移学会学術集会, 2017.7.28(大阪)

森本浩史, 間石奈湖, 樋田泰造, 西原広史, 畑中 豊, 松野吉宏, 中村 透, 平野聡, 樋田京子: 肺癌症例における腫瘍血管内皮マーカーbiglycan の発現解析, 第 26 回日本がん転移学会学術集会, 2017.7.28 (大阪)

Hida K., Torii C., Maishi N., Morimoto M., Akiyama K., Kawamoto T., Minami T., Yoshioka Y., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Ochiya T: Tumor endothelial cells acquire drug resistance by exosomal-miR derived from high metastatic tumor, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, Boston, Massachusetts, USA
Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y. Hida K.: Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via biglycan, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, Boston, Massachusetts, USA

Kikuchi H., Maishi N., Akiyama K., Morimoto M., Yanagiya M., Miyajima N., Tuchiya K., Maruyama S., Abe T., Hida Y., Harabayashi T., Ameda K., Matsumoto R., Kashiwagi A., Demura T., Tsuda M., Tanaka S., Matsuno Y., Shinohara N., Hida K.: P-glycoprotein expression dynamics in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, " has been accepted for presentation at Vascular Biology, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, Boston, Massachusetts, USA

Hida K., Maishi N., Ohga N., Hida Y.: Heterogeneity of Tumor endothelium, The 41th Naito Conference on " Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance

to Therapeutic Resistance ", 2016.7.7 (Sapporo, Japan)

Hida K.: Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2016, 2016.4.1, Breckenridge, Colorado.

Maishi N.: Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2016, 2016.3.30, Breckenridge, Colorado.

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K: Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, Tenth AACR-JCA Joint Conference " Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics ", 2016.2.17 (Maui, Hawaii)

柳谷美沙, 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 樋田泰造, 大賀則孝, 鄭 漢忠, 進藤正信, 北川善政, 樋田京子: Correlation between CXCR7 expression of blood vessels and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma, 第 24 回日本血管生物医学会学術集会, 2016.12.10 (長崎)

菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 森本真弘, 柳谷美沙, 土屋邦彦, 安部崇重, 樋田泰造, 原林 透, 飴田 要, 柏木 明, 田中伸哉, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子: P-glycoprotein expression dynamics in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, 第 24 回日本血管生物医学会学術集会, 2016.12.10 (長崎)

菊地 央, 間石奈湖, 土屋邦彦, 丸山 寛, 安部崇重, 樋田泰造, 原林 透, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子: 抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮の

P-glycoprotein 発現変化, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.7 (横浜)

Dorcias A Annan, Maishi N., Soga T., Hida Y., Torii C., Kikuchi H., Hida K.: Tumor endothelial cells are resistant to acidic environments, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.7 (横浜)

菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田京子: 抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮の P-glycoprotein 発現変化, 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2016.7.21 (米子)

②間石奈湖, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞による biglycan の分泌を介したがんの転移促進, 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2016.7.21 (米子)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞の樹立方法及び不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞

発明者: 樋田京子, 樋田泰浩, 間石奈湖, 菊地 央, 大場雄介
権利者: 樋田京子, 樋田泰浩, 間石奈湖, 菊地 央, 大場雄介
種類: 特願, PTC 国際特許出願
番号: 特願 2017-052042,
(PCT/JP2018-10735)
出願年月日: 2017. 3. 17(特願), 2018. 3. 19 (PCT)
国内外の別:
国内および国外

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋田 泰浩 (HIDA

YASUHIRO)

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号: 30399919

(2) 研究分担者

間石 奈湖 (MAISHI NAKO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号: 00632423

松居 喜郎 (MATSUI YOSHIRO)

北海道大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 90219379

加賀 基知三 (KAGA KICHIZO)

北海道大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 80224335

秋山 廣輔 (AKIYAMA KOSUKE)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号: 10609100

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号:

(4) 研究協力者

なし()