

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462390

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮分泌タンパクを用いた腎がんの転移予測

研究課題名(英文) Prediction of cancer metastasis by tumor endothelial secreting proteins

研究代表者

篠原 信雄 (Shinohara, Nobuo)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：90250422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが報告した腫瘍血管内皮マーカーのうちbiglycanなどの分泌タンパクががんの転移メカニズムにどのように関わっているのかを、細胞実験、動物実験にて解析した。腫瘍血管内皮細胞からの分泌タンパクであるbiglycanに関してはがん細胞のNF- κ B, ERKを活性化し浸潤能を亢進させ、さらに血管内皮の方へがん細胞をひきよせる働きがあることがわかった。その結果血管内浸潤を誘導し肺転移を促進することが見出された。またがん患者の血清におけるBiglycanのレベルとがんの血管内浸潤の有無にも相関が見られた。これら腫瘍血管内皮由来因子ががん転移のバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we addressed the involvement of tumor endothelial secreting molecule in cancer metastasis. Among these molecules, we focused on biglycan and analyzed the role of biglycan in cancer metastatic potential. We observed that biglycan-secreted from tumor endothelial cells activate NF- κ B and ERK in cancer cells and attract cancer cells towards tumor blood vessels, resulting in increase of lung metastasis. Furthermore, blood level of biglycan in cancer patients correlated with vascular invasion of cancer. These suggested that tumor endothelial secreting factor may be biomarker in cancer metastasis.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腫瘍血管新生 biglycan 転移 腫瘍血管内皮

1. 研究開始当初の背景

これまでがん細胞と異なり、血管内皮細胞などの間質細胞は正常であると信じられてきたが、申請者らのグループは腫瘍血管内皮細胞(TEC: Tumor endothelial cell)を分離・培養して、それらが正常血管内皮細胞(NEC: Normal EC)と比較すると細胞生物学的な性質が大きく異なることを明らかにしてきた。さらに腫瘍微小環境でTECが異常性を獲得するメカニズムに関して研究を進めてきたが、がん細胞の培養上清がNECにTECのような異常性をもたらすという事実を見出している。

申請者らはDNAマイクロアレイを用いたTECとNECとの網羅的遺伝子解析で、TECに特異的に発現している遺伝子を同定し、定量的PCRにてその発現を検証してきた。TECで高発現が認められた遺伝子の中でも最終産物が分泌タンパクとなるものは、生体内においてもがん組織中で血管内皮細胞が特異的に分泌するタンパクである可能性があり、早期がんと進行がんおよび転移の有無でその分泌タンパク量に相違が見られる可能性がある。これまでにTECに特異的に発現している分泌タンパクとして、biglycanを同定している。

進行性腎癌の治療においては、腎がん細胞や血管内皮細胞を標的とした分子標的薬が多数使用されているが、治療効果および副作用の強弱は個々の症例によって異なり、分子標的薬によるbenefitが得られる症例の選択、治療効果の予測などに有用とされるマーカーは見つかっていない。

そこで申請者らはbiglycanが腎がん患者の血清および尿中で再発、転移を予測するマーカーとなり得る可能性があるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが報告した腫瘍血管内皮マーカーのbiglycanが腎がんの転移メカニズムにどのように関わっているのかを、細胞実験、動物実験にて証明する。また、腎がん患者の血清中のbiglycanが、病期、転移の有無とどのような関連があるのかを解析しこれらの転移を予測する因子となり得るのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 手術前後での血清中 LOX および biglycan の発現スクリーニング

術前病期、転移の有無を画像所見により診断した腎がん患者の血清を採取後、直ちに凍結保存し、biglycanの測定をELISA法により定量的に行った。対照として健康成人からの血清を用いた。患者血清中のbiglycanが腎がんの病期および転移の有無と関連があるのかを検証した。

(2) 腎がん由来の血管内皮細胞の分離、培養と biglycan の発現検討

悪性度の異なる腎がん血管内皮細胞の分離
腫瘍血管内皮細胞を分離する方法として、血管内皮マーカーであるCD31抗体と磁器ビーズを用いる方法を確立している。内因性VEGF-Aの分泌が異なる腎がん細胞株を用いて、新たな腎腫瘍血管内皮細胞を分離をこころみた。

(3) biglycan の分泌能が異なる腫瘍血管内皮細胞の樹立

上記で得られた複数の腎腫瘍血管内皮細胞の内因性のbiglycanの発現をwestern blotにて確認する。培養上清中のbiglycanの確認はELISA法にて行った。

(4) 腎がん細胞株、腎腫瘍血管内皮細胞を用いた細胞間相互作用の解析

内因性biglycanの発現が異なる腎腫瘍血管内皮細胞の性質の比較

転移能の異なる腫瘍から分離された腫瘍血管内皮細胞を用いて細胞増殖と遊走を調べた。具体的にはVEGF-A 10ng/mLを添加後に細胞増殖はMTS assayでの吸光度の定量化によって、細胞浸潤はTranswell®を用いた細胞浸潤 assayによって行った。

(5) 腎がん細胞と腎腫瘍血管内皮細胞との細胞間相互作用

腎腫瘍血管内皮細胞が分泌するbiglycan高分泌の腎腫瘍血管内皮細胞はLOX(もしくはbiglycan)低分泌の腎腫瘍血管内皮細胞と比較し腎がん細胞株の浸潤をより誘導するのかを明らかとした。方法としてはMatrigelでコートしたTranswell®を用いて、上室に腎がん細胞株(ヒト)下室に腎腫瘍血管内皮細胞(マウス)を置いて、VEGF-A 10ug/mLを添加し16時間培養の後、浸潤した細胞をカウントした。

(6) 内因性 biglycan の発現の相違による腫瘍血管内皮細胞の接着能の比較

腎がん患者においては腫瘍血管内皮細胞自体が原発巣を離れ転移巣へ遊走、浸潤している可能性がある。biglycanの発現の異なった腫瘍血管内皮細胞を用いて*in vitro*での細胞接着能の比較を行った。方法としては、gelatinもしくはfibronectinでコート培養皿に血管内皮細胞を播種し30-90分後に接着した細胞をカウントした。

(7) 腎がん細胞と腎腫瘍血管内皮細胞との同時皮下移植マウスを用いた肺転移の解析

腎がん細胞と腎腫瘍血管内皮細胞との皮下同時移植マウスの肺転移巣の解析

腎がん細胞と腎腫瘍血管内皮細胞をマウス皮下に同時移植し腫瘍の増殖を経時観察した。約7-8週でマウスを安楽死させ、腫瘍を切除しリンパ節、肺転移の探索をおこなった。摘出した腫瘍と肺転移巣から病理切片を作成しCD31を用いた免疫染色にてMVD(micro vessel density)を計測し、生体内の腫瘍血管新生を定量化して比較した。またbiglycanの免疫組織染色も行った。

(8) 腎がん細胞と腎腫瘍血管内皮細胞との皮下同時移植マウスの血清中 biglycan の測定

腫瘍移植後1週ごとに安楽死が行われるまでマウス尾静脈より血清を採取し凍結保存する。測定はELISA法により定量的に行った。

4. 研究成果

がん患者における病期または転移の有無による血清中 biglycan の検出をおこなった。患者血清中の biglycan ががんの病期および転移の有無と関連があるのかを検証した。対照として健康成人からの血清を用いた。がん患者の血清中に biglycan が高いレベルで検出される患者が存在していた。さらに転移がある症例で biglycan が高い傾向を見出した。また、マウス腫瘍モデルを用いて癌の進展にともなう経時的な血中のレベルの変化を解析した。Biglycan は転移が検出される時期に、がんの増殖の後期から末期で増加することが見出された。

なお、biglycan は、転移能が異なる腫瘍内の血管内皮における発現も異なっていた。さらに、マウスモデルを用いて biglycan の発現とがんの転移との関連について詳細に検討をおこなった。腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞との共移植の系で biglycan をノックダウンしたところ、転移が抑制された。このことから、腫瘍血管内皮の biglycan ががんの転移を促進していることが示唆された。さらにがん患者血清を用いた biglycan などの腫瘍血管内皮マーカーの診断ツールとしての可能性について検討した。腫瘍血管内皮細胞からの分泌タンパクである biglycan, PTX3, SBSN の血清中の濃度を ELISA により解析した。Biglycan, SBSN についてはそれらの血中濃度と T 因子、血管浸潤との間に有意な相関が見られた。今後症例を増やして検討予定である。さらに、血管新生阻害剤である分子標的薬治療により腫瘍血管内皮マーカーの発現がどのように変化するのかについても解析をおこなった。

マウス腎癌移植モデルにおいて Sunitinib により血管新生阻害療法を行い抗腫瘍効果と転移巣、さらに血中の Biglycan, PTX3, SBSN などの分泌タンパクのレベルの推移を ELISA により解析した。また、免疫染色によ

り、腫瘍血管内皮マーカーの発現の推移とともに、血管の数ならびに成熟度（周皮細胞の被覆や管腔の大きさ）などについても組織学的に解析を行った。分子標的薬による治療により、これら腫瘍血管内皮マーカーの血中のレベルが下がり腫瘍血管内皮由来因子が血管新生阻害療法中のバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

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 17 件)

Oya M, Tomita Y, Fukasawa S, Shinohara N, Habuchi T, Rini BI, Fujii Y, Kamei Y, Umeyama Y, Bair AH *et al*: Overall survival of 1st-line axitinib in metastatic renal cell carcinoma: Japanese subgroup analysis from phase II study. *Cancer science* 2017 Torii C., 査読あり

Tomita Y, Fukasawa S, Oya M, Uemura H, Shinohara N, Habuchi T, Rini BI, Chen Y, Bair AH, Ozono S, Naito S, Akaza H: Key predictive factors for efficacy of axitinib in first-line metastatic renal cell carcinoma: subgroup analysis in Japanese patients from a randomized, double-blind phase II study. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Aug 29. 査読あり

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, 1219-1226, 2017 査読あり
doi: 10.21873/anticancer.11437

*Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K, Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M. Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1. *J Oral Biosci*, 59(2017), 50-54, 2017. 査読あり
doi.org/10.1016/j.job.2016.10.004

*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
DOI: 10.1111/pin.12474

*Hida K., Maishi N., Torii C., Yanagiya M., Annan Akuba-Muhyia Dorcas., Morimoto M., Alam Mohammad Towfik. Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells. *Hokkaido J. Dent. Sci.* 37:40-48, 2016. 査読あり

hdl.handle.net/2115/63416

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, 2016. 査読あり

doi: 10.1038/srep28039

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.: CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836 2015 査読あり

DOI: 10.1002/ijc.29655

Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and *Hida K.: Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015 査読あり

DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017

Eto M, Kawano Y, Hirao Y, Mita K, Arai Y, Tsukamoto T, Hashine K, Matsubara A, Fujioka T, Kimura G, Shinohara N, Tatsugami K, Hinotsu S, Naito S; Japan RCC Trialist Collaborative Group (JRTCG) investigators.: Phase II clinical trial of sorafenib plus interferon-alpha treatment for patients with metastatic renal cell carcinoma in Japan. *BMC cancer* 2015; 15(1):667. 査読あり

Matsumoto R, Shinohara N, K CH, Kuroda

N, Tsuchiya K, Maruyama S, Abe T, Nonomura K: Concurrent occurrence of renal cell carcinoma with rhabdoid features in a married couple: a case report. *BMC research notes* 2015, 8(1):3. 査読あり

Naito S, Sakai H, Hashine K, Tomita T, Shinohara N, Fujisawa M, Eto M, Ozono S, Akaza H: Phase 1/2 study of S-1 in combination with sorafenib for metastatic renal cell carcinoma. *Annals of oncology* 2015. 査読あり

Shinohara N, Obara W, Tatsugami K, Naito S, Kamba T, Takahashi M, Murai S, Abe T, Oba K, Naito S: Prognosis of Japanese patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma in the era of molecular-targeted therapy. *Cancer science* 2015. 査読あり

Tatsugami K, Shinohara N, Kondo T, Yamasaki T, Eto M, Tsushima T, Terachi T, Naito S: Role of cytoreductive nephrectomy for Japanese patients with primary renal cell carcinoma in the cytokine and targeted therapy era. *Int J Urol* 2015. 査読あり

Ohmura-Kakutani H., Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Iida J., Shindoh M., Tsuchiya K., Shinohara N., *Hida K: Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype, *PLoS ONE*, 9(12):e113910, 2014. 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0113910.

Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and *Hida K: Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 105(12), 1533-1540, 2014. 査読あり

DOI: 10.1111/cas.12549.

Otsubo T., Hida Y., Ohga N., Sato H., Kai T., Matsuki Y., Takasu H., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Nonomura K., *Hida K.: Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells, *Cancer Sci*, 105(5), 560-567, 2014. 査読あり

[学会発表](計 12 件)

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, (Sheraton Boston Hotel, Boston, Massachusetts, USA) (国際学会)

間石奈湖, 樋田京子: 第75回日本癌学会学術総会特別シンポジウム2「癌研究における女性研究者」, “腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進”, 2016.10.7(パシフィコ横浜(横浜市))招待講演

間石 奈湖、樋田 京子: 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム「酸化ストレスと発がん～最新の知見～」, “活性酸素が腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響”, 2016.8.31(仙台国際センター(仙台市))招待講演

Maishi N. : Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (国際学会) 2016.3.30 (Breckenridge, Colorado, USA)

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” (国際学会) 2016.2.17 (Maui, Hawaii, USA)

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, The European Cancer Congress 2015 (国際学会) 2015.9.27 (Vienna, Austria)

間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第 26

回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

Maishi N., Hida K. : Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors, Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization(招待講演)(国際学会) 2015.5.13 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府・吹田市)

間石奈湖, 樋田京子: 第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, “腫瘍血管内皮のがん転移促進機構”(招待講演) 2015.1.30 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

Maishi N., Hida K. : The 17th HU-SNU JOINT SYMPOSIUM “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anti-angiogenic therapy”, (招待講演)(国際学会) 2014.11.28 北海道大学(北海道・札幌市)

間石奈湖, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞の相互作用, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014.9.26 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Maishi N., Hida K. : 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anticancer drugs”(招待講演)(国際学会) 2014.5.26 (Istanbul, Turkey)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 信雄 (SHINOHARA, nobuo)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号: 90250422

(2) 研究分担者

土屋 邦彦 (TSUCHIYA, kunihiko)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号: 50374442

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