

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20357

研究課題名(和文) 血管トランスポーター阻害による口腔がん薬剤耐性の克服

研究課題名(英文) Overcome the drug resistance of oral cancers with inhibition of transporters in tumor endothelial cells

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：化学療法はがん治療法の一つであるが、がんの薬剤耐性により期待通りの成果には至っていない。腫瘍血管内皮細胞TECには様々な異常性があることが明らかになってきており、TEC自身にも薬剤抵抗性があることがわかってきた。本研究では、TECの薬剤耐性トランスポーター阻害により、抗癌剤の感受性を高め、薬剤耐性克服を目指した検討を行った。TECに抗癌剤パクリタキセルと薬剤耐性関連トランスポーター阻害剤を処理すると、抗癌剤による増殖抑制効果が阻害剤により増強された。さらに、担癌マウスに抗癌剤パクリタキセルと薬剤耐性関連トランスポーター阻害剤を併用投与すると、抗癌剤単独投与よりも治療効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy is one of the method of cancer therapy, but the therapeutic effect is not enough because of drug resistance. It has been reported that tumor endothelial cells (TECs) show abnormal phenotype. TECs are resistant to anti-cancer drug. In this study, we tried to inhibit transporters which is related to drug resistance. Treatment of paclitaxel with transporter inhibitor inhibited TEC proliferation in vitro. In addition, treatment of paclitaxel with transporter inhibitor inhibited tumor growth compared to single paclitaxel treatment.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：がん 腫瘍血管 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

現在、多くのがん治療において化学療法は治療の第一選択となっていることが多いが、必ずしも期待通りの成果を上げていない。その大きな原因の一つに、がん細胞の薬剤耐性獲得が挙げられる。一方、腫瘍微小環境におけるがん細胞と間質細胞の相互作用について様々なことが明らかになってきた。がん間質細胞は、正常組織における間質細胞とは性質が異なり、様々な異常性を示してがんの悪性化に関与することが知られている。がん細胞のみならず、がん間質細胞も薬剤抵抗性に重要な役割があることが近年わかってきており、このがん間質細胞が新たながん治療に対する薬剤耐性のメカニズムとして注目されている。腫瘍血管は、がんの進展や転移に重要な役割を担っている。近年、腫瘍血管を標的とする血管新生阻害療法が新たながん治療戦略として注目を浴びている。われわれはこれまで、腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞を分離・培養し、その性質について解析を進めてきた。その結果、腫瘍血管内皮細胞自身にも薬剤耐性関連トランスポーターの発現亢進に伴う、薬剤抵抗性があることがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍細胞のみならず、腫瘍血管内皮の薬剤耐性関連トランスポーターを阻害することで抗癌剤の感受性を高め、口腔癌の薬剤耐性を克服できる新たな治療法の開発を目指した基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1)腫瘍血管内皮細胞の分離・培養

ヌードマウスに腫瘍細胞を皮下移植して腫瘍を形成させ、腫瘍組織を摘出する。腫瘍を細切後、コラゲナーゼ処理を行い、磁気ビーズ細胞分離法ならびにセルソーターFACS AriaII を用いて CD31+CD45⁻ の血管内皮分画を腫瘍血管内皮細胞 (TEC) として採取する。コントロールとして正常マウスの皮膚から同様に正常血管内皮細胞 (NEC) を分離する。培養後、血管内皮の特性を PCR 法とフローサイトメーターを用いて解析し、分離した血管内皮細胞が血管内皮マーカーを発現し、他細胞の混入がないことを確認する。

(2)腫瘍血管内皮細胞における薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析

組織免疫染色

腫瘍血管における薬剤耐性関連トランスポーターの発現を、抗 CD31 抗体 (血管マーカー) ならびに抗 P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) 抗体を用いて蛍光二重免疫染色で可視化する。

PCR 法

分離培養した血管内皮細胞の RNA を採取し、

逆転写後、Real-time PCR 法にて発現を比較する。

(3)薬剤耐性関連トランスポーター阻害の検討

in vitro 解析

分離培養した血管内皮細胞に、抗癌剤 Paclitaxel を処理し、細胞増殖を MTS assay により評価する。薬剤耐性関連トランスポーターの阻害剤としては、Verapamil を用いる。

in vivo 解析

担癌マウスに抗癌剤 Paclitaxel と薬剤耐性関連トランスポーター阻害剤 Verapamil を併用し、阻害剤により抗癌剤の効果が上昇するかどうか検討する。投与方法は、血管を標的とすることから Low dose metronomic chemotherapy のプロトコルで行う。治療効果は腫瘍の大きさ、転移の有無、血管数で評価する。

(4)臨床検体を用いた薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析

手術摘出組織標本を用いて、血管における薬剤耐性関連トランスポーターの発現を解析する。具体的には、凍結切片において CD31 ならびに P-gp に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色で行う。凍結切片が手に入らない検体については、パラフィン包埋切片において、連続切片で CD31 ならびに P-gp を染色し評価する。

4. 研究成果

(1)腫瘍血管内皮細胞の分離・培養

TEC と NEC をそれぞれ CD31+CD45⁻ 分画として分離した。培養後に PCR 法ならびにフローサイトメーターにより CD31, CD144, VEGFR2 などの血管内皮細胞マーカーが陽性であり、かつ CD11b, CD45 といった血球マーカーやがん細胞マーカーが陰性であることを確認し、分離された細胞が純度の高い血管内皮細胞であることを確認した。

(2)腫瘍血管内皮細胞における薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析

組織免疫染色

腫瘍組織の凍結切片を用いた、CD31 と P-gp の蛍光二重免疫染色を行った。CD31 にマージして P-gp のシグナルが観察された。それにより腫瘍血管に P-gp が発現していることが示唆された。なお、正常皮膚においては CD31 陽性血管に P-gp の発現は見られなかった。

PCR 法

TEC と NEC の薬剤耐性関連トランスポーター MDR1 の遺伝子発現を比較したところ、TEC において有意に高い結果が得られた。

(3)薬剤耐性関連トランスポーター阻害の検討

in vitro 解析

TEC と NEC に抗癌剤 Paclitaxel を処理すると、NEC に比べ TEC において細胞増殖が亢進しており、TEC における薬剤耐性が観察された。一方で、薬剤耐性関連トランスポーター阻害剤 Verapamil を併用すると、その薬剤耐性がキャンセルされたことから、TEC における MDR1/P-gp 発現亢進が Paclitaxel に対する薬剤耐性に関与することが示唆された。

in vivo 解析

担癌マウスに抗癌剤 Paclitaxel 単独投与、Paclitaxel と薬剤耐性トランスポーター阻害剤 Verapamil との併用投与を行った。その結果、抗癌剤単独投与よりも阻害剤併用により抗腫瘍効果が得られた。さらに、in vivo imaging 装置 IVIS Spectrum により転移の減少が観察された。また、組織免疫染色により CD31 陽性領域が減少し、血管新生阻害効果が得られた。以上より、P-gp 阻害により抗癌剤 Paclitaxel の治療効果を上げることが示唆された。

(4)臨床検体を用いた薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析

手術摘出組織標本を用いて、血管における薬剤耐性関連トランスポーターの発現を解析した。その結果、血管 CD31 の領域の一部に P-gp 発現が観察された。現在、腫瘍細胞ならびに腫瘍血管における P-gp 発現と治療効果（予後）との関連について、さらなる解析を進めている。

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5件)

Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohira 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

樋田京子, 大賀則孝, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田泰浩: 腫瘍血管内皮細胞の多様性, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患~慢性炎症とがん, 5(1), 北隆館, 158-164, 2016

*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

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. Tumor 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

〔学会発表〕(計8件)

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, 樋田泰浩, 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, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

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)

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

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

菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 森本真弘, 柳谷美沙, 宮島直人, 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, 出村孝義, 津田真寿美, 田中伸哉, 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 49 回北海道病理談話会, 2016.10.15, 北海道大学 (北海道・札幌市)

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)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/vascular-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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