

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20554

研究課題名(和文)循環腫瘍血管内皮細胞による前転移ニッチ形成

研究課題名(英文)Premetastatic niche formation by circulating tumor endothelial cells

研究代表者

菊地 奈湖(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

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)：がんの転移に先立ち、転移先臓器においてがん細胞が転移しやすい環境、前転移ニッチが形成されることが報告されている。一方、腫瘍血管を裏打ちする腫瘍血管内皮細胞は、血管から剥がれ落ちて血液中に循環することが知られている。本研究では循環腫瘍血管内皮細胞が転移に関与する可能性を検討した。マウスに腫瘍血管内皮細胞を尾静脈注射すると、正常血管内皮細胞よりも肺組織に多く接着した。GFP皮膚移植マウスモデルを作成し、移植皮膚下に腫瘍移植後、血液中のGFP陽性細胞を検出した。今後、サイトカインを多く分泌する循環腫瘍血管内皮細胞による転移促進機序をさらに検討する予定である。

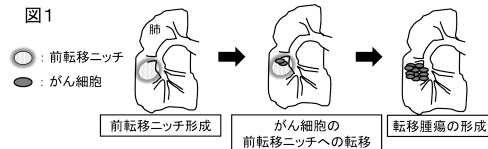
研究成果の概要(英文)：It is reported the formation of supportive metastatic microenvironment, referred to as premetastatic niche, before arrival of metastatic cells. Tumor endothelial cells, lining tumor blood vessels, is known to circulate in blood. In this study, we investigated the role of TECs in tumor metastasis. TECs adhered lung tissues more compared to normal endothelial cells when they were injected into mice intravenously. We established skin transplantation model using GFP mouse. Tumor cells were injected under the skin graft, and then we detected GFP positive cells in the blood of the mouse. We will examine the mechanisms of tumor metastasis by circulating TECs which secrete many cytokines.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：腫瘍血管新生 腫瘍血管内皮細胞 転移

### 1. 研究開始当初の背景

がん患者の死亡原因の9割はがんの転移によるものであり、がん転移の制御は重要である。Kaplanらは2005年Nature誌において、がん細胞の転移に先立ち、がんから分泌された液性因子が転移先臓器のファイブロネクチン産生を亢進させ、FN結合タンパクVLA-4を発現するVEGFR-1陽性細胞の集積を促して前転移ニッチを形成し、そこにがん細胞が転移してくることを報告した(下図)。



腫瘍血管はがんへの栄養供給だけではなく、転移の関門としても重要である。われわれはこれまで、腫瘍血管を裏打ちする腫瘍血管内皮細胞(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)と比較して増殖能や遊走能などの血管新生能が高いこと、成長因子や薬剤に対する感受性が異なること、様々な遺伝子発現が異なることなどを報告してきた。腫瘍血管内皮細胞は、正常血管内皮に比べて血管内皮細胞同士の結合が疎であり、ペリサイトや基底膜との結合力が弱いことから、容易に剥がれ落ちて血液中を循環することが知られている。このように血液中を循環する腫瘍組織由来の血管内皮細胞は、循環腫瘍血管内皮細胞と呼ばれている。しかし、循環腫瘍血管内皮細胞が単に血液中に存在するだけなのか、あるいは何らかの役割をもつのかについては不明である。

### 2. 研究の目的

われわれはこれまで、腫瘍血管内皮細胞が様々な接着因子やサイトカインを高く発現していることを見出していることから、本研究では、腫瘍組織から剥がれ落ちた循環腫瘍血管内皮細胞が、接着因子の発現を介して転移巣へと漂着し、様々なサイトカインを分泌することにより前転移ニッチを形成して、がんの転移へ関与するかどうかについて検討することにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管内皮細胞の分離・培養:

ヒト高転移性腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍塊から腫瘍血管内皮を分取する。正常コントロールとして非担癌マウスの正常皮膚由来血管内皮を分離する。血管内皮の分離には、CD31抗体およびCD45抗体を用いて、磁気細胞分離装置MACSとセルソーターFACS Ariaにより、CD31+CD45-の血管内皮分画を採取する。分離した血管内皮の特性解析は、PCR法とフローサイトメトリーにより、血管内皮マーカーを発現し、他細胞の混

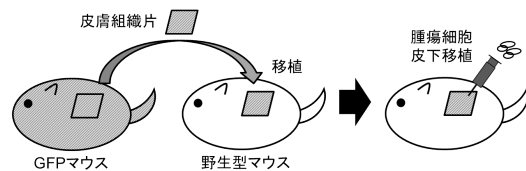
入がないことを確認する。

#### (2) 腫瘍血管内皮細胞の尾静脈注射による転移先臓器への生着:

腫瘍血管内皮細胞による前転移ニッチ形成を想定した肺への生着の有無を検討するため、(1)で分離培養した各血管内皮細胞をマウスの尾静脈から注入する。肺血管内皮と区別化させるため、静注する血管内皮細胞には予めVenus遺伝子を導入する。肺(遠隔臓器)への生着は、in vivo imaging装置および蛍光顕微鏡を用いて評価する。

#### (3) GFPマウス皮膚移植モデルの確立:

腫瘍血管内皮細胞が原発巣から転移先臓器に飛んで生着するかどうかを評価するため、GFPマウスの皮膚移植モデルを用いて検討する。下図に示す通り、GFPマウスの皮膚を野生型WTマウスに移植する。皮膚生着後、その皮下に腫瘍細胞を移植する。形成された腫瘍内の血管には、GFPマウス皮膚由来の血管が存在すると想定される。遠隔転移が起こる前段階において血液、原発腫瘍、肺(遠隔臓器)を摘出し、GFP+ECを確認する。



#### (4) 循環腫瘍血管内皮細胞CTECの検出

(3)のモデルを用いて血液を採取し、循環腫瘍血管内皮細胞GFP+CD31+CD45-の検出を試みる。コントロールとしてGFP皮膚移植した非担癌マウスおよび非皮膚移植の担癌マウスの血液を用いる。

### 4. 研究成果

#### (1) 血管内皮細胞の分離・培養:

ヒト高転移性腫瘍由来血管内皮細胞および正常皮膚由来血管内皮細胞を磁気細胞分離装置MACSにより分離後、さらにセルソーターFACS Ariaにより、CD31+CD45-の血管内皮分画をソーティングし純度を上げた。分離した血管内皮細胞は培養後、PCR法ならびにフローサイトメトリーにより、血管内皮マーカーCD31、CD144を発現し、血球マーカーCD45、骨髄由来細胞マーカーCD11bが陰性であることを確認した。血管内皮細胞を純度高く分離することに成功した。

#### (2) 腫瘍血管内皮細胞の尾静脈注射による転移先臓器への生着:

分離培養した各血管内皮細胞にVenus遺伝子をレンチウイルスベクターで導入し、さらにセルソーターFACS AriaによりVenus陽性細胞のみをソーティングして純度を上げた。それぞれの血管内皮細胞をヌードマウスに尾静脈注射後2日後、14日後に肺を摘出し、

蛍光顕微鏡を用いて蛍光シグナルを観察した。正常血管内皮細胞を注入したマウスの肺では蛍光シグナルがほとんど検出されなかったが、腫瘍血管内皮細胞を注入したマウスの肺では多くの蛍光シグナルが検出された。したがって、血液中を流れる腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞よりも肺組織に接着しやすいことが示された。

(3) GFP マウス皮膚移植モデルの確立：  
GFP マウスの皮膚を野生型マウスに移植し GFP マウス皮膚移植モデルの作製を試みた。しかし、移植片に免疫反応が惹起されて組織内はネクローシスになった。次に胸腺欠損ヌードマウスを用いて同様の実験を試みたところ、皮膚の生着に成功した。

(4) 循環腫瘍血管内皮細胞 CTC の検出  
(3) のモデルを用いて GFP 移植皮膚下に腫瘍細胞を移植し、腫瘍形成後に血液を採取し CTC chip デバイスを用いて血液中の GFP 細胞の分離を試みた。血液中に GFP 陽性細胞は検出されたものの、血管内皮細胞由来ではなかった。今後は腫瘍移植後の日数と転移形成時期を検討し、最適な時期に再度評価する予定である。

#### 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 15 件)

1. \*Hida K., Maishi N.: Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression. *Oral Sci Int.* 15(1), 1-6, 2018. 査読有
2. \*Hida K., Kikuchi H., Maishi N., Hida Y.: ATP-binding cassette transporters in tumor endothelial cells and resistance to metronomic chemotherapy. *Cancer Lett.* 400, 305-310, 2017. 査読有
3. Maishi N., \*Hida K.: Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci.* 108(10), 1921-1926, 2017. 査読有
4. \*樋田京子, 閻石奈湖: 腫瘍微小環境における血管系の異常. 医学書院 生体の科学 特集 血管制御系と疾患. 68(4), 321-323, 2017. 査読無
5. \*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. 査読有
6. Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohno 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. 査読有
7. Hojo T., Maishi N., Towfik AM., 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. 査読有
8. \*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, 2017. 査読有
9. \*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. and Hida Y.: Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show drug resistance. *Cancer Sci.* 108(11), 2195-2203, 2017. 査読有
10. 閻石奈湖, 樋田京子: 腫瘍血管・腫瘍血管内皮細胞の特徴とその分子機構. 医学のあゆみ“がん微小環境の病態理解と制御”258(1), 11-14, 2016. 査読有
11. \*Hida K., Maishi N., Torii C., Hida Y.: Tumor Angiogenesis—Characteristics of Tumor Endothelial Cells. *Int J Clin Oncol.* 21, 206-212, 2016. 査読有
12. \*Hida K., Maishi N., Sakurai Y., Hida Y., Harashima H.: Heterogeneity of tumor endothelial cells and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 99(Pt B), 140-147, 2016. 査読有
13. \*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. 査読有
14. \*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. 査読有
15. 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. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 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: Analysis of multidrug resistant transporter expression in tumor blood vessels during chemotherapy, 第76回日本癌学会学術総会, 2017.9.29(パシフィコ横浜(横浜市))
2. 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, (Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan) 国際学会, 招待講演
3. 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(大阪国際会議場(大阪市))
4. 間石奈湖: 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2回口腔医科学フロンティア研究会, 2017.3.5(ZAOセンタープラザ(山形市))
5. 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
6. 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 秋山廣輔, 吉岡祐亮, 落谷孝広, 柳谷美沙, 森本真弘, 菊地 央, 鄭 漢忠, 北川善政, 進藤正信, 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IL-6を介した薬剤耐性誘導, 第49回北海道病理談話会, 2016.10.15(北海道大学(札幌市))
7. 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
8. 間石奈湖: 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, 平成28年度新学術領域研究「学術研究支援基礎形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】」若手支援技術講習会, 2016.9.17(グランドホテル滝の湯(茅野市))
9. 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

10. 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(米子コンベンションセンター(米子市))
11. 間石奈湖: 腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進, 第12回北海道癌免疫制御研究会, 2016.7.9(メルキュールホテル札幌(札幌市)) 招待講演

〔図書〕(計 1 件)

樋田京子, 間石奈湖, 森本真弘: がんエクソソーム, 落谷孝広監修, パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線, エヌ・ティー・エス, 東京, 2017, 127-136(分担執筆)

〔その他〕

北海道大学 遺伝子病制御研究所 フロンティア研究ユニット 血管生物学研究室ホームページ  
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/vascular-biology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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