

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591655  
 研究課題名（和文）悪性腫瘍間質細胞による前転移ニッチェ形成と転移促進のメカニズムの  
 解明  
 研究課題名（英文）Mechanism of premetastatic niche formation and promotion of  
 metastasis by cancer mesenchymal cells

研究代表者  
 樋田 泰浩 (HIDA YASUHIRO)  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号：30399919

研究成果の概要（和文）：腫瘍細胞・腫瘍血管内皮細胞相互作用による肺転移促進の機序

蛍光タンパクでラベルした腫瘍細胞と腫瘍血管内皮細胞を用いることで、腫瘍血管内皮細胞が腫瘍細胞の浸潤転移を促進していることを明らかにすることができた。腫瘍血管内皮細胞とマウスに共移植すると循環血液中の腫瘍細胞と肺転移が増加した。腫瘍血管内皮への遊走と内皮細胞シート下への浸潤(transendothelial migration)がその機序であった。

研究成果の概要（英文）：Promotion of lung metastasis by interaction between tumor and tumor endothelial cells

In this study, it was shown that tumor endothelial cells promote invasion and metastasis of tumor cells using cells labeled with fluorescein proteins. Tumor cells inoculated to mice with tumor endothelial cells circulated in peripheral blood and metastasized to lungs more than control conditions. The mechanism are enhanced migration of tumor cells towards tumor endothelial cells and transendothelial migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌・転移・血管新生・血管内皮細胞・ニッチェ

1. 研究開始当初の背景  
 悪性腫瘍の他臓器転移には腫瘍細胞の血管内への浸潤が必須であるが、転移巣の形成には血液中を循環する腫瘍細胞が転移臓器に漂着して増殖することが必要である。Kaplanらは腫瘍細胞の転移に先立って転移先臓器に前転

移ニッチェ(pre-metastatic niche)が形成されることを見出した(Nature 2005)。前転移ニッチェはVEGFR-1(Vascular endothelial growth factor receptor-1)陽性の細胞から成る。腫瘍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(FN)産生を亢進させ

て、FN 結合タンパクであるVLA-4 ( $\alpha 4 \beta 1$  インテグリン) を発現するVEGFR-1 陽性細胞の集積を促して前転移ニッチェを形成し、そこに腫瘍細胞が転移してくると考えられている。VEGFR-1 陽性細胞の供給源の一つとして骨髄細胞が想定されている。根拠の一つは前転移ニッチェのVEGFR-1 陽性細胞が幹細胞マーカーを発現していることにある。一方、幹細胞マーカーを発現する細胞集団に腫瘍組織由来の血管内皮細胞がある。申請者らは、腫瘍組織間質から腫瘍間質由来血管内皮細胞(T-EC, tumor-associated endothelial cell)の分離培養に施行し、T-EC はVEGFR-1 と幹細胞マーカーを共発現することを見出した。T-EC は腫瘍組織を離れて血液中を循環すること、前転移ニッチェ細胞の特徴である幹細胞マーカー(Sca-1, stem cell antigen-1)を発現すること、転移巣には豊富にT-EC が存在すること、SDF-1 などの血管新生促進因子を分泌して腫瘍細胞の生着、増殖に有利な環境をつくりだせることから前転移ニッチェと転移巣の形成に寄与する可能性が高いと考えられる。骨髄由来の細胞の一部はT-EC になることが知られている。骨髄由来のVEGFR-1 陽性細胞は一度腫瘍間質細胞となり、癌微小環境内でT-EC として移動能と増殖能を獲得してから転移先臓器に前転移ニッチェを形成して腫瘍細胞の転移しやすい環境を整えるのではないかと考えられる。我々は、腫瘍組織中のT-EC が血液中へと流出し、転移先臓器に先行して漂着して前転移ニッチェを形成して、転移形成準備状態を整えて腫瘍細胞を迎え入れるという仮説を立て、研究を計画した。

2. 研究の目的  
血管内皮細胞の癌転移への影響を明らかにする。

3. 研究の方法  
腫瘍細胞と血管内皮細胞にそれぞれ波長の異なる蛍光タンパク遺伝子を導入して in

vivo, in vitro での相互作用を解析する。

#### 4. 研究成果

A) in vitro transendothelial migration assay

ウイルスベクターを用いて腫瘍血管内皮細胞とマウスと正常皮膚から樹立した正常皮膚血管内皮細胞に蛍光タンパク遺伝子導入した細胞株を樹立した。蛍光遺伝子の発現はFACSで確認し、ソーティングして純度を高めた。この腫瘍血管内皮細胞あるいは正常皮膚血管内皮細胞を培養皿でコンフルエントになるまで培養して内皮細胞シートを形成し、この上に蛍光標識した腫瘍細胞を播種した。コンフォーカル蛍光顕微鏡を用いて腫瘍細胞が血管内皮細胞のシートの下に潜り込む様子を評価できた。腫瘍血管内皮細胞シートの方で腫瘍細胞の潜り込み(transendothelial migration)が多く観察された。

B) 腫瘍血管内皮細胞の肺への集積と転移形成の評価

1) マウス尾静脈からの腫瘍血管内皮細胞と正常皮膚血管内皮細胞の静注モデル

上記の蛍光蛋白質を導入した血管内皮細胞株をマウスの尾静脈から静注して蛍光顕微鏡、実体顕微鏡で肺への生着を検討した。腫瘍血管内皮細胞でより多くの生着が認められた。

2) 腫瘍細胞と腫瘍血管内皮細胞の混合腫瘍モデル (異種皮下腫瘍モデル)

腫瘍細胞と GFP ラベルした腫瘍血管内皮細胞を混合してマウス皮下に接種した。コントロール実験として、腫瘍血管内皮細胞の代わりに正常皮膚血管内皮細胞を用いた。腫瘍血管内皮細胞を混合したマウスでは血液中の腫瘍細胞数と肺転移が増加していた。

#### 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 13 件)

1: Maishi N, Ohga N, Hida Y, Akiyama K, Kitayama K, Osawa T, Onodera Y,

- Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K. CXCR7: A novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int*. 2012 May;62(5):309-17. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02792.x. (査読有り)
- 2: Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, Maishi N, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Tumor-Derived Microvesicles Induce Proangiogenic Phenotype in Endothelial Cells via Endocytosis. *PLoS One*. 2012;7(3):e34045. (査読有り)
- 3: Osawa T, Ohga N, Hida Y, Kitayama K, Akiyama K, Onodera Y, Fujie M, Shinohara N, Shindoh M, Nonomura K, Hida K. Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner. *Cancer Sci*. 2012 Mar 1. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02261.x. (査読有り)
- 4: Yamamoto K, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Kawamoto T, Kitayama K, Akiyama K, Osawa T, Kondoh M, Matsuda K, Onodera Y, Fujie M, Kaga K, Hirano S, Shinohara N, Shindoh M, Hida K. Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. *Br J Cancer*. 2012 Mar 13;106(6):1214-23. doi: 10.1038/bjc.2012.59. (査読有り)
- 5: Hida Y, Hamada JI. Differential expressions of matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs and their endogenous inhibitors among histologic subtypes of lung cancers. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Jan 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22263792. (査読有り)
- 6: Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Ishikawa S, Maishi N, Akino T, Kondoh M, Matsuda A, Inoue N, Shindoh M, Hida K. Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am J Pathol*. 2012 Mar;180(3):1283-93. Epub 2012 Jan 13. PubMed PMID: 22245726. (査読有り)
- 7: Ohga N, Ishikawa S, Maishi N, Akiyama K, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Ohmura H, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K. Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol*. 2012 Mar;180(3):1294-307. Epub 2012 Jan 12. PubMed PMID: 22245217. (査読有り)
- 8: Hida K, Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Shindoh M. Altered angiogenesis in the tumor microenvironment. *Pathol Int*. 2011 Nov;61(11):630-7. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02726.x. (査読有り)
- 9: Muraki C, Ohga N, Hida Y, Nishihara H, Kato Y, Tsuchiya K, Matsuda K, Totsuka Y, Shindoh M, Hida K. Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic

- effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. *Int J Cancer*. 2012 Jan 1;130(1):59-70. doi: 10.1002/ijc.25976. (査読有り)
- 10: Kinoshita K, Nakagawa K, Hamada J, Hida Y, Tada M, Kondo S, Moriuchi T. Imatinib mesylate inhibits the proliferation-stimulating effect of human lung cancer-associated stromal fibroblasts on lung cancer cells. *Int J Oncol*. 2010 Oct;37(4):869-77. (査読有り)
- 11: Tsuchiya K, Hida K, Hida Y, Muraki C, Ohga N, Akino T, Kondo T, Miseki T, Nakagawa K, Shindoh M, Harabayashi T, Shinohara N, Nonomura K, Kobayashi M. Adrenomedullin antagonist suppresses tumor formation in renal cell carcinoma through inhibitory effects on tumor endothelial cells and endothelial progenitor mobilization. *Int J Oncol*. 2010 Jun;36(6):1379-86. (査読有り)
- 12: Kajimoto K, Hossen MN, Hida K, Ohga N, Akita H, Hyodo M, Hida Y, Harashima H. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine inguinal and epididymal adipose tissues. *J Immunol Methods*. 2010 May 31;357(1-2):43-50. (査読有り)
- 13: Matsuda K, Ohga N, Hida Y, Muraki C, Tsuchiya K, Kurosu T, Akino T, Shih SC, Totsuka Y, Klagsbrun M, Shindoh M, Hida K. Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 16;394(4):947-54. (査読有り)
1. Yamamoto K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Kitayama K., Akiyama K., Osawa T., Kondoh M., Kaga K., Hirano S., Shinohara N., Shindoh M., Hida K. : Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumor endothelial cells, AACR ANNUAL MEETING 2012, 2012. 4. 2, Chicago, Illinois
2. Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Kawamoto T., Akiyama K., Kitayama K., Kondoh M., Ohsawa T., Yamamoto K., Inoue N., Shindoh M., Hida K. : Analysis of interaction between tumor endothelial cells and tumor cells, AACR 102<sup>nd</sup> ANNUAL MEETING 2011, 2011. 4. 2-6, Orlando, Florida
3. 間石奈湖、大賀則孝、樋田泰浩、大場雄介、浜田淳一、秋山廣輔、山本和幸、大澤崇宏、近藤美弥子、川本泰輔、進藤正信、井上農夫男、樋田京子 : 腫瘍血管内皮細胞とがん転移との相互作用解析、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.5 名古屋国際会議場 (名古屋)
4. 山本和幸、大賀則孝、樋田泰浩、北山和子、間石奈湖、大澤崇宏、川本泰輔、近藤美弥子、秋山廣輔、加賀基知三、平野聡、進藤正信、樋田京子 : 腫瘍血管内皮における Biglycan の機能解析、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3 名古屋国際会議場 (名古屋)
5. 間石奈湖、大賀則孝、樋田泰浩、大場雄介、浜田淳一、秋山廣輔、山本和幸、大澤崇宏、近藤美弥子、川本泰輔、井上農夫男、樋田京子 : 腫瘍血管内皮細胞とがん転移との相互作用解析、第20回日本がん転移学会学術集会・総会、2011.6.30 アクトシティ浜松 (浜松)
6. 間石奈湖、大賀則孝、樋田泰浩、大場雄介、秋山廣輔、北山和子、近藤美弥子、川本泰輔、大澤崇宏、山本和幸、井上農夫男、進藤正信、樋田京子 : Analysis of interaction between tumor endothelial cells and tumor cells, 第18回日本血管生物医学会学術集会、2010.12.1-3 梅田スカイビル (大阪)
7. 間石奈湖、大賀則孝、黒須拓郎、秋山廣輔、石川修平、近藤美弥子、川本泰輔、樋田泰浩、井上農夫男、樋田京子 : 腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞との相互作用解析、第19回日本がん転移学会学術集会・総会 2010.6.16-17 金沢市文化ホール (金沢)

[学会発表] (計7件)

〔図書〕（計1件）

1. 樋田京子：佐藤靖史、森田育男、高倉伸幸、小室一成監修、日本血管生物医学学会編「血管生物医学事典」、  
“Vascular mimicry”、“腫瘍血管内皮細胞”、朝倉書店、206-209、2011（分担執筆）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/vascular-biology/publications.html>

## 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・講師  
研究者番号：30399919

### (2) 研究分担者

樋田 京子 (HIDA KYOKO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教授  
研究者番号：40399952

近藤 哲 (KONDO SATOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30215454  
(H22 まで研究分担者として参画)

### (3) 連携研究者

なし