

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590349

研究課題名(和文)高転移性ルイス肺癌細胞株が類洞様腫瘍血管を誘導する分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular basis of the formation of blood vessels with different structures

研究代表者

米倉 秀人(YONEKURA, Hideto)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80240373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：(1)高転移性(H11)および低転移性(P29)ルイス肺癌細胞腫瘍内の血管の性質を解析した結果、高転移性腫瘍でLYVE1陽性のリンパ管内皮様細胞が認められ、DNAマイクロアレイ解析でもLYVE1発現亢進が確認された。またNRP1の発現低下が示された。(2)H11およびP29細胞株から分離したRNAを用いたDNAマイクロアレイ解析の結果、H11で発現上昇している遺伝子が約15種、発現低下している遺伝子が約10種同定された。(3)発現差が大きくかつ分泌性の蛋白質をコードする遺伝子を選択し、それらに対するshRNAを導入した細胞を作製してマウスに皮下移植し腫瘍内血管の構造を解析した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the molecular basis of the formation of vessels with different structures. (1) LYVE1-positive endothelial cells (ECs) were detected in tumors of high metastatic Lewis lung carcinoma cells (H11), but not in low metastatic cell (P29) tumors. (2) DNA microarray analyses using RNAs isolated from tumor vessel ECs demonstrated that LYVE1 expression was up-regulated in ECs in H11 tumor whereas NRP1 expression was down-regulated. These results suggested that H11 cells can induce lymphatic-like vessels in their tumors. (3) Expression profile analyses of H11 and P29 cells identified 15 up-regulated and 10 down-regulated genes in H11 cells. (4) We selected genes that encode secretory proteins and constructed lentiviral vectors expressing shRNAs against the candidate genes. We then prepared tumor cells expressing the shRNAs, transplanted the cells to mice, and analyzed the formation of tumors and their vessels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：腫瘍血管新生 腫瘍転移 血管内皮細胞 DNAマイクロアレイ ルイス肺癌細胞 リンパ管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

血管形成・新生は組織の発生・維持に必須であるだけでなく、がん増殖・転移、糖尿病血管合併症、虚血性疾患など多くの疾患の発生や進展に深く関わっている。したがって、血管形成の制御機構の解明とその人工的制御技術の開発は、成人病の克服という世界的医学課題を解決するうえで極めて重要である。血管内皮増殖因子(VEGF)の発見以来、血管形成・新生の研究の進展は目覚ましく、再生医療における血管新生の誘導法の開発や抗がんの戦略としての血管新生抑制法の開発など血管新生の人工的制御の研究が精力的に進められてきた。しかしながら、それらは最初の期待ほどは成功しているとは言い難く、その理由として、血管新生の制御の機構は思ったより複雑で、未解明の部分がまだ多く存在するということが再認識されてきた(J. Cell. Mol. Med. 11:374-382, 2007)。たとえば、組織ごとに血管の微細構造が異なり(例えば、肝臓の類洞様血管、腎臓の有窓型血管)、これがどういう分子基盤の上に決定されているかはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、血管微細構造形成の決定機構を明らかにするため、構造の異なる腫瘍血管を誘導する転移性の異なるがん細胞株が分泌する因子群を包括的に明らかにするとともに、それら因子群に应答して血管内皮細胞が異なった微細構造を形成するために働く内皮細胞側の遺伝子群を明らかにすることを目的とした。

具体的には以下のように、異なった構造をもつ血管が誘導される分子メカニズムを解析した。

(1) マウスLewis肺癌由来高転移性と低転移性がん細胞の腫瘍組織内に誘導された腫瘍血管の性質の差を明らかにするとともに、それぞれ血管内皮細胞を分離して遺伝子発現の差を明らかにし、両者の血管構造形成を行う内皮細胞側の遺伝子(群)を同定する。

(2) 高転移性細胞と低転移性細胞で発現に差のある血管形成関連因子(群)を分泌性の因子に焦点を当てて明らかにする。

(3) 高転移性と低転移性のがん細胞間で発現に差のあった血管形成関連因子(群)が異なった構造を持つ血管の形成を誘導することを検証する。

(4) 上記で重要性が示された因子・遺伝子につき、正常血管ネットワーク形成における機能を検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

低転移性(P29)と高転移性(H11)マウスLewis肺癌由来細胞株は、マウス個体で100回ちかい移植・転移腫瘍形成を経て、自然転移能の違いに基づき確立された細胞株である

(Lab. Invest. 70:324-332, 1994; J. Biol. Chem. 283: 34294-34304, 2008)。低転移性細胞(P29)と高転移性細胞(H11)の腫瘍血管には明らかな違いがあり、低転移性細胞は典型的な連続性毛細血管を腫瘍内に誘導するのに対し、高転移性細胞は類洞様の血管形成を誘導する(図1)。

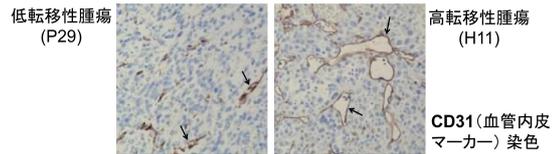


図1 高転移性(H11)および低転移性(P29) Lewis肺癌細胞一次腫瘍内の血管染色(CD31)。

(2) 一次腫瘍の形成と転移能解析

がん細胞(2×10^5 個)を皮下移植し、10日後に腫瘍を摘出してホルムアルデヒドで固定後、凍結切片を作成した。転移能は肺への転移数を計測した。腫瘍内血管は抗CD31抗体で染色し血管形成を解析した。

(3) in vitro 血管新生解析

in vitro 血管新生解析は、マトリゲル上での管腔形成解析系(tube formation assay)および3Dコラーゲン内血管新生解析系(3D collagen angiogenesis assay)を用いた。

(4) 免疫組織化学解析

一次腫瘍を固定後、凍結切片を作成し血管関連分子、リンパ管マーカー(LYVE1)、マトリックス分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

(5) 腫瘍血管内皮細胞の分離

腫瘍移植後10日の一次腫瘍を摘出し5mm前後に細切後、PBSで洗浄し、Collagenase/Dispaseにより分散し、抗CD45抗体ビーズで白血球を除いた後、抗CD31抗体ビーズを用いたMACSカラムで血管内皮細胞を分離した。溶出したCD31陽性画分細胞を再度CD31抗体によりMACSカラムにかけ、純度の高い血管内皮細胞画分を得た。

(6) RNA分離とDNAマイクロアレイ解析

がん細胞および腫瘍組織由来血管内皮細胞からのtotal RNAの分離はQIAGEN RNeasy kitを使用した。100ngのtotal RNAを用いてAffymetrix Gene 1.0stマイクロアレイで遺伝子の発現プロファイルを解析し、Ingenuity IPAソフトウェアを用いて発現の変化した遺伝子群および既知のパスウェイとの関連性を探索し、候補遺伝子を絞り込んだ。マイクロRNAの解析は上記Affymetrix Gene 1.0stアレイに載っている代表的なものについて解析した。

(7) レンチウイルスベクターの構築とノック

ダウン細胞の作製

上記マイクロアレイ解析で発現上昇していた候補遺伝子のうち、分泌蛋白質をコードする遺伝子を選択し、それらをノックダウンするshRNA 配列を組み込んだレンチウイルスを作成した。それら shRNA 配列を高転移細胞に導入した安定株を樹立して、該当遺伝子の腫瘍血管形成への影響を解析した。

(8) マウス ES 細胞を用いた embryoid body(EB)血管内皮細胞分化解析

ES 細胞を LIF を含まない培養液中で hanging drop 培養法により EB を形成させ、それらを血管誘導因子存在下およびそれぞれの腫瘍のコンディショントメディウム存在下で培養し各種分化マーカーの発現を qPCR で解析した。また EB から分化した血管形態を免疫組織染色により検討した。

4. 研究成果

(1) 高転移性(H11)と低転移性(P29)ルイス肺がん細胞腫瘍内の血管内皮細胞の性質の差の解明

ルイス肺がん由来高転移性細胞株と低転移性細胞株を入手し、マウスに移植・転移腫瘍形成を行い、高転移性細胞の再度のセレクションを行うとともに転移能を確認した。

一次腫瘍血管の違いを、特にマトリックスマルタンを中心に免疫染色により比較した。その結果、腫瘍の血管基底膜にラミニンの存在する比率が低転移性腫瘍では 20%以下であったのに対して高転移性腫瘍では 85%以上であり、高転移性腫瘍内に形成された血管基底膜はラミニンの豊富な血管内皮基底膜を形成していた。このことから高低転移性および低転移性腫瘍内に誘導された血管内皮細胞はそれぞれ種類が違ふと考えられた。また、高転移腫瘍内の一部の血管は肝臓類洞マーカーとして知られる LYVE1 の発現が認められた(図2)。類洞マーカーの LYVE1 はリンパ管マーカーとしても知られており、高転移腫瘍がリンパ管を引き込む活性が高いか、もしくは高転移性腫瘍の分泌する成分が血管内皮前駆細胞をリンパ管様内皮細胞に分化させている可能性が考えられた。

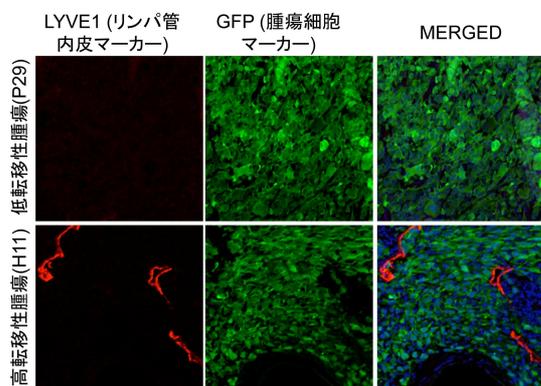


図2 高転移性(H11)および低転移性(P29)ルイス肺がん細胞一次腫瘍の LYVE1 染色。

高転移性細胞株と低転移性細胞株をマウスに移植して形成させた腫瘍組織それぞれから、血管内皮細胞を分離する条件を確立した。

高転移性および低転移性腫瘍内の血管内皮細胞を単離し、両者の性質の差を明らかにした。高転移性および低転移性一次腫瘍内から CD31陽性の血管内皮細胞を MACS で分離し、マイクロアレイで遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、リンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE1 の発現が高転移性腫瘍血管で低転移性腫瘍血管と比べて約4倍高いことが示された。また、高転移性腫瘍血管では VEGF 受容体の一つである NRP1 の発現が低下していた。さらに、血管新生に関与することが多く報告されている micro RNA である miR-17-92 クラスターの発現が著しく高いことが明らかとなった。

マウス ES 細胞を用いた embryoid body (EB) 血管内皮細胞分化系を用いてそれぞれの腫瘍細胞の分泌する因子が血管内皮細胞をリンパ管様内皮細胞に分化させるのかを検討した結果、高転移性がん細胞の conditioned medium (CM) は低転移性がん細胞のそれと比較して、血管(管腔)形成誘導能は低いが、ES 細胞に対する LYVE1 の発現誘導能が顕著に高く、高転移性がん細胞の分泌する因子群は血管前駆細胞へのリンパ管内皮への分化誘導能が高い可能性が示された。

(2) 高転移性(H11)と低転移性(P29)ルイス肺がん細胞株で発現に差のある血管形成関連因子(群)の解明

高転移性株と低転移性株をマウスに移植後の腫瘍組織形成に伴う腫瘍血管の微細構造の経時的な形成過程を明らかにした。

コラーゲンゲル中での in vitro 血管新生への高転移性細胞と低転移性細胞の conditioned medium (CM) の影響を解析したところ、高転移性細胞の CM がより促進的な傾向を示した。

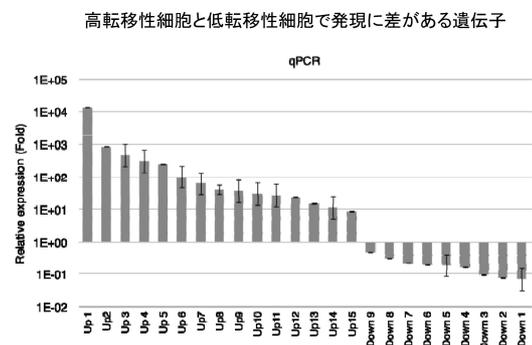


図3 低転移性細胞(P29)と比較して高転移性細胞(H11)で発現量が高い遺伝子(Up)と低い遺伝子(Down)を示した。

高転移性細胞株(H11)と低転移性細胞株(P29)からそれぞれ RNA を分離し、DNA ミ

クロアレイ法を用いて、両者で発現に差のある血管形成関連因子を解析した。その結果、高転移性がん細胞株で発現が上昇している遺伝子が約 15 種、発現が低下している遺伝子が約 10 種同定され、定量 PCR でそれらの発現を確認した (図 3)。

で同定した因子群の中から特に発現量の差が大きく、かつ分泌性のタンパク質をコードする候補遺伝子を選択し、それらの発現を抑制する shRNA を導入したがん細胞を作製した。それぞれの細胞をマウスに皮下移植して腫瘍内血管の微細構造を解析した。現在定量的解析を継続している。

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 9 件)

Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, Yonekura H, Ueda Y, Kaneuji A, Matsumoto T. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. *Med. Mol. Morphol.* 査読有 印刷中, 2014 May 13. [Epub ahead of print]

Munesue S, Yamamoto Y, Urushihara R, Inomata K, Saito H, Motoyoshi S, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H. Low-molecular weight fractions of Japanese soy sauce act as a RAGE antagonist via inhibition of RAGE trafficking to lipid rafts. *Food Funct.* 査読有 4(12):1835-1842 (2013) DOI: 10.1039/c2fo30359k.

Takeuchi A, Yamamoto Y, Munesue S, Harashima A, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Tsuchiya H. Low molecular weight heparin suppresses receptor for advanced glycation end products-mediated expression of malignant phenotype in human fibrosarcoma cells. *Cancer Sci.* 査読有 104(6):740-749 (2013). DOI: 10.1111/cas.12133.

Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T, Motoo Y. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. *Int. J. Oncol.* 41(4):1347-1357 (2012) DOI: 10.3892/ijco.2012.1550.

Ikeda T, Takasawa S, Noguchi N, Nata K, Yamauchi A, Takahashi I, Yoshikawa T, Sugawara A, Yonekura H, Okamoto H. Identification of a major enzyme for the synthesis and hydrolysis of cyclic

ADP-ribose in amphibian cells and evolutionary conservation of the enzyme from human to invertebrate. *Mol. Cell. Biochem.* 366(1-2):69-80 (2012) DOI: 10.1007/s11010-012-1284-0.

Sugihara T, Munesue S, Yamamoto Y, Sakurai S, Akhter N, Kitamura Y, Shiba K, Watanabe T, Yonekura H, Hayashi Y, Hamada J, Yamamoto H. Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-products Inhibits Amyloid β -42 Uptake into Mouse Brain. *J. Alzheimers Dis.* 査読有 28(3):709-720 (2012) DOI: 10.3233/JAD-2011-110776.

Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N. Suppression of a Neocortical Potassium Channel Activity by Intracellular Amyloid- β and Its Rescue with Homer1a. *J. Neurosci.* 査読有 31(31):11100-11109 (2011) DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6752-10.2011.

Yaguchi H, Ikeda T, Osada H, Yoshitake Y, Sasaki H, Yonekura H. Identification of the COL2A1 Mutation in Patients with Type I Stickler Syndrome Using RNA from Freshly Isolated Peripheral White Blood Cells. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 査読有 15(4):231-237 (2011) DOI: 10.1089/gtmb.2010.0138.

Ikeda T, Sun L, Tsuruoka N, Ishigaki Y, Yoshitomi Y, Yoshitake Y, Yonekura H. Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing. *Biochem. J.* 査読有 436(2):399-407 (2011) DOI: 10.1042/BJ20101490.

[学会発表](計 13 件)

吉富泰央, 池田崇之, 吉竹佳の, 岡山 實, 小栗佳代子, 米倉秀人, 転移能の異なるルイス肺がん細胞株が形成する腫瘍中に誘導される血管の構造の差異の解明、第 86 回 日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

吉富泰央, 池田崇之, 吉竹佳の, 八田稔久, 加藤伸郎, 米倉秀人, 神経-血管相互作用を介した血管ネットワーク形成における JunB の機能、金沢医科大学医学会第 49 回学術集会, 2013 年 7 月 6 日、金沢医科大学(石川県内灘町)

吉竹佳の, 池田崇之, 吉富泰央, 田中一美, 米倉秀人, 毛細血管内皮細胞のマトリゲル上

での管腔形成過程では Epac2 の発現が上昇する。第 85 回日本生化学会大会 福岡(福岡国際会議場、2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市))

池田崇之、吉富泰央、吉竹佳の、米倉秀人、Flt-1 (VEGF 受容体-1) mRNA 選択的 3'端プロセシング機構の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

Yoshitake Y, Ikeda T, Yoshitomi Y, Yonekura H. Increased expression of Epac2 during in vitro tube formation in human microvascular endothelial cells. 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, Sept 4-9, 2012, Sevilla, Spain

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、血管内皮細胞における可溶型 Flt-1 (可溶型 VEGF 受容体-1) mRNA 選択的 3'端プロセシング機構の解析、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012 年 7 月 18-20 日、東北大学 100 周年記念会館川内萩ホール(宮城県仙台市)

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、低酸素状態は mRNA 選択的 3'端プロセシングを介して微小血管内皮細胞の可溶型 VEGF 受容体(可溶型 Flt-1)産生を抑制する、日本生化学会北陸支部第 30 回記念大会、2012 年 5 月 26 日、金沢歌劇座(石川県金沢)

Osada H, Yoshitake Y, Ikeda T, Ishigaki Y, Takata T, Tomosugi N, Kubo E, Sasaki H, Yonekura H. Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells. International Conference on The Lens, Jan 15-20, 2012, Hawaii, USA

吉竹佳の、池田崇之、吉富泰央、石垣 靖人、米倉秀人、Increased expression of Epac2 during in vitro tube formation in human microvascular endothelial cells. 第 34 回日本分子生物学会年会(The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan), 2011 年 12 月 13-16 日、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

吉富泰央、池田崇之、吉竹佳の、加藤伸郎、米倉秀人、神経-血管相互作用により血管で活性化される遺伝子群の同定とその機能解析、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、京都国際会館(京都府京都市)

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、低酸素刺激による微小血管内皮細胞の可溶型 VEGF 受容体(可溶型 Flt-1)産

生の抑制、RNA フロンティアミーティング 2001, 2011 年 8 月 31 日、あいち健康プラザ(愛知県大府市)

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、低酸素刺激による微小血管内皮細胞の可溶型 VEGF 受容体(可溶型 Flt-1)産生の抑制、第 83 回日本生化学会北陸支部会、2011 年 5 月 28 日、金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市)

Ikeda T, Yoshitomi Y, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H. Soluble VEGFR-1 production is down-regulated under hypoxia in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving alternative mRNA 3'-end processing. 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム、2011 年 5 月 25-26 日、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

米倉 秀人 (YONEKURA, Hideto)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80240373

(2)研究分担者

池田 崇之 (IKEDA, Takayuki)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：00374942

吉富 泰央 (YOSHITOMI, Yasuo)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：80399039