

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659930

研究課題名（和文） 腫瘍血管の正常化によるがん転移の制御

研究課題名（英文） Targeting tumor metastasis by normalization of tumor blood vessels

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

がんの血行性転移の初期過程であるがん細胞が血管内皮を通り抜けて血管内に侵入する intravasation のステップが重要において腫瘍血管内皮の特異性が大きく関わっているのではないかという視点から解析を行った。転移能が異なる腫瘍由来 2 種類の血管内皮細胞，正常血管内皮細胞を用いて腫瘍細胞に対する接着，走化性などを解析した。腫瘍血管内皮細胞の中にはがんの転移を促進させる可能性のある細胞があること，ならびにそれらがもつ分子機構の一部を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have isolated two different type of TECs (HM-TEC; isolated from highly metastatic tumor, and LM-TEC; isolated from low metastatic tumor) and found they are different in many aspects. Tumor cells were more attracted and adhesive to HM-TEC in vitro assay. They migrated through the HM-TEC monolayer most among all ECs. To address the question whether TECs contribute to tumor metastasis, low metastatic tumor cells were co-xenografted with each different type of EC (HM-TEC /LM-TEC /NEC) into nude mice. These results suggested that TECs in tumor microenvironment may actively induce tumor metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：腫瘍血管，がん，転移

1. 研究開始当初の背景

癌患者の死亡原因の 9 割は，癌の転移によるもので，転移を防ぐ治療は未だない。口腔癌においても進行度の高い場合，肺，骨，肝臓，脳などに血行性に転移し，きわめて予後不良である。

腫瘍血管新生はがんへの栄養供給だけではなく，がんの転移にも重要な関門の役割を果たしている。

これまで申請者らは正常血管内皮と同じと信じられてきた腫瘍血管内皮細胞の分離と培養に世界に成功した後に，それらが正常血管内皮とは growth factor や薬剤への感受性や遺伝子発現，増殖能，遊走能などが異なることを報告してきた。これまでの研究費によって 3 種の腫瘍血管内皮を正常血管内皮と比較し腫瘍血管内皮に特異的に発現する分子を腫瘍血管内皮マーカーとして同定し

ている。さらに腫瘍血管内皮細胞のうち高転移性腫瘍ならびに低転移性腫瘍から分離された腫瘍血管内皮細胞の間でCXCL12, VEGF-Aなどの発現レベルが異なることを見出している。ひとくちに腫瘍血管内皮といっても腫瘍組織やその性質(転移能など)が異なると、血管内皮の性質も異なることなどを示した(Am J Pathol 2012)。一方、腫瘍血管内皮細胞は腫瘍血管から剥がれ落ち、血管内を循環していることがわれわれをはじめとしたいくつかのグループにより報告されはじめてきた。悪性腫瘍の他臓器転移には腫瘍細胞の血管内侵入が必須であるが、転移巣の形成には血液中を循環する腫瘍細胞が転移先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転移前ニッチ(pre-metastatic niche)が形成されることを見出した(2005 Nature)。

申請者は転移性の腫瘍由来の血管内皮細胞がVEGFR-1を高発現していること、細胞間同士の結合が疎なこと、遊走能が高いこと、さらには細胞走化性因子の発現が亢進していることに着目したことから転移ニッチの形成にも腫瘍血管内皮細胞が関与している可能性を着想した。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍血管内皮細胞ががんの転移を助け、さらには前転移ニッチ形成に関与しているかどうかについて解析し、異常な腫瘍血管を正常化することでがんの転移の制御が可能かどうかを探ることを目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍血管内皮細胞に対するがん細胞走化性の解析

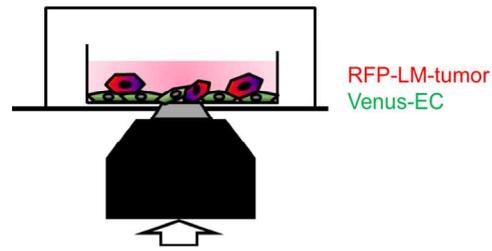
がん細胞の内皮への走化性をボイデンチャンパー下室に高転移腫瘍由来の血管内皮ならびに低転移腫瘍由来の血管内皮細胞または正常血管内皮細胞をまき、上室の口腔がん細胞の遊走性を解析する。

(2) 腫瘍血管内皮細胞に対するがん細胞接着性の解析

腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞をコンフルエントに培養し、そのモノレイヤーに対するがん細胞の接着性を解析する。

(3) がん細胞の血管内皮細胞間隙通過の解析
血管内皮のmonolayerに対するがん細胞の通過性を Transendothelial migration assay

により解析する。

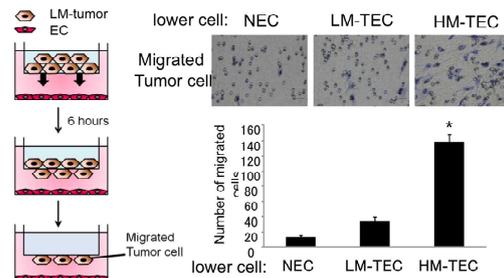


(4) 高転移性腫瘍内の血管内皮に特異的に発現する分子の同定

これまで見出してきた悪性腫瘍由来の血管内皮細胞に発現する腫瘍血管内皮細胞マーカーのうち高転移性腫瘍血管内皮に有意に高い発現をする分子を同定し、siRNAによりノックダウンを行って上記の(1)(2)(3)の結果に対する影響を解析する。

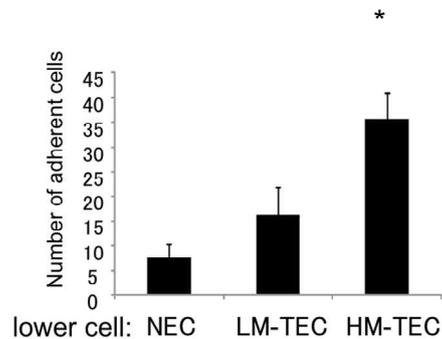
4. 研究成果

(1) 腫瘍血管内皮細胞に対するがん細胞走化性の解析



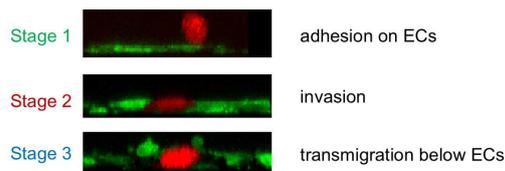
(図1) HM-TEC に対してがん細胞は最も多く遊走した。

(2) 腫瘍血管内皮細胞に対するがん細胞接着性の解析

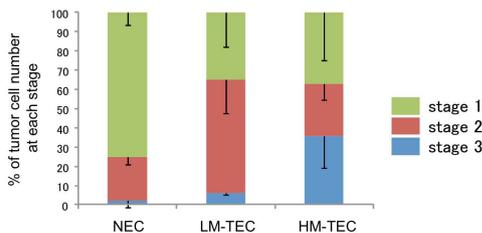


(図2) HM-TEC に対して腫瘍細胞は最も接着した。

(3) がん細胞の血管内皮細胞間隙通過の解析



(図3) 血管内皮(緑)のレイヤーに対してがん細胞(赤)が遊走する状態を3つに分類した。



(図4) HM-TEC のレイヤーの間を最も多くのがん細胞が浸潤通過した。

(4) 高転移性腫瘍内の血管内皮に特異的に発現する分子の同定

HM-TEC において発現が亢進していた分子として Biglycan に着目した。HM-TEC において siRNA を用いて Biglycan のノックダウンしてがん細胞との相互作用を解析した。HM-TEC に対するがん細胞の遊走が抑制されたことから、少なくとも HM-TEC における biglycan はがん細胞にとって走化因子である可能性が示唆され、これらの制御ががん細胞の血管内浸潤を抑えることにつなが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 16 件) *責任著者の論文

- (1) *樋田京子, 太賀則孝, 秋山廣輔, 間石奈湖: 腫瘍血管内皮細胞の異常と癌の悪性化との関連, 日本口腔腫瘍学会誌, 査読有, 24(3), 88-94, 2012
- (2) *樋田京子: がん微小環境と腫瘍血管内皮細胞, “Drug Delivery System”, 特集「基礎から拓く DDS 創薬フロンティア」日本 DDS 学会, 査読有, 27(1), 34-39, 2012

- (3) *樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞の異常性, 「生化学」, 社団法人日本生化学会, 査読有, 84(1), 43-46, 2012
- (4) Naznin Ara., et al. (5 人中 4 番目): Development of a novel DNA aptamer ligand against primary cultured tumor endothelial cells, *PLoS ONE*, 査読有, 7(12), e50174, 2012
DOI: 10.1371/journal.pone.0050174
- (5) Takara K., et al. (7 人中 6 番目): Size-controlled, dual-ligand modified liposomes that target the tumor vasculature show promise for use in drug-resistant cancer therapy, *J Controlled Release*, 査読有, 162(1), 225-232, 2012
DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.019
- (6) Osawa T., Ohga N., Hida Y., Kitayama K., Akiyama K., Onodera Y., Fujie M., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., *Hida K.: Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner, *Cancer Sci*, 査読有, 103(6), 1038-1044, 2012
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02261.x
- (7) 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*, 査読有, 7(3), e34045, 2012
DOI: 10.1371/journal.pone.0034045
- (8) 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*, 査読有, 106, 1214-1223, 2012
DOI: 10.1038/bjc.2012.59
- (9) 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*, 査読有, 62(5), 309-317, 2012
DOI: 10.1111/j.1440-1827.2012.02792.x
- (10) 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 Highly Metastatic and Low Metastatic Tumors, *Am J Pathol*, 査読有, 180(3), 1294-1307, 2012
DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.035
- (11) Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Ishikawa S., Maishi N., Akino T., Kondoh M., Matsuda A., Inoue N., Shindoh M. and *Hida K.: Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 upregulation via VEGF signaling in tumor microenvironment, *Am J Pathol*, 査読有, 180(3), 1283-1293, 2012
DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.029
- (12) *Hida K., et al. Altered angiogenesis in the tumor microenvironment, *Pathol Int*, 査読有, 61(11), 630-637, 2011
DOI:10.1111/j.1440-1827.2011.02726.x
- (13) Kibria G., et al. (5 人中 4 番目): Dual-ligand modification of PEGylated liposomes shows better cell selectivity and efficient gene delivery, *J Controlled Release*, 査読有, 153(2), 141-148, 2011
DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.03.012
- (14) Muraki C., Ohga N., Hida Y., Nishihara H., Kato Y., Tsuchiya K., Matsuda K., Totsuka Y., Shindoh M. and *Hida K.: Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells, *Int J Cancer*, 査読有, 130, 59-70, 2011
DOI: 10.1002/ijc.25976
- (15) Kurosu T., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Akiyama K., Kakuguchi W., Kuroshima T., Kondo M., Akino T., Totsuka Y., Shindoh M., Higashino F. and *Hida K.: HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing RNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium, *Br J Cancer*, 査読有, 104(5), 819-829, 2011
DOI: 10.1038/bjc.2011.20
- (16) Nitta Y., et al. (7 人中 2 番目): Phenotype of tumor lymphatic vessels is a prognostic factor in human tongue squamous cell carcinoma, *Oncol Lett*, 査読有, 2(1), 79-83, 2011
DOI: 10.3892/ol.2010.201
- [学会発表] (計 69 件)
[招待講演] (12 件)
- (1) 樋田京子: Recent Advance in Tumor Angiogenesis 2011, “腫瘍血管の多様性とがんの転移”, 2011.12.3, グランドホテル浜松 (浜松市)
- (2) 樋田京子: 函館 Basic Cancer Forum, “腫瘍血管新生阻害療法における新たな局面 -Lesson from Basic research” , 2011.11.24, ベルクラシック函館 (函館市)
- (3) 樋田京子: 平成 23 年度遺伝子病制御研究所共同研究集会, 「がん細胞・組織の多様性の出現・維持に関わる微小環境因子」, “腫瘍血管内皮細胞の異常性がもたらすがん治療への影響”, 2011.9.6, 北海道大学医学部フラテ会館 (札幌市)
- (4) 樋田京子: 大阪歯科大学大学院 50 周年記念講演会, “腫瘍血管特異性の解明と新たな血管新生阻害療法への応用”, 2011.9.2, 大阪歯科大学楠葉学舎 (大阪府枚方市)
- (5) Hida K.: “A New Insights into Tumor endothelial cell”, The 5th Meeting of Asian Society of Oral and Maxillofacial Pathology, 2011.8.24, 九州大学医学部百年講堂 (Fukuoka, Japan)
- (6) 樋田京子: 第 63 回日本細胞生物学会大会, 「血管の多様性～組織発生から疾患におけるダイナミクス」, “Heterogeneity of Tumor Endothelium and Drug Resistance” 2011.6.29, 北海道大学クラーク会館、学術交流会館 (札幌)
- (7) 樋田京子: ACCEL in Hokkaido～NSCLC に対するアバスチンの治療戦略～, “腫瘍血管内皮細胞の特異性とその制御”, 2011.6.18, アートホテルズ札幌 (札幌市)
- (8) 樋田京子: 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, “腫瘍血管内皮細胞の多様な生物像”, 2011.6.9, 東京大学本郷キャンパス (東京)
- (9) 樋田京子: 高知大学医学部歯科口腔外科学講座セミナー, “がん組織における血管の特異性の解明と新たな血管新生阻害療法への応用”, 2011.6.3, 高知大学岡豊キャンパス (高知県南国市)
- (10) 樋田京子: 第 100 回日本病理学会総会コンパニオンミーティング 4 「口腔癌の浸潤: 外科病理と分子病理の架け橋」, “癌間質の異常, とくに腫瘍血管の特性と浸潤との関連性”, 2011.5.1, 東京大学 (東京都) (震災のため中止, 誌上发表)
- (11) 樋田京子: 第 9 回口腔医学科学フロンティア学術集会, がん微小環境内における腫

瘍-血管の相互作用, 2011.3.5, 九州大学 (福岡市)

- (12) 樋田京子: The 8th Annual Meeting for the Japanese Association for Cancer and Hypoxia Research, “低酸素環境における腫瘍血管ダイナミクス”, 2011.1.29-30, 北海道大学 (札幌)

その他国際学会 16 件、国内学会 41 件

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 樋田京子: 「Vascular mimicry」 佐藤靖史, 森田育男, 高倉伸幸, 小室一成監修, 日本血管生物医学会編「血管生物医学事典」朝倉書店 206-207 頁 2011 (分担執筆)
- (2) 樋田京子: 「腫瘍血管内皮細胞」 佐藤靖史, 森田育男, 高倉伸幸, 小室一成監修, 日本血管生物医学会編「血管生物医学事典」, 朝倉書店, 208-209 頁 2011 (分担執筆)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

(1) 名称: トロポニン T と結合する DNA, これを用いた腫瘍組織における血管新生および/または脈管形成抑制剤ならびにこれを用いた細胞内へ目的物質が取り込まれることを促進する剤

発明者: アラ ナズニン, 兵藤守, 畠山浩人, 樋田京子, 大賀則孝, 原島秀吉

権利者: 同上

種類: 特許出願

番号: 2012-124073

出願年月日: 2012 年 6 月 21 日

国内外の別: 国内

(2) 名称: 腫瘍血管新生阻害剤

発明者: 樋田京子, 樋田泰浩

権利者: 北海道大学

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2011/056639

出願年月日: 2011 年 3 月 18 日

国内外の別: 外国

(3) 名称: 腫瘍血管新生阻害剤

発明者: 樋田京子, 樋田泰浩

権利者: 北海道大学

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2011/056631

出願年月日: 2011 年 3 月 18 日

国内外の別: 外国

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 20162802

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

大賀 則孝 (OHGA NORITAKA)

北海道大学・大学院歯学研究科・特任助教
研究者番号: 40548202

(3) 連携研究者

研究者番号: