

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792096

研究課題名(和文)低酸素環境における腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得機序に関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanisms involved in acquired abnormalities of tumor endothelial cells under hypoxic environment

研究代表者

北山 和子(KITAYAMA, Kazuko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：10515068

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素、がん細胞と間葉系幹細胞の培養上清、間葉系幹細胞用の無血清培地(STK)を組み合わせた条件で正常血管内皮細胞が異常増殖する細胞培養モデルを構築し腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得を理解しようと試みたが安定した培養系が確立できなかった。

一方、血管内皮細胞用培地(EGM2)とSTK培地中の共通因子が、間葉系幹細胞や線維芽細胞では表面糖脂質糖鎖発現を責任糖転移酵素遺伝子発現レベルで変化させるが血管内皮細胞では影響しないことを発見した。この結果より無血清培養条件(STK)で血管内皮細胞の接着性が不安定な理由の一つに糖脂質糖鎖発現の違いがあると示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand molecular mechanisms involved in acquired abnormalities of tumor vascular endothelial cells under hypoxic condition, I tried to set up a cell culture system that normal vascular endothelial cells grow malignantly in serum free STK medium, that was established for mesenchymal cells such as mesenchymal stem cells and fibroblasts, in combination with tumor cell culture conditioned medium and CoCl₂. However, I failed to set up a reproducible cell culture system because of unstable cell adhesion.

On the other hand, when I cultured the mesenchymal cells with medium for endothelial cells (EGM2), I found that EGM2 contained a common factor with STK that affected glycosphingolipid biosynthesis in mesenchymal cells but not in endothelial cells under responsible glycosyltransferase gene expression. These results suggested that different regulation of glycosphingolipid glycan expression is one of a reasons why endothelial cell adhesion under serum free STK medium was unstable.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：血管内皮細胞 間葉系幹細胞 無血清培地 糖脂質糖鎖

1. 研究開始当初の背景

1) 腫瘍組織はがん細胞、線維芽細胞、間葉系幹細胞などの間葉系細胞、マクロファージ、血管などから構成され低酸素環境になっている。がん細胞の増殖、細胞死の回避、薬剤抵抗性などの異常性獲得を理解してがんの治療法開発するために腫瘍組織から樹立されたがん細胞株を用いた分子機構解析が進められている。

2) 腫瘍組織でのがん細胞の増殖には腫瘍血管新生がともなう。がん細胞の増殖阻止のために腫瘍血管新生を阻止する薬剤開発が進められたが、完全ながん細胞消失は困難で正常血管にも作用し副作用やがんの転移誘導する可能性が出てきた。この背景には腫瘍血管と正常血管が同様の性質を持つという概念から正常血管内皮細胞を用いた血管新生阻害剤が開発された事実がある。

3) 腫瘍組織から樹立された腫瘍血管血管内皮細胞は正常組織より樹立された正常血管内皮細胞とは異なった異常性を獲得していることを示唆する表現型(染色体異常、増殖、遊走の亢進、薬剤抵抗性)などが観察されていた。そして通常酸素分圧下で培養したマウス腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の網羅的遺伝子発現解析によって腫瘍血管内皮細胞マーカー候補遺伝子がマイクロアレイによる網羅的解析より見出されている。

4) しかし腫瘍組織で見られるような低酸素、貧栄養な状況で、腫瘍血管内皮細胞がどのように異常性を獲得していくかの機序は不明であった。

2. 研究の目的

1) 腫瘍血管内皮細胞の異常性の獲得機序と低酸素環境との関係を説明できる現象を培養細胞の系をもちいて確立する。

2) 確立した培養系において腫瘍血管内皮細胞に発現があり正常血管内皮細胞では発現のないマーカー候補遺伝子の探索、候補遺伝子の発現機序などを探索し異常性獲得の分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

当初の計画

正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞を通常血管内皮培養条件、低栄養、低酸素条件、がん細胞培養上清などの添加によって表現型を比較し、正常血管内皮細胞と表現型に差異が出る培養条件を検討・確立して遺伝子発現の網羅的解析による比較を行なう予定であった。

しかし研究代表者本人の北海道大学失職・異動にともない、当初の研究協力基盤を失ったため腫瘍血管内皮細胞を用いた研究

が不可能になり(正常血管内皮細胞のみ利用可能)計画を変更した。

変更後の研究方法

上皮細胞由来のがん細胞が腫瘍組織内に隣接する間葉系細胞から影響を受けてその性質を変化させることが知られている。正常血管内皮細胞が異常性を獲得し腫瘍血管内皮細胞に変化する時にも同様に間葉系細胞の性質を獲得すると仮定し、正常血管内皮細胞を間葉系細胞培養条件で異常増殖させる培養系と血管内皮細胞遺伝子発現を検討する。

1) 間葉系幹細胞や線維芽細胞増殖に適した無血清培地(STK 文献参照)をもちいてヒト正常血管内皮細胞(HUVEC, HMVEC)の増殖が亢進する培養条件の探索。

がん細胞株(A2058, GAK, KON, HSC1)の培養上清の添加
間葉系細胞(STK 培養)培養上清添加
CoCl₂の添加

2) 血清培養および無血清培養した間葉系幹細胞や線維芽細胞にて発現が高い遺伝子の血管内皮細胞での発現解析

3) 間葉系幹細胞の血管内皮培地での培養と遺伝子発現の変化

4. 研究成果

1) 血管内皮細胞異常性の獲得など細胞特性を知るために、組成の明らかな無血清培地を利用した培養系の確立ができたなら遺伝子発現解析ほか分泌タンパク、高分子などを網羅的に解析できる利点がある。そこで血管内皮細胞血清培地(EGM2, EGM2MV)で増殖したHUVEC, HMVECを継代の際基礎培地DMEM洗浄後間葉系細胞培地STKにて培養した。KON培養上清、CoCl₂、骨髄間葉系幹細胞無血清培養上清を添加した際に一過的に細胞増殖傾向が確認されたが、血管内皮細胞の培養皿への接着が維持されず、異常増殖する系は確立できなかった(図1参照)。血管内皮細胞は間葉系細胞(骨髄間葉系幹細胞や線維芽細胞)に最適化された無血清培地ではこれらの細胞とはことなる細胞接着性を持つことが明らかになった。

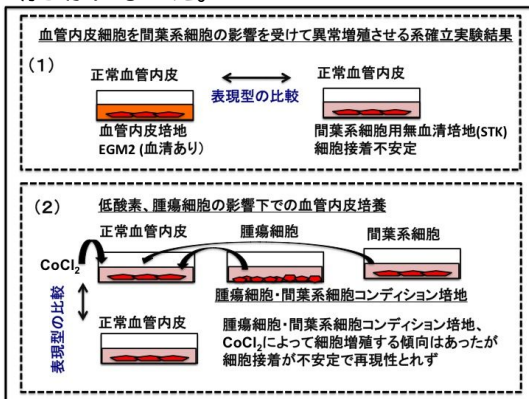


図1 血管内皮細胞はSTK 培養条件で間葉系細胞とは異なった細胞表面分子発現があると示唆される

2) 血清培養、無血清培養のいずれでも間葉系細胞に発現が認められるマーカー候補4遺伝子は血清培養した血管内皮細胞での遺伝子発現は有意に低かった。

3) 間葉系細胞を無血清培養 (STK 培地) するとコントロールの血清培養 (10% ウシ胎仔血清-DMEM) 培養時と糖脂質糖鎖発現が責任糖転移酵素 (X) の遺伝子発現レベルで変化することが別の研究で明らかになった。間葉系細胞を血管内皮培地 (EGM2) 培養した際に、酵素 (X) の遺伝子発現が STK 培養と同様に变化した (図2、図4-1 参照)。この結果は STK 培地と EGM2 培地に共通に含まれる因子 (Y) が酵素 (X) の遺伝子発現を誘導することの発見に貢献した。

4) 血管内皮細胞を EGM2 培地、10%血清 STK 培地、コントロール 10%血清 DMEM 培地およびコントロール培地に因子 Y 添加条件で培養したときの酵素 (X) の遺伝子発現に有意な差がなかったことから (図3、図4-2 参照) 血管内皮細胞の糖脂質糖鎖の生合成と発現は間葉系細胞と異なっていることが示唆された。

これらの結果から、間葉系細胞に適した無血清培地をベースにした血管内皮細胞の接着性の不安定性の理由の一つとして細胞表面の糖脂質糖鎖の発現に違いがあることが示唆された。

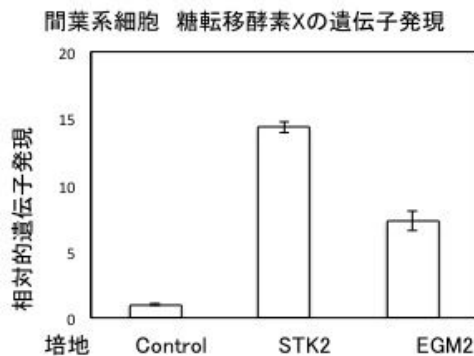


図2 間葉系細胞はSTK2 とEGM2中の共通の因子に酵素 X の遺伝子発現を誘導する。

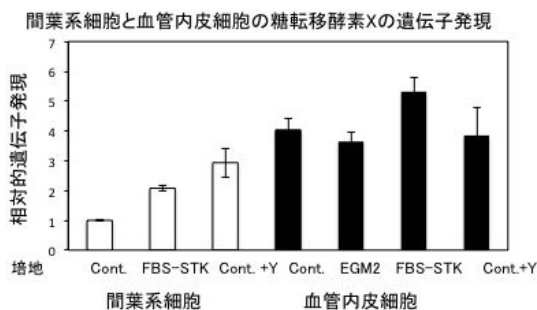


図3 間葉系細胞はSTK, EGM2中の共通因子Yによって酵素 X の遺伝子発現が誘導されるが、血管内皮細胞では因子 Y の有無による酵素 X の遺伝子発現に影響がない。

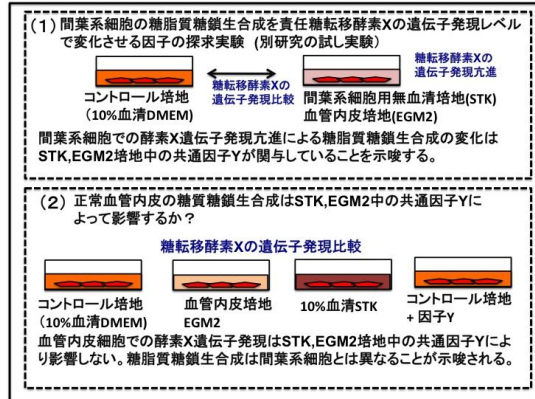


図4 間葉系細胞と血管内皮細胞では糖脂質糖鎖生合成が異なっていることが予想できる。

まとめ

間葉系細胞に適した無血清培地をもちいて正常血管内皮細胞を間葉系細胞の性質を獲得させ異常増殖させる培養系確立には失敗し腫瘍血管内皮細胞に特異的な遺伝子マーカーの発見はできなかった。しかし血管内皮培地を用いた間葉系細胞培養は間葉系細胞の糖脂質糖鎖生合成の制御に関わる因子の発見につながった。現在この研究結果について論文投稿準備中。

上皮細胞由来のがん細胞株が間葉系細胞の形質を獲得して変性するときに、糖脂質糖鎖の発現が変化することが知られている。一方、間葉系細胞が本来持つ糖脂質糖鎖発現の生合成の制御に関してはあまり報告がない。よって間葉系細胞の糖脂質糖鎖生合成を変化させる因子の発見はがん細胞の形質変化と糖脂質糖鎖合成の研究のよい対照実験系の提供につながる可能性がある。

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 5 件)

Osawa T., Ohga N., Akiyama K., Hida Y., Kitayama K., Kawamoto T., Yamamoto K., Maishi N., Kondoh M., Onodera Y., Fujie M., Nonomura K., Shindoh M. and Hida K. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis, *Br J Cancer*, 109(8), 2237-2247, 2013, doi:

10.1038/bjc.2013.535(査読あり)
Shibata TK, Matsumura F, Wang P, Yu S, Chou CC, Khoo KH, Kitayama K, Akama TO, Sugihara K, Kanayama N, Kojima-Aikawa K, Seeberger PH, Fukuda M, Suzuki A, Aoki D, Fukuda MN. Identification of mono- and disulfated N-acetyl-lactosaminyl

Oligosaccharide structures as epitopes specifically recognized by humanized monoclonal antibody HMOCC-1 raised against ovarian cancer. J Biol Chem. Feb 24;287(9):6592-602. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.305334 (査読あり)

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. 103(6):1038-44, 2012. Doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02261 (査読あり)

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. 113;106(6):p1214-23, 2012, doi:10.1038/bjc.2012.59 (査読あり)

加藤幸夫、藤井紗貴子、五藤紀子、北山和子、金輪真佐美、河本健、藤本勝巳、邵金昌、桂由紀、潘海鷗、長谷川森一、辻紘一郎、無血清で増幅した間葉系幹細胞と歯髄細胞、広島歯科医学雑誌、39, P1-8, 2011, 査読なし。

〔学会発表〕(計 4 件)

北山和子、無血清培養した間葉系(幹)細胞の遺伝子発現および複合糖質糖鎖の網羅的解析、第98回幹細胞研究会、2014年9月30日、広島大学

大賀則孝、山本和幸、樋田泰浩、秋山廣輔、間石奈湖、川本泰輔、北山和子、大澤崇宏、平野聡、篠原信雄、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7回日本癌学会学術総会、2012/9/19 札幌

秋山廣輔、大澤崇宏、大賀則孝、樋田泰浩、北山和子、川本泰輔、山本和幸、間石奈湖、近藤美弥子、篠原信雄、野々村克也、進藤正信、樋田京子、The role of Lysyl oxidase on proangiogenic

phenotypes of tumor endothelial cells. 第7回日本癌学会学術総会、2012/9/19 札幌

Enhanced proliferation of Stem Cells from Deciduous Teeth in Serum-free Media: STK1/STK2, Noriko Gotoh, Katsumi Fujimoto, Shin-ichi Hasegawa, Kazuko Kitayama, Veronica Sainik Ronald, Katsuyuki Kozai, Yukio Kato. 8th Biennial Conference PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia), Bali, Indonesia, May 24-26, 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北山 和子 (KITAYAMA Kazuko)
広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教
研究者番号：10515068

(4) 研究協力者

加藤 幸夫 (KATO Yukio)
広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員

原 真依子 (HARA Maiko)
株式会社ツーセル 開発部・社員