

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792306

研究課題名(和文)がんの転移能と腫瘍血管内皮細胞の異常性との関連

研究課題名(英文)Relationship between metastasis of cancer and abnormality of tumor endothelial cell

研究代表者

大賀 則孝(Noritaka, Ohga)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40548202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：がん栄養を送る腫瘍血管の内皮細胞を攻撃する治療法が近年実用化されました。しかしその効果はがんによって異なっており、私たちは腫瘍血管内皮細胞のなかには特殊な性質を獲得しているものがあるのではないかと考えました。

今回の研究では、転移能の異なる腫瘍から分離・培養された腫瘍の血管の性質を比較しました。転移能が高いがんの血管内皮細胞はより高い増殖能や遊走能を有し、血管内皮増殖因子やその受容体の発現が高いこと、さらに薬剤抵抗性や自己複製能が高い幹細胞の性質をもつものがあることを見出しました。つまり転移能の高いがんの中の血管内皮細胞は高い血管新生能や薬剤抵抗性を獲得していることが明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：It is an important concept of tumor angiogenesis that tumor endothelial cells (TEC) are genetically normal and homogeneous. However, we had previously reported that TEC differ from normal endothelial cells (NEC). Whether the characteristics of TEC derived from different tumors differ remains unknown. To elucidate this, we isolated two types of TEC from highly metastatic tumor and low metastatic tumor and compared their characteristics. High metastatic tumor-derived TEC (HM-TEC) showed higher proliferative activity and invasive activity than low metastatic tumor-derived TEC (LM-TEC). Moreover, the mRNA expression levels of proangiogenic genes, such as VEGF-R1 and 2, VEGF and hypoxia (HIF-1) were higher in HM-TEC compared with those in LM-TEC. Furthermore, HM-TEC showed higher mRNA expression levels of the stemness-related genes compared with LM-TEC. These results indicate that TEC from high metastatic tumors have developed more abnormality than those from low metastatic tumors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：腫瘍血管新生 転移 多様性 薬剤抵抗性 幹細胞性

1. 研究開始当初の背景

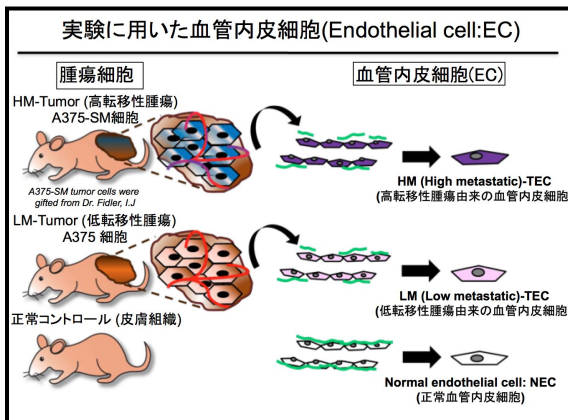
癌患者の死亡原因の9割は、癌の転移によるもので、転移を防ぐ治療は未だない。口腔癌においても進行度の高い場合、肺、骨、肝臓、脳などに血行性に転移し、きわめて予後不良である。腫瘍血管をたたき、癌を兵糧攻めにする血管新生阻害療法として、20年に血管内皮増殖因子 VEGF のヒト化中和抗体である世界初の血管新生阻害剤(ベマシツマブ)が認可された。しかし、この血管新生阻害剤は正常血管内皮細胞を用いて開発され、延命効果は半年程度で、副作用の問題がある。これまでに申請者の所属する研究グループは舌癌由来をはじめとして、4種の腫瘍血管内皮の分離・長期培養に成功し、腫瘍血管内皮が正常血管内皮と比べて、染色体の異常や特異遺伝子の発現など様々な点で異なることを報告してきた (Hida.K et al Cancer Res 2004, 2005, Cancer Sci, 2008, Ohga.N, Hida Ket al Cancer Sci 2009, Biochem Biophys Res Commun 2010)。

2. 研究の目的

腫瘍血管内皮の多様性が癌の進展、転移の形成にどのように関わるかを調べるために、転移能の異なる高転移性腫瘍と低転移性腫瘍モデルに着目した。本研究はまだ解明されていない転移能の異なる腫瘍血管内皮の性質の違いを明らかにし、腫瘍血管内皮細胞の多様性が癌の進展や転移の形成にどのように関わりうるかを明らかにすることである。具体的にはそれぞれの腫瘍から分離された高転移性腫瘍由来血管内皮と低転移性腫瘍由来血管内皮の性質の違いを検討し、腫瘍血管内皮細胞の多様性が癌の進展や転移の形成にどのように関わりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

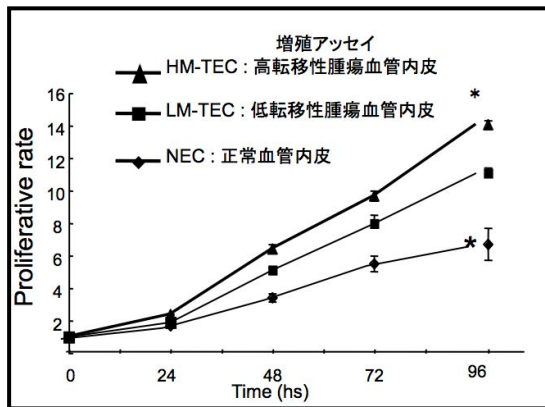
低転移性ヒト腫瘍細胞と高転移性ヒト腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、それぞれの腫瘍塊から、高転移性腫瘍由来血管内皮と低転移性腫瘍由来血管内皮を分離・培養し、その生物学的特性を比較・解析した。



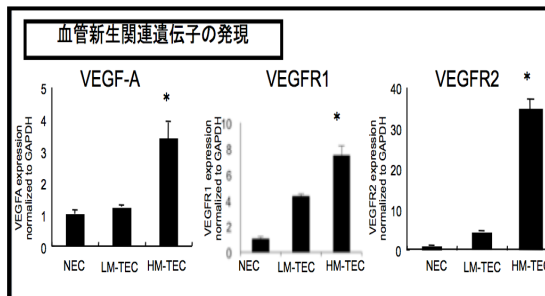
4. 研究成果

(成果 1)

低転移性腫瘍由来血管内皮に比べ、高転移性腫瘍由来血管内皮は増殖能及び遊走能が高く、また血管新生関連遺伝子である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor: 血管内皮増殖因子), VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor receptor-1, 2), Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) などの遺伝子発現が高いことがわかった。



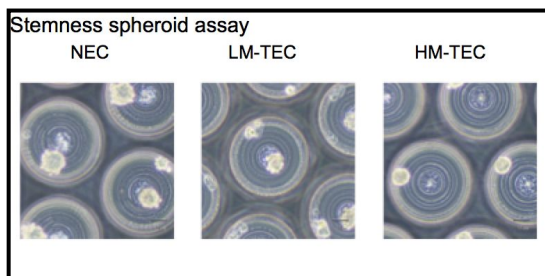
(上図の説明)高転移性腫瘍血管内皮細胞は、低転移性腫瘍血管内皮細胞に比べ、増殖能が高いことがわかった。



(上図の説明)高転移性腫瘍血管内皮細胞は、低転移性腫瘍血管内皮細胞に比べ、血管新生関連遺伝子の発現が高いことがわかった。

(成果 2)

高転移性腫瘍由来血管内皮細胞は幹細胞マーカー、Stem cell antigen-1 (Sca-1), CD90 の遺伝子発現が亢進しており、さらに骨への分化や3次元培養におけるスフェロイド形成といった幹細胞性を有していることがわかった。



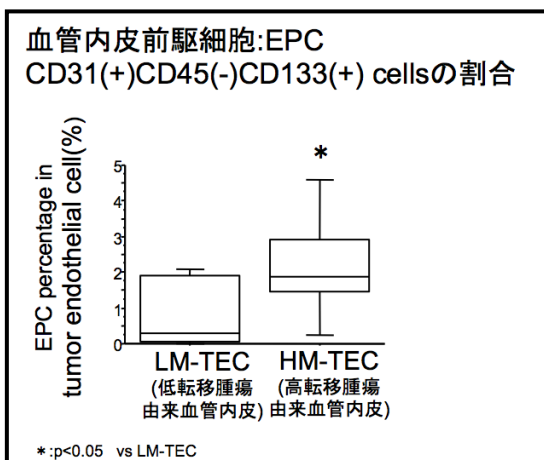
(上図の説明)高転移性腫瘍血管内皮細胞は、低転移性腫瘍血管内皮細胞に比べ、スフェロイドアッセイで、スフェア形成 (sphere) 発している割合が高かった。

(成果 3)

腫瘍血管新生においては、周囲の既存の血管内皮が伸びてくる sprouting に加え、血管内皮前駆細胞 EPC の関与が示唆されている。HM-TEC と LM-TEC における EPC の割合を検討した。EPC は CD31(+)/CD45(-)/CD133(+) 細胞でフローサイトメトリー解析を行った。FACS 解析を行ったところ、HM-TEC では、LM-TEC に比べ EPC の割合は有意に高いことがわかった。

免疫染色でも高転移性腫瘍では、CD133 陽性の腫瘍血管が認められた。

さらに、HM-TEC は幹細胞マーカーである Sca-1 や CD90 の発現が有意に高いことが示され、HM-TEC は幹細胞性の高い血管内皮細胞であることが示唆された。



(成果 4)

がん幹細胞と薬剤抵抗性の間に関連があることが知られている。各血管内皮細胞の薬剤抵抗性について検討した。

HM-TEC はパクリタキセルに対する薬剤抵抗性が NEC や LM-TEC に比較し、有意に高いことがわかった。さらに、薬剤抵抗性に関連する遺伝子である MDR-1 遺伝子の発現をみたところ、HM-TEC で MDR-1 の発現が高い結果が得られた。

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 3 件)

1. Kondoh, M., Ohga, N*, Akiyama, K., Hida, Y., Maishi, N., Alam Mohammad Towfik, Inoue, N., Shindoh, M., Hida, K.

Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormality of endothelial cells in

tumor microenvironment.

PLoS ONE 2013 Nov 15;8(11)e80349 査読有

*: **equally contributed**

2. 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*, 180(3), 1294-1307, 2012 査読有

3. 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*, 180(3), 1283-1293, 2012 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 大賀則孝、石川修平、間石奈湖、秋山廣輔、樋田泰浩、川本泰輔、大村瞳、進藤正信、樋田京子：転移能の異なる腫瘍由来の血管内皮の特性解析、第 23 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2012.8.31 東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂 (東京)
2. 大賀則孝、石川修平、樋田泰浩、秋山廣輔、間石奈湖、川本泰輔、進藤正信、樋田京子：転移能の異なる腫瘍由来の血管内皮の特性解析、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012.7.3 札幌コンベンションセンター (札幌)
3. Ohga, N., Ishikawa S., Maishi N., Akiyama K., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Kondoh M., Ohsawa T., Yamamoto K., Ohmura H., Shindoh M., Hida K. : Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells: Comparison between Tumor Endothelial Cells Isolated from Highly Metastatic and Low Metastatic Tumors, The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, 2011.12.8-10 東京ステーションコンファレンス (Tokyo, Japan)
4. 大賀則孝、石川修平、樋田泰浩、秋山廣輔、間石奈湖、近藤美弥子、川本泰輔、進藤正信、樋田京子：転移能の異なる腫瘍から分離された腫瘍血管内皮細胞の比較解析、腫瘍微小環境における腫瘍血管内皮異常性の獲得、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 2011.10.5 (名古屋)
5. 大賀則孝、石川修平、樋田泰浩、秋山廣輔、間石奈湖、川本泰輔、近藤美弥子、進藤正信、樋田京子：転移能の異

なる腫瘍由来の血管内皮細胞の特性解析、第 91 回北海道医学大会総会（第 104 回北海道癌談話会例会 腫瘍分科会）、2011.9.17 札幌医科大学講堂（札幌）

6. **Ohga N.**, Ishikawa S., Hida Y., Akiyama K., Kitayama K., Kondoh M., Maishi N., Kawamoto T., Ohsawa T., Yamamoto K., Shindoh M., Hida K. : Comparative characterization of tumor endothelial cells isolated from highly and low metastatic tumors, The 5th Meeting of Asian Society of Oral and Maxillofacial Pathology, “ A New Insights into Tumor endothelial cell ”, 2011.8.24 九州大学医学部百年講堂（Fukuoka, Japan）
7. **大賀則孝**、石川修平、樋田泰浩、間石奈湖、川本泰輔、秋山廣輔、近藤美弥子、進藤正信、樋田京子：転移能の異なる腫瘍由来の血管内皮細胞の特性解析、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）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大賀 則孝 (OHGA Noritaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40548202

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし