

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390324

研究課題名(和文) 肺癌血管内皮細胞を標的とした分子標的治療とコンパニオン診断薬の開発

研究課題名(英文) Development of the drugs targeting lung tumor endothelial cells and the companion diagnosis

研究代表者

樋田 泰浩 (Hida, Yasuhiro)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：30399919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：担癌マウスの腫瘍血管内皮細胞、特に転移能の高い腫瘍から分離された腫瘍血管内皮細胞でビグリカンの高発現が顕著であった。siRNAでビグリカンをノックダウンすると、腫瘍細胞の血管内皮細胞の接着や細胞シート下層への浸潤の低下が認められた。マウスの肺転移モデルでは腫瘍血管内皮細胞を共移植すると転移能を持たない腫瘍細胞が転移能を獲得した。これは腫瘍血管内皮細胞におけるビグリカンの発現を抑制するとキャンセルされた。ヒト癌組織の免疫では腫瘍血管に特異的にビグリカンの発現が認められた。血液検体のELISA検査で担癌患者、特に転移陽性例で血清中ビグリカン濃度が高い傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Tumor endothelial cells (TEC) from mouse xenografted tumor, especially that from highly metastatic tumor expresses high level of biglycan. Knock down of biglycan by siRNA suppressed tumor cell invasion thorough endothelial cell sheet. Co-implantation of low metastatic tumor cells with TEC developed lung metastases. This metastatic ability was abandoned by suppression of biglycan expression in TEC. Immunohistochemistry of human clinical tumors revealed specific expression of biglycan in TEC. ELISA of serum showed high biglycan level in cancer patients, especially those with metastasis.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 血管新生 腫瘍血管内皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは腫瘍組織から分離培養した血管内皮細胞のマイクロアレイ解析により、腫瘍内の血管内皮細胞は分泌蛋白であるヒyaluronanを高発現していることを明らかにした。ヒyaluronanは腫瘍血管新生と転移を促進する。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) ヒyaluronanの血管新生・転移促進機序の解明、(2) 肺癌切除検体における腫瘍血管内皮細胞のヒyaluronan発現の検討、(3) 血中ヒyaluronan蛋白と落撒腫瘍血管内皮細胞由来ヒyaluronan mRNA の検出法の最適化、(4) ヒyaluronanを治療標的とするためのコンパニオン診断薬(ヒyaluronan検出キット)の開発、を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) *in vitro* 実験でヒyaluronanの血管内皮細胞における機能
- (2) *in vivo* 実験でヒyaluronanの腫瘍血管新生における役割
- (3) ヒト肺癌臨床検体の TEC におけるヒyaluronanの発現頻度と臨床病理学的因子の関連の検討
- (4) 血液検体からのヒyaluronanの簡易検査法の検討

#### (1) *in vitro* 実験

腫瘍血管内皮細胞 TEC は正常血管内皮細胞 NEC と比較して遊走能が亢進している (Matsuda, BBRC 2008)。ヒyaluronanを発現しない NEC のヒyaluronanたんぱくに対する化学走性も観察することが出来た。siRNA でヒyaluronanをノックダウンしてヒyaluronanの機能を証明する。細胞増殖能、アポトーシス抵抗性、薬剤耐性なども検討する。

#### (2) *in vivo* 実験

これまでに樹立した TEC を転移能のない低悪性度の腫瘍細胞と共移植すると高率に肺転移を来すことを見いだした。NEC との共移植では肺転移は認められなかった。TEC あるいは NEC にそれぞれ蛍光たんぱく発現ウイルスベクターを導入する。腫瘍細胞にはルシフェラーゼ遺伝子を導入しておき、ルシフェリンを投与後に IVIS(アイビス)で高感度に肺転移を検出して定量化をおこなう。右図に予備実験の一例を示す。本研究でヒyaluronanの機能を解析するために、NEC にヒyaluronan発現遺伝子を、TEC には sh ヒyaluronan RNA 発現ベクター導入(sh, short hairpin siRNA)を導入する。強制発現と発現ノックダウンにより、*in vivo* 血管新生と肺転移へのヒyaluronanの寄与を検討する。

#### (3) ヒト癌臨床検体

ヒyaluronanの発現を免疫染色と *in situ* hybridization で検討するために検体の収集を行う。血清の保存もプロトコールに定められた方法で行う。具体的には、術前 10ml、術後外来で 10ml の採血を行い、ディープフリーザーで保管する。

#### (4) 血液検体からのヒyaluronanの簡易検査法

すでにウェスタンブロッティングやFACSソーティングした落撒血管内皮細胞からヒyaluronanを検出することに成功しているが、検出の手間や定量性などで実用には不向きな方法である。

抗体を用いてELISAによる検出法を検討する。

血液中を循環する落撒血管内皮細胞を抗体付きビーズで簡便に捕捉、濃縮して簡便にヒyaluronan mRNAを検出する方法も検討する。

#### (5) *in vivo* 実験

マウスモデルを利用した治療実験を行う。siRNA の in vivo 送達には血管内皮細胞を標的としたリポソームを応用する。

#### (6) ヒト肺癌臨床検体

収集した検体の免疫染色を行い、TECにおけるヒグリカンの発現状況と臨床病理学的因子の相関を検討する。特に、組織型による発現パターンは治療法に重要と考えられるので腺癌に偏ることなく検討を行う。非癌部の検討も同時に行ってヒグリカンの特異的発現を確認する。

#### (7) 血液検体からのヒグリカンの簡易検査法

作成した抗体の質を検討して、ELISAの開発を進める。保管した血清を用いて、検査法の評価と臨床データの解析を行う。

#### 4. 研究成果

腫瘍血管内皮細胞におけるヒグリカンの発現と、腫瘍細胞の転移促進機構を検討した。マウス由来の血管内皮細胞を使った in vitro 実験、マウスの肺転移モデル、ヒト臨床サンプルの解析を行った。(1) in vitro 実験：担癌マウスから腫瘍血管内皮細胞を分離培養した。正常血管内皮細胞には見られないヒグリカンの高発現が腫瘍血管内皮細胞で認められた。特に転移能の高い腫瘍から分離された腫瘍血管内皮細胞でヒグリカンの高発現が顕著であった。高発現するヒグリカン siRNA でヒグリカンをノックダウンすると、腫瘍細胞の血管内皮細胞の接着や細胞シート下層への浸潤の低下が認められた。In vivo 実験のために腫瘍と正常血管内皮に蛍光タンパク発現ベクターを導入した。(2) in vivo 実験：腫瘍血管内皮細胞を共移植すると転移能を持たない腫瘍細胞が転移能を獲得した。これは腫瘍血管内皮細胞におけるヒグリカンの発現を抑制するとキャンセルされた。(3) ヒト癌臨床検体。ヒト切除癌組織に

おけるヒグリカンの発現解析のため免疫染色を施行した。担癌患者、健常対照者の血清をディープフリーザーで保管し、次項の検討に用いた。(4) 血液検体からのヒグリカンの簡易検査法。ELISAにより血清中のヒグリカンの定量が可能になった。健常者対照群と比較すると、担癌患者では血清中ヒグリカン濃度が高いことが明らかになった。また、転移陽性例でも高い傾向が認められた。

#### 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15件)

1. Hida K, Maishi N, Sakurai Y, Hida Y, Harashima H: Heterogeneity of tumor endothelial cells and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev, 99PartB,140-147, 2016, 査読有, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.008
2. Yamada K, Maishi N, Akiyama K, Alam Mohammad Towfik, Ohga N, Kawamoto T, Shindoh M, Takahashi N, Kamiyama T, Hida Y, Taketomi A, Hida K: CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. Int J Cancer 137(12), 2825-2836, 2015, 査読有, doi: 10.1002/ijc.29655
3. Matsumoto R, Tsuda M, Wang Lei, Maishi N, Abe T, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Hida K, Ohba Y, Shinohara N, Nonomura K, Tanaka S, : Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop. Cancer Sci, 106(6), 709-717 2015, 査読有, doi: 10.1111/cas.12662
4. Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Ohba Y, Alam Mohammad Towfik, Kawamoto

- T, Ohmura H, Yamada K, Torii C, Shindoh M, Hida K : Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic activity. *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015 ,査読有,  
doi: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017
5. Kibria G, Hatakeyama H, Akiyama K, Hida K, Harashima H : Comparative Study of the Sensitivities of Cancer Cells to Doxorubicin, and Relationships between the Effect of the Drug-Efflux Pump P-gp. *Biol. Pharm. Bull.* 37(12), 1926-1935, 2014 ,査読有,  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/12/37\\_b14-00529/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/12/37_b14-00529/_article)
  6. Ohmura-Kakutani H, Akiyama K, Maishi N, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Iida J, Shindoh M, Tsuchiya K, Shinohara N, Hida K : Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype. *PLoS ONE*, 9(12):e113910, 2014 ,査読有,  
doi: 10.1371/journal.pone.0113910
  7. Alam Mohammad Towfik , Nagao-Kitamoto H, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Taketomi A, Shindoh M, Hida Y, Hida K : Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*, 105(12), 1533-1540, 2014 ,査読有,  
doi: 10.1111/cas.12549
  8. Ara MN, Hyodo M, Ohga N, Akiyama K, Hida K, Hida Y, Shinohara N, Harashima H : Identification and expression of troponin T, a new marker on the surface of cultured tumor endothelial cells by aptamer ligand. *Cancer Med*, 3(4), 825-834, 2014, 査読有,  
doi: 10.1002/cam4.260
  9. Otsubo T, Hida Y, Ohga N, Sato H, Kai T, Matsuki Y, Takasu H, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Nonomura K, Hida K : Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells. *Cancer Sci*, 105(5), 560-567, 2014 ,査読有,  
doi: 10.1111/cas.12394
  10. 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 abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment. *PLoS ONE*, 8(11), e80349, 2013 ,査読有,  
doi: 10.1371/journal.pone.0080349
  11. Hida K, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Hida Y : Heterogeneity of tumor endothelial cells. *Cancer Sci*, 104(11), 1391-1395, 2013 ,査読有,  
doi: 10.1111/cas.12251
  12. 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, Hida K : Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer*, 109(8), 2237-2247, 2013 ,査読有,  
doi: 10.1038/bjc.2013.535
  13. Maishi N, Kawamoto T, Ohga N, Yamada K, Akiyama K, Yamamoto K , Osawa T, Hida Y, Hida K : Application of POLARIC<sup>TM</sup> fluorophores in an in vivo tumor model. *Oncol Rep*, 30(4), 1695-1700, 2013 , 査読有,  
doi: 10.3892/or.2013.2620

14. Hida K, Akiyama K, Ohga N, Maishi N, Hida Y: Tumor endothelial cells acquire drug resistance in a tumor microenvironment. J Biochem,153(3), 243-249, 2013 ,査読有,  
doi: 10.1093/jb/mvs152
15. Akiyama K, Ohga N, Maishi N, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T, Osawa T, Suzuki Y, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K : The F-prostaglandin receptor is a novel marker for tumor endothelial cells in renal cell carcinoma. Pathol Int, 63(1), 37-44, 2013,査読有,  
doi: 10.1111/pin.12031.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

樋田京子, 大賀則孝, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田泰浩: 腫瘍血管内皮細胞の多様性, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患～慢性炎症とがん, 5(1), 北隆館, 158-164, 2016

〔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

樋田 泰浩 (HIDA YASUHIRO)  
北海道大学・北海道大学病院・准教授  
研究者番号: 30399919

(2)研究分担者

加賀 基知三 (KAGA KICHIZO)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 80224335

松居 喜郎 (MATSUI YOSHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90219379