

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659904

研究課題名(和文)正常血管再生療法は新しい癌治療戦略になり得るか？

研究課題名(英文)Reconstruction of the normal vasculature for the strategy of new cancer therapy.

研究代表者

江崎 太一 (Ezaki, Taichi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10128259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは腫瘍内に正常型血管網を再構築することで、確実なドラッグデリバリーシステムの構築や、低酸素化の改善ができると仮説をたてた。そこで、担癌マウスに正常血管内皮細胞を移植することで、血管網を再構築できるかどうかの研究を行った。ヒト扁平上皮癌を移植したSCIDマウスにシスプラチンを投与し、腫瘍および腫瘍血管を一部退縮させる。次に、その場所に正常内皮細胞や内皮前駆細胞を移植した。すると、移植した細胞と宿主側の血管に吻合がみられ、血流の回復や低酸素化の改善が認められた。さらに、正常血管を再生させた腫瘍の成長速度は通常腫瘍より遅いことがわかった。本研究は今後の新しい癌治療戦略になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that reconstruction of normal blood vessels in tumors may lead to improvement of hypoxic conditions, contributing to potential improvements in the delivery of anticancer drugs. Tumor cells were injected into the dorsal subcutis of SCID mice. After 2 weeks, the tumor-bearing mice were injected cisplatin intraperitoneally to regress tumors and tumor vessels for the first step. Two weeks later, human ECs or human ES-derived ECs were transplanted into necrotic regions of the tumor to induce normal angiogenesis for the second step. Microscopic observations revealed that the transplanted ECs formed anastomoses with the host mouse vasculature. Blood vessels reconstituted by ECs exhibited the normalization of tumor vasculature, resulting in a significant reduction in the tumor volume. Thus, this model is a useful model for the future development of new cancer therapies by the construction of reliable drug delivery systems and the improvement of hypoxic conditions.

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 血管正常化 血管再構築 再生医療

1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管は、形態的な異常をはじめ、血流の不均一や透過性の異常など、正常組織の血管とは形態と機能が大きく異なる。そのため、腫瘍内に低酸素状態を引き起こしたり、転移ルートとなりうるということが知られている。化学療法を行っても、投与した薬剤が腫瘍の隅々まで行き渡らず、また、放射線療法も、その低酸素状態のために効果が不十分であるなど、腫瘍細胞を完全に根絶することは難しい。1993年より開発の始まった腫瘍血管内皮細胞をターゲットにした分子標的治療薬についても、「腫瘍血管を破綻させる事は、完全な抗腫瘍効果には繋がらない」と言われている。これに対して、2005年にJainらによって、腫瘍血管は破綻させるのではなく、正常血管に近づけることで、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の改善などが得られ、抗腫瘍効果が得られるという腫瘍血管の正常化(Normalization)という考えが提唱された。現在、この考えを基に盛んに腫瘍血管正常化のための研究が行われているが、腫瘍血管が、はたして本当に正常血管に変化するのかわかり不明であり、実際の抗腫瘍効果についても未だ不明な点が多い。そこでわれわれは、腫瘍血管を正常化させるのではなく、まず第一段階として既存の抗癌剤を必要量投与し、ある程度抗腫瘍効果を得た上で、副作用、耐性細胞出現前に腫瘍内に出現する壊死部位を足場として、正常血管を新しく再生させ、宿主側の正常血管と連結することにより、低酸素の改善、確実なDDSの構築を行い、第二段階として残存腫瘍の治療を行うという新しい2ステップの癌治療戦略を企図する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、我々独自の予備的検索を基に、“腫瘍内に血管を再生させると腫瘍の成長が抑制される”という仮説を立て、臨床応用への足がかりとするため、抗癌剤治療後に、細胞、成長因子、足場といった組織再生に不可欠な三要素を追加投与して、残存した腫瘍内に正常型血管を再生し、確実なドラッグデリバリーシステムを構築することを目的とした。これによって、腫瘍組織の低酸素状態の改善、血流の均一化、血管透過性も正常化され、腫瘍根絶のための腫瘍血管を標的とした新しい治療法の開発が期待できる。

3. 研究の方法

動物には雄の重症免疫不全(SCID:6w)マウスを使用した。このマウスはヒト由来の細胞の移植が可能であり、ヒト由来の内皮細胞を移植した場合、宿主側との連結が見られる(Alajatiら、2008)。移植用腫瘍細胞には、ヒト舌癌由来扁平癌細胞(SAS)、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa、KB)を用いた。正常血管再生因子として、内皮細胞(HMVEC)内皮前駆細胞(hESDEC: Nakaharaら2009)、アンジオポ

イエチン1をマトリゲルと混合して腫瘍内に移植した。また、腫瘍移植後に足場形成のためにシスプラチンを腹腔内に総投与量20mg/kgとして3週にわけて投与した。形態的アプローチとして多重免疫染色とレクチン灌流法と組み合わせた三次元イメージング法、透過型電子顕微鏡による微細構造の解析、組織の丸ごと全載標本による血管網形成の三次元解析を行った。機能的アプローチとして、ウェスタンブロット法や2次元電気泳動法、低酸素状態の把握、マイクロアレイによる遺伝子レベルでの解析などを行った。

4. 研究成果

(1) CDDP投与後の腫瘍血管病理組織学的検討: SCIDマウスの背部皮下に $SAS2.5 \times 10^6$ 個を移植した坦癌マウスにCDDPを20mg/kg投与し、投与後の腫瘍血管の病理組織学的検討を行った。CDDPを投与すると、腫瘍血管は破綻し、血流が遮断されていた。血管が破綻した部位では、血管内皮細胞、周皮細胞が壊死し、投与後14日目には基底膜のみがghostとなって残存していた。透過型電子顕微鏡解析でも同様の像が確認できた。この残存した基底膜を血管再生の足場として使用することとした。

(2) 正常内皮細胞による腫瘍内正常血管再構築: (1)のモデルの腫瘍内に、通常の内皮細胞(HMVEC)を移植すると、腫瘍内の壊死部位が減少し、低酸素状態が一時的に改善される事がわかった。腫瘍の成長速度も一時的に遅くなる事がわかったが、時間の経過とともに、通常の腫瘍と同様の速度になった。

(3) 内皮前駆細胞による腫瘍内正常血管再構築の腫瘍増殖に及ぼす変化について: (1)のモデルの腫瘍内に、内皮前駆細胞(hESDEC)を移植し、正常血管を再生させた。すると、移植した血管と宿主側の血管に吻合がみられ、血流の回復が認められた。さらに、正常血管を再生させた腫瘍の成長速度は通常腫瘍より少し遅いことがわかった。

このように本研究では、坦癌マウスの腫瘍内に、正常血管の再構築を行うことで、低酸素状態の改善、腫瘍体積の減少などが確認できた。今後、確実なドラッグデリバリーシステムの確立とそれによるさらなる抗腫瘍効果を期待して研究を継続し、臨床応用へ繋げる予定である。

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3件)

Kuwahara Y, Mori M, Kitahara S,

Fukumoto M, Ezaki T, (他3名, 3番目, 5番目) Targeting of tumor endothelial cells combining 2 Gy/day of X-ray with Everolimus is the effective modality for overcoming clinically relevant radioresistant tumors. *Cancer Med.* 3: 2, 310-21, 2014, 査読有

: Momoki Y, Kitahara S, (他3名, 2番目, Corresponding author), Establishment of a normalized revascularization mouse model using tumor transplantation, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology.* 26: 1, 80-88, 2014, 査読有

Shimizu K, Asakura M, Shinga J, Sato Y, Kitahara S, Hoshino K, Kaisho T, Schoenberger SP, Ezaki T, (他1名, 5番目, 9番目) Invariant NKT Cells Induce Plasmacytoid Dendritic Cell (DC) Cross-Talk with Conventional DCs for Efficient Memory CD8+ T Cell Induction, *J Immunol.* 190, 5609-19, 2013, 査読有

Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, (他7名, 4番目) Tumor-Driven Microvesicles Induce Proangiogenic Phenotype in Endothelial Cells via Endocytosis, *PLoS One*, 7 (3), e34045, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

北原秀治, 腫瘍の増殖環境変化にともなう腫瘍血管の形態的、機能的変化, 第119回日本解剖学会総会, 2014.3.27~29, 栃木

Shuji KITAHARA, Neoplastic transformation sequence in *Apc^{Min/+}* mice depends on prior microvascular changes and vasohibin-2 expression, 5th International meeting of Angiogenesis, 2014.3.12~14, Amsterdam

北原秀治, シンポジウム「頭頸部の微小循環」腫瘍微小循環系の制御による腫瘍増殖

抑制の試み?, 第55回歯科基礎医学会, 2013.9.19~21, 岡山

Shuji KITAHARA, Transplanting normal endothelial cells into tumor mass retards the tumor growth by vascular reconstruction and vascular normalization, *Experimental Biology* 2013, 2013.4.21~24, Boston

北原秀治, シンポジウム「遺伝子異常vs微小循環の異常」微小循環系の制御が腫瘍の悪性化抑制につながるか?, 第23回消化器癌発生学会, 2012.11.16, 徳島

北原秀治, サテライトシンポジウム, [頭頸部領域の微小循環系]、腫瘍における微小循環系の多様性, 第54回歯科基礎医学会総会, 2012.9.13, 福島

北原秀治, 臨床的放射線耐性腫瘍を用いた新たな癌治療モデルの確立, 第55回日本放射線影響学会, 2012.9.6, 仙台

Shuji KITAHARA, Transplanting normal endothelial cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduces tumor volume, 14th INTERNATIONAL HISTOCHEMISTRY AND CUTOCHEMISTRY, 2012.8.26~29, Kyoto, japan

Shuji KITAHARA, Does the regeneration of the normal vasculature in tumors suppress the tumor growth?, International Vascular Biology Meeting, 2012.6.2~5, Germany

〔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

江崎 太一 (EZAKI TAICHI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：10128259

(2) 研究分担者

北原 秀治 (KITAHARA SHUJI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：40510235

森島 正恵 (MORISHIMA MASAE)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：00241068

(3) 連携研究者

()

研究者番号：