

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791958

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮細胞における特異的miRNAの発現解析

研究課題名(英文)The expression analysis of the specific miRNA in the tumor endothelial cells

研究代表者

秋山 廣輔(Akiyama, Kosuke)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号：10609100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療において腫瘍血管を攻撃して癌の増殖・血行性転移を抑制する目的で血管新生阻害療法が開発、実用化されてきた。しかし既存の血管新生阻害剤は腫瘍血管への特異性がなく副作用を生じることが報告されている。今回我々は、マウスおよびヒト腎がん由来の血管内皮細胞の分離・培養に成功した。正常血管内皮細胞(NEC)と腫瘍血管内皮細胞(TEC)をmiRNA Micro Array解析し、NECと比較しTECで発現の高いmiRNAを複数同定した。そのうちの1つmiRNA-Xに着目し、qRT-PCR法でもmiRNA-Xの発現がTECで発現が高いことを確認した。今後機能解析を行い新規血管新生阻害剤の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：The anti-angiogenic therapy have been developed and used to inhibit the tumor growth and the metastasis. However, the currently used anti-angiogenic therapies have been reported to cause side effects because it is not specific for tumor blood vessels. In this study, endothelial cells were successfully isolated from mouse and human renal cell carcinoma tissues. Normal endothelial cells (NEC) and tumor endothelial cells (TEC) were analyzed with miRNA Micro Array, then some miRNAs, which are expressed higher in TEC than in NEC, were identified. In addition, it is confirmed that miRNA-X is highly expressed in TEC compared to NEC with qRT-PCR analysis. In the future, we will analyze the miRNA-X function and develop the novel anti-angiogenic therapy.

研究分野：血管新生

キーワード：腫瘍血管新生 腫瘍血管内皮マーカー miRNA 血管新生阻害

1. 研究開始当初の背景

近年、癌治療において腫瘍血管を攻撃して癌を兵糧攻めにし、癌の血行性転移を抑制する目的で血管新生阻害療法が開発、実用化されてきた

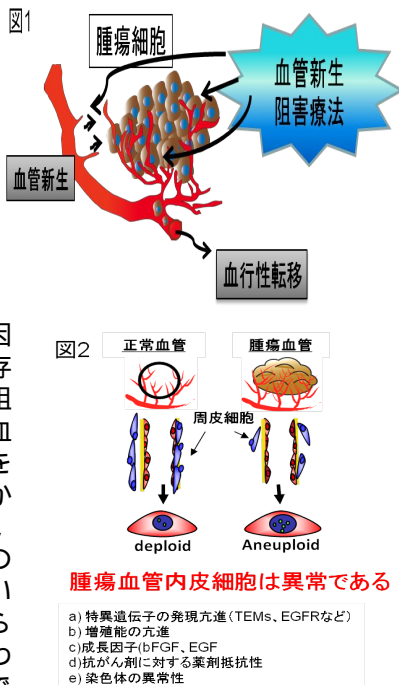
(図1)。しかし、喀血、腸管出血など心血管系の重篤な副作用があることも報告されてお

り、その原因の一つに既存の血管新生阻害剤は正常血管内皮細胞を用いた研究から開発され、腫瘍血管への特異性がないことが挙げられる。われわれはこれまで、

腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と異なることを当教室では報告してきた(Hida et.al, Cancer Res 2004, 2005, 2006, Cancer Sci 2009, BBRC 2010, Br.J Cancer 2011, Int J Cancer 2011)(図2)。さらにわれわれは、正常血管内皮が腫瘍微小環境において異常性を獲得することを報告してきた(Akiyama, Hida et.al Am J Pathol 2012)。そのメカニズムの一つに、腫瘍細胞由来因子による正常血管内皮細胞のDNAメチル化や、ヒストン脱アセチル化などエピジェネティックな異常の関与が示唆される。近年、これらエピジェネティックな異常はmicroRNA(miRNA)とよばれる低分子RNAによって制御されることが明らかになりつつある(Kuo-Wang Tsai et.al, IJC 2011, Joseph Mazar et.al PLoS ONE 2011)。さらにわれわれはこれまでの研究で、腫瘍培養上清中に微小胞でつまれた腫瘍細胞由来のmiRNAが含まれていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

正常血管内皮と腫瘍血管内皮の分子的な違いを標的とする腫瘍血管特異的な新規血管新生阻害剤の開発が可能ではないかと考え、正常血管内皮細胞と比較し、腫瘍血管内皮細胞に特異的なmiRNAの発現解析を行うとともに、その標的遺伝子の同定および機能解析を



行い、腫瘍血管内皮におけるmiRNAを標的とした新規血管新生阻害剤開発と治療応用を展開するための研究基盤の確立を目的とする。(図3)

3. 研究の方法

(1) マウス血管内皮細胞およびヒト正常血管内皮細胞の分離培養: マウス血管内皮細胞を分離するために、ヒト腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、4-6週後に腫瘍塊から腫瘍血管内皮細胞を、正常マウス皮膚からは正常血管内皮細胞を分離する。ヒト血管内皮細胞を分離するために、ヒト腎がん臨床検体を回収し、癌部から腫瘍血管内皮細胞を、非がん部から正常血管内皮細胞を分離する。分離にあたり抗CD31抗体および抗CD45抗体を用いて、CD31陽性かつCD45陰性の血管内皮細胞をフローサイトメトリー(FACS Aria)にて高純度の血管内皮細胞を分離した。さらにPCR法とフローサイトメーターを用いて、分離した血管内皮細胞の特性解析を行った。(分離後の血管内皮細胞が血管内皮マーカーを発現し、多細胞の混入がないことを確認する)

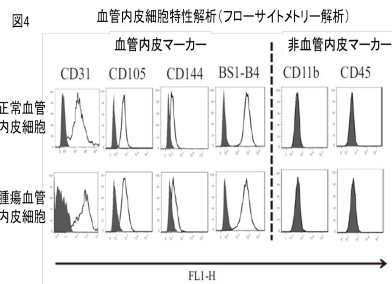
マウス血管内皮細胞は分離後、各解析に用いるために血管内皮専用培地EGM2-MVを用いて注意深く培養を行った。

(2) ヒト正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞のmiRNA Micro Array解析: 分離後のヒト腫瘍血管内皮細胞および腫瘍血管内皮細胞からmiRNAを含むRNA isolation(miRNeasy Mini kit)をおこない、マルチプレックスサスペンションアレイにてmiRNA Micro Array解析を行った。解析後、realtime PCR法により正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞の間で、miRNA発現解析・比較を行った。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の分離培養および特性解析: ヒトメラノーマ細胞およびヒト腎がん細胞をヌードマウスに皮下移植し4-6週後、腫瘍塊から腫瘍血管内皮細胞を、正常皮膚から正常血管内皮細胞を分離・培養した。分離後の血管内皮細胞はフローサイトメトリー解析にて血管内皮マーカーであるCD31, CD105, CD144, およびBS1-B4レクチンが陽性であり、また単球マーカーCD11bや血球マーカーCD45が陰性であることを確認した。(図4)

さらにPCR法にて血管内皮マーカーであるCD31, VEGFR1, VEGFR2の発現が陽性であること、CD11b, CD45, 血管平滑筋マーカーSMAが陰性であることを確認した。また、



ヒト腫瘍細胞の混入を否定するため、ヒト腫瘍細胞特異的に発現する hHB-EGF の発現を解析したところ、すべての血管内皮細胞で陰性であった。(図5)このことからマウスから分離培養した細胞は高純度の血管内皮細胞であり、ヒト腫瘍細胞の混入がないことが示された。

また、ヒト血管内皮細胞を分離後も同様の特性解析を行い高純度の血管内皮細胞を分離したことを確認した。腫瘍組織から1~2%とごくわずかしき採取できない腫瘍血管内皮細胞を分離・培養することは非常に困難な事であり、これら希少な初代培養血管内皮細胞を用いて研究を行うことができる研究室は国内外でも数少ない。

(2) ヒト正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞における miRNA Micro Array 解析: ヒト腎がん臨床サンプル由来のヒト腫瘍血管内皮細胞、及びヒト正常血管内皮細胞を各 3 lot ずつ分離し、miRNA を含む RNA isolation をおこない、miRNA Micro Array 解析を行った。各 3 lot に共通して、正常血管内皮細胞と比較して腫瘍血管内皮細胞において4種の miRNA の発現が高かった。

(3) ヒトおよびマウス正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞における miRNA-X の発現解析: この4種の miRNA の中で miRNA-X に着目し miRNA Micro Array 解析後、qRT-PCR 法にてマウスおよびヒト正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞における miRNA-X の発現解析を行った。マウスおよびヒト腫瘍血管内皮細胞において miRNA-X の発現は正常血管内皮細胞に比べ高かった。

図5 血管内皮細胞特性解析(PCR解析)

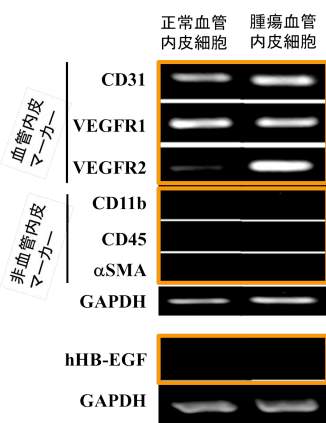
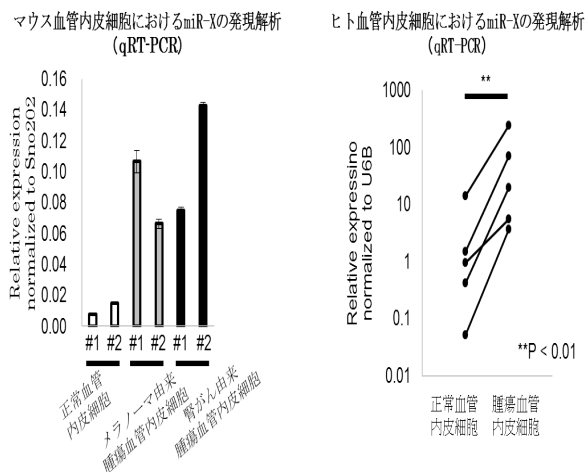


図6



(図6)このことから、miRNA-X が腫瘍血管内皮細胞における標的分子となる可能性が示唆された。

#### 今後の展望

・腫瘍血管内皮細胞における miRNA-X ノックダウン後の機能解析: miRNA-X に対するアンチセンスオリゴを用いて、in vitro で増殖能、血管新生能を解析し血管新生阻害療法上有用な腫瘍血管内皮特異的のマーカを見つけて出す。

・miRNA-X を標的とした血管新生阻害療法のマウス in vivo 解析: in vitro でノックダウンにより有効な血管新生阻害作用を示した miRNA を腫瘍血管内皮細胞特異的のマーカとして標的とした血管新生阻害剤の開発の基盤研究を行う。具体的には腫瘍血管内皮に特異的に発現している CD13 を標的とした抗がん剤内方リポソーム製剤を用いることで、腫瘍血管内皮細胞に特異的に miRNA-X に対するアンチセンスオリゴを取り込ませることのできる DDS を開発する。その後、担癌マウスで in vivo 実験を行い、腫瘍血管内皮細胞を選択的に傷害する治療薬の開発を目指す。

#### 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 20 件)

Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and\*Hida K.: Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015 査読有 DOI:10.1016/j.ajpath.201410.017.

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.

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.

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*, 7(3), e34045, 2012 査読有

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  
DOI:10.1016/j.ajpath.2011.11.029.

〔学会発表〕(計 11 件)

Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Omura H., Yamada Y., Torii C., Shindoh M., Ohba Y., Hida K., P-gp inhibitor enhances antiangiogenic activity in metronomic chemotherapy, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse (京都府・京都市)

秋山廣輔, 大賀則孝, 樋田泰浩, 間石奈湖, Alam Mohammad Towfik, 川本泰輔, 大村 瞳, 山田健司, 鳥居ちさほ, 進藤正信, 大場雄介, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞を標的としたメトロノミックケモセラピーとP-gp阻害剤の併用療法の有効性の検討, 第46回北海道病理談話会, 2013.10.12 北海道大学医学部学友会館フ ラテホール (北海道・札幌市)

秋山廣輔, 大賀則孝, 樋田泰浩, 間石奈湖, Alam Mohammad Towfik, 川本泰輔, 大村瞳, 山田健司, 鳥居ちさほ, 進藤正信, 大場雄介, 樋田京子: P-gp阻害剤はメトロノミックケモセラピーの血管新生阻害効果を強める, 第72回日本癌学会学術総会, 2013.10.4 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik., Kawamoto T., Omura H., Yamada K., Torii C., Sakamoto H. Matsuda A., Hida K.: Tumor endothelium

acquires drugresistance by MDR1/P-gp upregulationand metronomic chemotherapycombined with P-gp inhibitor enhancesantiangiogenic activity in vivo , The 20th annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and MedicineOrganization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7, Tokushima Arts Foundation for Culture ( 徳島県・徳島市 )

Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Ishikawa S., Maishi N., Tomoshige A., Kondoh M., Matsuda A., Inoue N., Shindoh M., Hida K. : Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 upregulation via VEGF signaling in tumor microenvironment, AACR ANNUAL MEETING 2012, 2012.4.2, Chicago, Illinois(USA)

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 廣輔 (Akiyama, Kosuke)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号 : 10609100