

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890009

研究課題名(和文)低酸素が腫瘍血管内皮に与える影響

研究課題名(英文)Effect of Hypoxia in endothelial cells.

研究代表者

近藤 美弥子 (Kondoh, Miyako)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：10631864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の多くはその進展に伴い低酸素に曝されている。近年、低酸素が癌の増悪に関与している事が明らかになってきた。一方、腫瘍内部の血管内皮細胞について正常組織内の血管内皮細胞とは異なる性質を持つ事が知られている。しかし、その特異性の獲得の機序についてはいまだ不明な点が多い。そこで腫瘍の低酸素環境が血管内皮細胞に影響を与える可能性を検討した。今回、低酸素環境により血管内皮細胞での種々の遺伝子の発現が亢進する事、低酸素応答に関与するHIF-1の蓄積がおこる事、活性酸素が蓄積する事を確認した。さらに、低酸素条件で1週間培養し続けた血管内皮細胞には染色体異常が起こる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumor hypoxia is important for tumor progression. TECs upregulated several genes and have highly responsiveness to growth factor and resistant to some anti-cancer drugs. Furthermore, there is chromosomal abnormality in TECs. However the mechanism of acquisition of these abnormalities in TECs remains to be unknown. In this study, we investigated the effects of hypoxia on TEC abnormalities. Under hypoxic condition, gene expressions of HIF-1 alpha and VEGFA in human NECs (HMVEC) were upregulated. Furthermore, the aneuploidy rate of NEC increased under hypoxia. In addition, ROS was elevated in NEC by hypoxia and inhibition of ROS by EGCG inhibited hypoxia-induced aneuploidy in HMVEC. VEGFR inhibitor also inhibited aneuploidy induced by hypoxia. These results suggest that hypoxic condition in tumor microenvironment might be one of mechanisms of acquisition of chromosomal abnormality in tumor endothelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：血管内皮細胞 低酸素 活性酸素 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

- (1)多くの腫瘍内部は、低酸素(Hypoxia)に陥っており、がんの悪性度と関連している。
- (2)Hypoxia に曝された腫瘍細胞において、低酸素誘導因子(HIF-1)タンパクの蓄積がおき、様々な遺伝子の転写が促進されHypoxia に応答する。例えば、腫瘍細胞において HIF-1 の蓄積が、血管内皮増殖因子 VEGF などの転写を亢進し、血管新生を促進することが明らかになってきている。
- (3)腫瘍間質を構成する腫瘍血管内皮における低酸素に対する応答機構についての報告はほとんど見られない。
- (4)近年、腫瘍血管と正常血管における病理組織学的な差異のみならず、腫瘍血管内皮細胞(TEC)と正常血管内皮細胞(NEC)の間に性質の違いがあることがわかってきた。申請者らのグループでも以下のことを報告した。
TEC が、上皮増殖因子レセプター(EGFR)の他にシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、血管内皮増殖因子(VEGF)、プロスタグランジン E2(PGE2)などの血管新生因子の発現が亢進していること
特異遺伝子を発現していること
ある種の抗がん剤に対して薬剤抵抗性を持つこと
染色体異常があること
- (5)しかし、このような TEC の異常性獲得の機序に関しては未だ不明な点が多い

2. 研究の目的

腫瘍の多くは、その進行に伴いHypoxia に曝されている。近年、Hypoxia が腫瘍細胞の細胞死の回避、薬剤抵抗性や浸潤能、転移能の亢進などを誘導し、がんの増悪に関与していることが明らかになってきた。一方、腫瘍血管は病理組織学的に未熟な構造を呈していることが知られていたが、それだけではなく、TEC と NEC の間に性質の違いがあることがわかってきた。我々もまた、これまで TEC を分離・培養し、TEC が NEC に比べ、さまざまな点で違いがあることを報告してきた。しかし、

このような TEC の異常性獲得の機序に関しては未だ不明な点が多い。われわれは低酸素ブロープを用いて、免疫染色を行い、血管周囲ですら低酸素に曝されている部位があることを見出した。そこで本研究では、TEC の異常性獲得に、Hypoxia の影響があるのではないかという仮説のもと、Hypoxia が血管内皮に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

市販されているヒト正常血管内皮細胞(HMVEC)を、腫瘍組織環境に疑似化した培養条件:さまざまな酸素濃度の低酸素条件、低血清下条件で培養し、細胞増殖、遊走能、管腔形成能などの生物学的活性、癌細胞に対する細胞接着能、抗がん剤に対する薬剤抵抗性、幹細胞性の獲得の有無、血管新生関連遺伝子、薬剤抵抗性関連遺伝子、抗アポトーシス関連遺伝子の発現変化に関して実験を行い、低酸素(Hypoxia)が正常血管内皮に異常性をもたらす可能性について検討した。

- (1)低酸素環境における血管内皮細胞の応答モデルの設定
低酸素状態を設定し、HMVEC を培養。低酸素状態の時間、培地の条件などを検討した。
- (2)細胞の表現型の解析
- (3)表現型の変化に伴う遺伝子発現の変化の解析による新たな TEC マーカー候補分子の探索 Real Time PCR 法により我々が過去に行ったマイクロアレイ解析によって正常血管内皮に比べ、腫瘍血管内皮で発現が亢進、あるいは抑制している分子が、低酸素培養下の HMVEC で発現がどのように変化するか検討した。
- (4)低酸素環境と活性酸素の関連の検討
HMVEC は低酸素応答によって活性酸素産生が上昇するのか
HMVEC は低酸素応答によって染色体不安定性が惹起されるのか
活性酸素種の阻害剤を加えた状態で HMVEC を低酸素状態に置いたとき、染色体不安定性は惹起されるのか

4. 研究成果

(1) 腫瘍血管内皮の特異性と腫瘍内低酸素環境との関連

TECではHypoxiaで誘導される遺伝子の発現が亢進している事を認めた.

一部の TEC は組織内において Hypoxia に陥っていることが示唆された.

(2) 正常血管内皮細胞の低酸素応答

Hypoxia で培養された HMVEC において, HIF-1 タンパクの発現が亢進した.

Hypoxia で培養された HMVEC において, VEGF-A の発現が亢進していた.

(3) 低酸素は正常血管内皮細胞に染色体異常をもたらした

染色体数の異常が確認された

核型の異常が確認された

(4) 低酸素は HMVEC の活性酸素の上昇をもたらした

(5) 低酸素において活性酸素の阻害剤を添加して HMVEC を培養すると, 染色体の異常の割合が低下した

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 6 件)

1. Kondoh M, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Maishi N, Towfik AM, Inoue N, Shindoh M, Hida K.: Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment, PLOS ONE 8: e80349, 2013. DOI 10.1111/pin.12031 (査読あり)
2. 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. (査読あり)

3. 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 106(6): 1214-1223, 2012. (査読あり)

4. 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. (査読あり)

5. 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. (査読あり)

6. Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Ishikawa S, Maishi N, Akino T, 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, Am J Pathol 180(3): 1283-1293, 2012. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. Kondoh M, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Hida Y, Shindoh M, Hida K.: Hypoxia induces angiogenic factors andaneuploidy in micirvascular endothelialcells , The 20th annual

Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7, AWAGIN holl (Tokushima)

2. 近藤美弥子, 大賀則孝, 樋田泰浩, 秋山廣輔, 間石奈湖, 川本泰輔, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍内低酸素環境と腫瘍血管内皮の異常性の関連, 第 92 回北海道医学大会, 第 106 回 北海道癌談話会例会 腫瘍系分科会, 2012.9.8 北海道大学医学部学友会館フラテ (札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学 血管生物学教室ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 美弥子 (KONDOH MIYAKO)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号: 10631864

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし