

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462909

研究課題名(和文) 口腔がん血管由来因子の診断法への応用

研究課題名(英文) Application of biglycan as tumor biomarker of oral cancer

研究代表者

小野 貢伸 (Ono, Mitsunobu)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50281829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管内皮マーカーにおいて正常血管内皮細胞よりも発現の高かったプロテオグリカンのうちbiglycanに着目した。さらに線維芽細胞ではその遊走に関わるということが報告されている。ところが、血管内皮におけるbiglycanの機能に関しては殆ど知られていない。そこで、本研究ではbiglycanの発現と機能を解析し、新しいがんのバイオマーカーとしての可能性を探った。

研究成果の概要(英文)：We focused on biglycan which is proteoglycan and a published-tumor endothelial markers. Since the function of biglycan has not been fully evaluated, we addressed the role of biglycan in tumor vasculature in oral cancer in this study. We showed that biglycan is involved in tumor endothelial cell migration. The biglycan plasma level was elevated in cancer patients compared to that in normal volunteer. Finally, we tried to establish the system for targeting biglycan in tumor endothelial cells using drug delivery system which contains biglycan siRNA.

研究分野：口腔がん

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 Biglycan プロテオグリカン 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の血管は腫瘍の進展と転移に大きな役割を果たしている。世界で初めての血管新生阻害剤 Bevacizumab (商品名アバステン)が2004年に承認され癌患者の延命をもたらした。しかし、その一方で、また重篤な副作用の報告もなされている。これは正常血管内皮細胞(Normal EC)を用いて研究開発されたことによる限界とも考えられる。申請者らは腫瘍血管内皮細胞(Tumor EC)の分離と培養に世界に先駆けて成功した後、Tumor ECがNormal ECとは様々な点で異なることを報告してきた。より副作用の少ない血管新生阻害剤を開発するためには、Tumor ECのマーカーの同定が必須である。

2. 研究の目的

本研究では口腔がん血管由来の分泌タンパクの発現と機能を解析し、新しいがんのバイオマーカーとしての可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍血管内皮細胞の分離

HSC3 など数種のがん細胞株をヌードマウスに皮下または同所移植を行った。

(2) 腫瘍血管内皮細胞の正常血管内皮におけるプロテオグリカン発現の比較検討

マイクロアレイでTumor ECにおいて発現が亢進していたBiglycan,ならびにその他decorinなどのプロテオグリカンの発現をreal time PCRによって解析し、Tumor ECとNormal EC間で比較検討した。

(3) プロテオグリカンのin vivo 腫瘍血管における発現解析

in vivo 腫瘍血管内におけるプロテオグリカンの発現の有無を免疫染色によって解析する。CD31抗体にて血管内皮を染色し、さらにbiglycanに対する抗体を用いて、血管との共局在の有無を解析した。

(4) プロテオグリカンの腫瘍血管内皮における機能解析

Tumor ECにおけるbiglycanの機能を解析するため、biglycan siRNAを用いて、biglycanのノックダウン実験を行い、細胞の遊走や増殖への影響を解析した。

(5) 腫瘍血管内皮におけるプロテオグリカンの機能解析

Biglycanの機能を解析するため、ノックダウン実験を行い、腫瘍血管におけるプロテオグリカン阻害がもたらす影響の解析を行った。

(6) マウス腫瘍モデルを用いた新しい腫瘍血管新生阻害療法の試み

Biglycan siRNAをナノ粒子(MEND)(北大・薬学・原島教授との共同研究)によるドラッグデリバリーシステムを用いて腫瘍血管内皮におけるBiglycanの発現の抑制を試みた。

(7) 血清中における腫瘍血管内皮細胞特異プロテオグリカンの検出

Biglycanが癌患者の血清中検出されるかどうかを分析した。

(8) 血清中における腫瘍血管内皮細胞特異プロテオグリカンの検出

プロテオグリカンを濃縮するカラムを用いて、Tumor ECの培養上清におけるBiglycanが検出できることを確認した。

(9) 腫瘍微小環境が血管内皮細胞に及ぼす影響に関する検討

Tumor ECにおいてこれらのプロテオグリカンの発現が亢進するメカニズムの1つとして、腫瘍細胞と内皮細胞との相互作用による可能性を考え、がん細胞の培養上清による正常血管内皮細胞の処理を試みた。

(10) マウス腫瘍モデルを用いた腫瘍血管新生阻害療法の試み

Biglycan siRNA-MENDによるin vivo 腫瘍血管におけるbiglycanのノックダウンを試みた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍血管内皮細胞の分離

H腫瘍から腫瘍血管内皮細胞をCD31抗体とCD45抗体を用いてFACS aria 2によりCD31+CD45-の分画として採取した。さらにヒト悪性腫瘍の摘出標本からヒトTumor ECの分離も行った。

(2) 腫瘍血管内皮細胞の正常血管内皮におけるプロテオグリカン発現の比較検討

Tumor ECにおいてBiglycanの発現がNormal ECに比べ高いことが見出された。

(3) プロテオグリカンのin vivo 腫瘍血管における発現解析

血管におけるBiglycanの発現は転移症例において高い傾向が見られた。

(4) プロテオグリカンの腫瘍血管内皮における機能解析

Biglycanのノックダウンにより血管内皮の遊走能力が抑制され、この分子が腫瘍血管新生能に関与する機能的な分子であることが示された。

(5) 腫瘍血管内皮におけるプロテオグリカンの機能解析

Biglycan knock downは細胞遊走を阻害し、腫瘍血管内皮細胞に形態的变化を起こすことが明らかになった。

(6) マウス腫瘍モデルを用いた新しい腫瘍血管新生阻害療法の試み

MENDに腫瘍血管表面抗原であるintegrinに結合するペプチドRGDを修飾することで有意に腫瘍血管への送達効率の改善がはかられた。Biglycanのノックダウンはin vitroの腫瘍血管内皮細胞においては50%程度得られたことから、in vivoでのノックダウンにつながるものと思われた。

(7) 血清中における腫瘍血管内皮細胞特異プロテオグリカンの検出

Western blottingでは、がん患者の血清ではBiglycanの発現が検出できたのに対し、健常ボランティアの血清からは、発現はほとんど確認できなかった。定量分析においても、血清中のBiglycanレベルは健常ボランティアに比べ、がん患者で明らかに高かった。

(8) 血清中における腫瘍血管内皮細胞特異プロテオグリカンの検出

Normal ECの培養上清には検出できなかったが、Tumor ECの培養上清にはBiglycan が検出された。さらに、高転移性腫瘍由来のTumor ECと低転移性腫瘍由来のTumor ECを比較すると、後者には検出されず、前者の培養上清にのみ検出された。その後、マウス腫瘍モデルの進展の経過に伴う血清中のBiglycanの発現の推移を解析した。高転移性のメラノーマにおいてはがん細胞移植後2週前にはマウス血漿に検出され、これが癌の早期診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。またがん患者の血清をサンプルとして用いてBiglycanの発現と患者の予後との関連について検討したところ、健常者の血液では低値を示すBiglycanはがん患者の血清では高く、特に転位症例では高い傾向がみられた。

(9) 腫瘍微小環境が血管内皮細胞に及ぼす影響に関する検討

Normal EC にBiglycanの発現亢進みられた。

(10) マウス腫瘍モデルを用いた腫瘍血管新生阻害療法の試み

MENDの適切な投与時期や投与量の検討を行った。

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7件)

Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and Hida K.: CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 査読有 137(12), 2825-2836 2015

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*, 査読有 185(2), 572-580, 2015
doi:10.1016/j.ajpath.2014.10.017

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*, 査読有 9(12):e113910, 2014
doi: 10.1371/journal.pone.0113910.

Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and Hida K.: Suprabasin as a novel

tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 査読有 105(12), 1533-1540, 2014
doi: 10.1111/cas.12549.

Otsubo T, Hida Y, Ohga N., Sato H, Matsuda Y, Takasuki Y, Takasu H, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Hida K.: Identification of Novel targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing Gene Expression of Tumor and Normal Endothelial Cells., *Cancer Sci.*, 査読有 May;105(5):560-7. 2014, doi: 10.1111/cas.12394

Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis.Osawa T, Ohga N., Akiyama K, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T, Yamamoto K, Maishi N, Kondoh M, Onodera Y, Fujie M, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K. *Br J Cancer*. 査読有 2013 Oct 15; 109(8):2237-47. doi: 10.1038/bjc.2013.535. Heterogeneity of tumor endothelial cells.Hida K, Ohga N., Akiyama K, Maishi N, Hida Y. *Cancer Sci*. 査読有 2013 Nov;104(11):1391-5. doi: 10.1111/cas.12251.

[学会発表](計 7件)

北條敬之, 間石奈湖, Mohammad T Alam, 秋山廣輔, 大賀則孝, 進藤正信, 樋田泰浩, 藤澤俊明, 樋田京子: ROS によるbiglycan 発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.10. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本(永尾)宗子, Mohammad Alam T., 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞はbiglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.8. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, The European Cancer Congress 2015, 2015.9.27 Vienna, (Austria)
間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞はbiglycanの分泌を介してがんの転移を促進する, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 2015.7.31 北海道大学(北海道札幌市)
Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Shinohara N., Taketomi A.: Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, 第26回日本臨床口

腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学(北海道札幌市)

北條敬之, 間石奈湖, 秋山廣輔, 大賀則孝, 進藤正信, 樋田泰浩, 藤澤俊明, 樋田京子: 活性酸素種によるBiglycan発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学(北海道札幌市)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K: Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, Tenth AACR-JCA Joint Conference

"Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics", 2015.2.17. Maui, Hawaii, (USA)

〔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, 172(158-164), 2016 (分担執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 貢伸 (ONO Mitsunobu)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号: 50281829

(2) 研究分担者

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

北村 哲也 (KITAMURA Tetsuya)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 00451451

進藤 正信 (SHINDOH Masanobu)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 20162802