

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861540

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮マーカーを標的とした薬剤耐性の克服

研究課題名(英文)Overcome the drug resistance by targeting tumor endothelial markers

## 研究代表者

アラム M・トウフィック (Alam, Mohammad Towfik)

北海道大学・歯学研究科・学術研究員

研究者番号：60641694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、薬剤感受性に及ぼす腫瘍血管内皮マーカーを同定するために阻害剤もしくはsiRNAを用いてin vitroで腫瘍血管内皮細胞の薬剤感受性解析を行った。MDR-1にコードされるp-glycoproteinの阻害剤ベラパミルを用いるとパクリタキセルに対する感受性が増強しin vitro, in vivo 両方において薬剤耐性がキャンセルされることが見出された。これらのことから腫瘍血管内皮マーカーの阻害は薬剤耐性克服の戦略につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to identify tumor endothelial marker (TEC marker) that is involved in drug resistance, drug sensitivity to anti-cancer drug was analyzed using siRNA or inhibitor of TEC markers. The inhibitor of p-glycoprotein encoded by MDR-1 gene, enhanced sensitivity to paclitaxel, in vitro and in vivo. These results suggested that inhibition of TEC markers are possible strategy to overcome drug resistance.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 がん幹細胞 薬剤抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

がん治療における薬剤耐性は治療の奏功を左右する重要な因子であり、がんの再発や予後不良に大きく関わる。これまで薬剤耐性はがん細胞が獲得するものであり、その獲得機構を解明し薬剤耐性を克服することを目的に研究が進められてきた。これまでがん細胞において薬剤排出に関わる Multi drug resistance gene (MDR1) や Multi drug related protein (MRP) などの ABC トランスポーターの発現亢進が薬剤耐性に重要であることや、CD90 や ALDH などの幹細胞マーカーの発現を亢進しているがん幹細胞が薬剤耐性を持つことなど、多くの報告がある。

がん間質における腫瘍血管は、腫瘍の進展や転移に重要な働きを担っており、腫瘍血管を標的とする血管新生阻害療法が癌の治療戦略として用いられている。しかし近年、この血管新生阻害療法に対しても薬剤耐性が生じることが報告されてきた。しかも、これまでがん細胞が分泌する血管新生増殖因子の種類をかえることが薬剤耐性の原因だと考えられてきたが、最近われわれは驚くべきことに腫瘍血管内皮細胞自身も薬剤耐性を持つことを報告した。しかしながら腫瘍血管内皮細胞における薬剤抵抗性のメカニズムは未だ不明な点が多く、その克服方法は解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、腫瘍血管内皮細胞マーカーとして浮かび上がってきた薬剤耐性関連分子の阻害による薬剤耐性の克服の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管内皮細胞の分離培養:

マウス血管内皮細胞の分離培養: ヌードマウスにヒト腫瘍細胞を皮下移植し、腫瘍塊から腫瘍血管内皮細胞 (TEC) を、正常マウス皮膚からは正常血管内皮細胞 (NEC) を分離・培養する。腫瘍血管内皮細胞は腫瘍組織中の細胞のうち 2%前後しかおらず、希少である。PCR 法とフローサイトメーターを用いて、分離した血管内皮の特性解析をおこなう。(分離後の血管内皮細胞が血管内皮マーカーを発現し、ヒト癌細胞および他細胞の混入がないことを確認する。)

#### (2) 腫瘍血管内皮細胞特異マーカーの発現解析:

分離培養した TEC, NEC から RNA を抽出し、Real-time PCR 法により、TEC と NEC における薬剤耐性、および幹細胞関連腫瘍血管内皮マーカーの遺伝子発現解析・比較を行う。

#### (3) TEC における腫瘍血管内皮マーカーの阻害、およびノックダウン後の薬剤感受性解析:

TEC における腫瘍血管内皮マーカーに対する阻害剤もしくは siRNA を用いて *in vitro* で TEC の抗がん剤や血管新生阻害剤に対する薬剤感受性解析 (MTS アッセイ、アポトーシス解析など) を行い、TEC の薬剤耐性克服に重要な特異的マーカーおよび阻害薬をパスウェイ解析ソフト IPA を用いて見つけ出す。

#### (4) 腫瘍血管特異マーカーの *in vivo* 発現解析:

*in vitro* で見出した腫瘍血管内皮マーカーの

発現を *in vivo* マウス皮下移植腫瘍組織、およびヒト臨床検体をもちいて免疫染色で腫瘍血管におけるタンパク発現を解析し、腫瘍血管内皮マーカーが *in vivo* 治療実験における標的となるかどうかを検討する。

#### (5) 腫瘍血管特異マーカー阻害剤および siRNA を併用した血管新生阻害療法の有効性の検討:

マウス皮下移植腫瘍モデルにおいて血管新生阻害療法単独群と *in vitro* での検討で挙げられた腫瘍血管特異マーカー阻害剤および siRNA の併用群を比較し、抗腫瘍効果が得られるか検討をおこなう。阻害剤は腹腔内注射によって、siRNA は腫瘍組織内へ直接、もしくは尾静脈注射によって投与する。腫瘍血管内皮の血管新生阻害効果を、腫瘍径、血管密度、腫瘍細胞および腫瘍血管におけるアポトーシス細胞の数で評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) 腫瘍血管内皮細胞の分離・培養

TEC と NEC をそれぞれ CD31+CD45<sup>-</sup> 分画として分離した。培養後に PCR 法ならびにフローサイトメーターにより分離された細胞が純度の高い血管内皮細胞であることを確認した。

#### (2) 腫瘍血管内皮細胞特異マーカーの発現解析:

分離培養した TEC, NEC から RNA を抽出し、Real-time PCR 法により、TEC と NEC における薬剤耐性、および幹細胞関連腫瘍血管内皮マーカーの遺伝子発現解析・比較を行う。MDR1, IL6, ALDH, CD90 などの発現も高いことが見出された。

#### (3) TEC における腫瘍血管内皮マーカーの阻害、およびノックダウン後の薬剤感受性解析:

TEC における MDR にコードされる p-glycoprotein に対する阻害剤 verapamil を用いて *in vitro* において腫瘍血管のパクリタキセルに対する感受性が増強すること、ほかの TEC マーカーとして、ALDH に関しては siRNA を用いて抗がん剤感受性を調べたが、パクリタキセルや 5-FU に対しての感受性には違いが見られなかった。一方、IL6 に関しても各種薬剤に対する抵抗性がその阻害によりキャンセルされることがわかった。

#### (4) 腫瘍血管特異マーカーの *in vivo* 発現解析:

*in vitro* で見出した腫瘍血管内皮マーカーの発現を *in vivo* マウス皮下移植腫瘍組織、およびヒト臨床検体をもちいて免疫染色で腫瘍血管におけるタンパク発現を解析し、腫瘍血管内皮マーカーが *in vivo* 治療実験における標的となるかどうかを検討する。

#### (5) 腫瘍血管特異マーカー阻害剤血管新生阻害療法の有効性の検討:

マウス皮下移植腫瘍モデルにおいて血管新生阻害療法単独群と verapamil 併用群においてパクリタキセルを用いたメトロノミックケモセラピーによる血管新生阻害作用を検討した。Verapamil 併用群においてより大きな抗腫瘍効果が認められた。血管新生も阻害され、がんの転移も抑制された。

## 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5件)

Hida K., Maishi N., Torii C., Yanagiya M., Annan Akuba-Muhyia Dorcas., Morimoto M., Alam Mohammad Towfik: Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells. *Hokkaido J. Dent. Sci.* 37:40-48, 2016.

掲載確定, 査読あり

<http://hdl.handle.net/2115/63416>

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Yamamoto K., Kawamoto T., Inoue N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep.* 6, 28039, 2016. 掲載確定, 査読あり DOI:10.1038/srep28039

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.: CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836 2015 査読あり DOI: 10.1002/ijc.29655

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 査読あり DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017

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*, 105(12), 1533-1540, 2014 査読あり DOI: 10.1111/cas.12549.

### [学会発表](計9件)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via biglycan, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, (Sheraton Boston Hotel, Boston, Massachusetts, USA) (国際学会)

Hida K., Torii C., Maishi N., Morimoto M., Akiyama K., Kawamoto T., Minami T., Yoshioka Y., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Ochiya T.: Tumor

endothelial cells acquire drug resistance by exosomal-miR derived from high metastatic tumor, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, (Sheraton Boston Hotel, Boston, Massachusetts, USA) (国際学会)

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" (国際学会) 2016.2.17 (Maui, Hawaii, USA)

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 (国際学会) 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 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: 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 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 山本和幸, 川本泰輔, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移促進, 第110回北海道癌談話会例会, 2014.9.13 札幌医科大学(北海道・札幌市)

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, Kyoto, Japan (国際学会)

Alam Mohammad Towfik, Nagao H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: SBSN is a novel Tumor Endothelial Cell marker, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Kyoto, Japan (国際学会)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

アラム M. トウフィック (Alam Mohammad Towfik)

北海道大学・歯学研究科・学術研究員  
研究者番号： 60641694