

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15726

研究課題名(和文) 腫瘍血管由来miRNAの同定とがん診断・治療への応用

研究課題名(英文) Identification of tumor vascular miRNA and application to cancer diagnosis and therapy

研究代表者

佐藤 和代(栗林和代)(Sato (Kuribayashi), Kazuyo)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：70455674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍血管の異常性獲得メカニズムに関与するmiRNAを同定し、それらのがんの浸潤・転移との関連などを明らかにし、新たながんの診断・治療法の開発につなげることを目的とした。がん細胞由来exosomeを血管内皮細胞に処理し発現が亢進するmiRNAについて機能解析をおこなった。そのうえで腫瘍血管内皮のmiRNAの標的分子の同定をmiRNAの標的分子の候補をデータベースによりピックアップしその標的分子の機能を調べ、これらの遺伝子の発現低下が腫瘍血管の特性にどのように関わるのかについて解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have tried to identify miRNAs which are involved in tumor vessel abnormality and to evaluate their roles in tumor invasion and metastasis, in order to develop novel cancer diagnostics and therapy. Endothelial cells were treated by cancer-derived exosome. Several miRNAs were upregulated and their function were analyzed. Using miRNA database, the target gene of these miRNAs were picked up and the involvement of these target molecule in tumor vessel abnormality were addressed.

研究分野：口腔外科学

キーワード：がん 腫瘍血管 miRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、がん微小環境を構成する血管結合組織（間質）の細胞は正常細胞と異なること、さらにそれらががんの悪性化にも関与していることが認識されている。これまで申請者らは腫瘍血管内皮細胞を世界に先駆けて分離・培養して、染色体異常や薬剤耐性をもつことなど (2004 *Cancer Res*, 2009 *Am J Pathol*)、正常血管内皮細胞とは明らかに異なる性質を呈することを明らかにした (2005 *Cancer Res*, *Brit J Cancer* 2011, *Am J Pathol* 2012)。これまで、がん微小環境で腫瘍血管内皮細胞が異常性を獲得するメカニズムに関して研究を進めてきたが、がん細胞培養上清処理が正常血管内皮にも異常性をもたらすという事実を見出している (*Am J Pathol* 2012)。一方、がん細胞は直径が数 nm ~ 数 μm である小胞体 (exosome) を分泌していることが知られており、がん細胞は自らの増殖に都合の良い環境をつくりだすためにこれら小胞体を分泌して、周囲間質細胞を変化させている可能性が示されている。さらに、申請者らのグループはがん exosome のエンドサイトーシスによる取り込みが血管内皮の異常性のメカニズムの一部であることを発見した (*PLoS One* 2012)。また exosome には癌種により異なる miRNA が含まれていることを既に見出している。腫瘍血管はがん細胞を養い、また悪性化に関与していることから、その多様性の獲得機構の解明とその制御が、がんの制圧には重要であると考えられる。今回、腫瘍血管の異常性のメカニズムのひとつとしてがん由来因子によって発現変動する miRNA の関与に着目した。

2. 研究の目的

がん微小環境を構成する血管は、がんの進展ならびに治療の経過と共にダイナミックに変化し、正常血管とは異なる多様な性質をもつことが知られるようになった。さらにこれらの性質の獲得にはがん細胞由来の小胞体 (マイクロベシクルやエクソソーム) の取り込みが関与していることを見出した。これらの中には miRNA が含まれていることが知られているが、われわれはがんの悪性度の違いでエクソソーム中の miRNA の量も異なることを見出している。本研究では腫瘍血管の異常性獲得メカニズムに関与する miRNA を同定し、それらががんの浸潤・転移との関連などを明らかにし、新たながんの診断・治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1. 悪性度の異なるがんから血管内皮細胞を分離し、抽出したマイクロ RNA (miRNA) のマイクロアレイを実施する。
2. 悪性度の異なるがんから exosome を精製し、抽出したマイクロ RNA (miRNA) のマイクロアレイを実施する。
3. 同定された miRNA の標的分子の同定とがんの悪性度と miRNA、標的分子の発現量との関連の解析
4. がん患者血液に含まれる上記で同定された miRNA の検出

4. 研究成果

悪性度の異なる2種類のがん細胞の培養上清から、それぞれ exosome を回収し、そこから miRNA を抽出し、miRNA アレイにて網羅的発現解析を行った。悪性度の高いがん細胞由来 exosome を血管内皮細胞に処理し miRNA 発現が亢進する miRNA (現在論文特許出願準備中) について機能解析をおこなった。そのうえで腫瘍血管内皮における当該 miRNA の標的分子の同定を miRNA の標的分子の候補をデータベース miRanda によりピックアップした。さらに当該 miRNA のアンチセンスによる阻害、pre-miRNA の導入などに標的分子の mRNA の発現レベルが低下するののかについて検証し、網羅的なシグナル解析ソフトウェアである Ingenuity Systems Pathway Analysis (IPA) を用いてがん間質細胞 miRNA の標的分子の機能を調べ、これらの遺伝子の発現低下が間質細胞の機能にどのように関わるのかについて解析を行った。遺伝子発現上昇にどのように関わるのかを細胞増殖能、遊走能、アポトーシスアッセイにより解析をおこなった。特に今回興味深いことに腫瘍血管内皮に発現が亢進する miRNA のうちアノキス抵抗性に絡むもの、また血管内皮の接着能亢進につながるものをピックアップすることができた。また、今回同定された miRNA のうち一つに関しては悪性腫瘍の患者血清における検出も試みた。がん患者において明らかに健常者よりも高いレベルで検出された。本研究により腫瘍血管の異常性のメカニズムのひとつとしてがん由来因子によって発現変動する miRNA の関与が明らかとなり、腫瘍血管の多様性を示すバイオマーカーとしての miRNA のがんの診断さらに治療法への応用の可能性が示唆された。

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 12 件)

Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K. Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 37, 1219-1226, 2017 査読あり

doi: 10.21873/anticancer.11437

*Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K, Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M. Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1. *J Oral Biosci*, 59(2017), 50-54, 2017. 査読あり

doi.org/10.1016/j.job.2016.10.004

*Hida K., Maishi N., Kawamoto T., Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Yamada K., Hojo T., Kikuchi H., Sato M., Torii C., Shinohara N., Shindoh M. Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels. *Pathol Int*. 66(12), 687-694, 2016. 査読あり

DOI: 10.1111/pin.12474

*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. 査読あり

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. 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. : CXCL 12-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

Ohga N., Sato J., Asaka T., Moritomoto M., Yamazaki Y., Kitagawa Y. : Successful conservative treatment of osteonecrosis of jaw caused by denosumab in patients with multiple bone metastasis. *Journal of oral science 2017 in press*. 査読あり

Shimizu R., Ohga N., Miyakoshi M., Asaka T., Sato J., Kitagawa Y. : Unusual maxillary osteoblastic and osteolytic lesions presenting as an initial manifestation of childhood acute myeloid leukemia: a case report. *Quintessence Int*, 48(2), 149-153, 2017 査読なし

doi: 10.3290/j.qi.a37383.

Sakata K., Yamazaki Y., Kuroshima T., Ohga N., Satoh C., Sakakibara N., Kitagawa Y. : A case of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma of the cheek. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 2017 in press*. 査読あり

足利雄一, 栗林和代, 大廣洋一, 小野貢伸, 鄭 漢忠 : 口腔内多発癌の臨床的検討 .北海道歯学雑誌 37(1) ,20-24 ,2016 . 査読あり

山田珠希, 栗林和代, 大廣洋一, 篠原早紀, 松田光平, 鈴木豊典, 北村哲也, 進藤正信, 鄭 漢忠 : 下顎骨骨髓から発生したと考えられた巨大な悪性リンパ腫の1例 ,北海道歯学雑誌 ,36(2):134-141 , 2016

〔学会発表〕(計 10 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)

間石奈湖, 樋田京子 : 第75回日本癌学会

学術総会特別シンポジウム2「癌研究における女性研究者」，“腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進”，2016.10.7(パシフィコ横浜(横浜市))招待講演
間石 奈湖、樋田 京子：第69回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム「酸化ストレスと発がん～最新の知見～」，“活性酸素が腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響”，2016.8.31(仙台国際センター(仙台市))招待講演

Maishi N. : Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2016.3.30 (Breckenridge, Colorado, 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” 2016.2.17

(Maui, Hawaii, 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, 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，樋田泰造，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)

Maishi N., Hida K. : Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors, Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization (招待講演)(国際学会) 2015.5.13 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府・吹田市)

間石 奈湖，樋田京子：第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会，“腫瘍血管内皮のがん転移促

進機構”(招待講演)2015.1.30 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)
佐藤和代，大廣洋一，足利雄一，小野貢伸，北村哲也，進藤正信，鄭 漢忠：局所進行口腔扁平上皮癌における術前DOC・CDDP同時併用化学放射線療法の治療効果，第69回日本口腔科学会学術集会，2015.5.14，大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

〔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

佐藤 和代 (KAZUYO SATO)
北海道大学・歯学研究院・助教
研究者番号：70455674

(2) 研究分担者

間石 奈湖 (NAKO MAISHI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：00632423

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

大賀 則孝 (NORITAKA OHGA)

北海道大学・歯学研究院・助教
研究者番号：10609100

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()