

平成23年5月20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：2009～2010

課題番号：21890006

研究課題名（和文） 緑茶カテキンによる腫瘍血管を標的とした新たながんの治療の試み

研究課題名（英文） Inhibitory Effects of Epigallocatechin-3 Gallate, a catechin in Green Tea, on Tumor-Associated Endothelial Cells

研究代表者

大賀 則孝 (OHGA NORITAKA)

北海道大学・大学院歯学研究科・特任助教

研究者番号：40548202

研究成果の概要（和文）：

近年、緑茶カテキンEGCGは、がんに対する抑制効果を示すことから注目されている。しかし、腫瘍血管内皮細胞（TEC）と血管内皮前駆細胞（EPC）に対する効果は依然不明である。本研究で、EGCGによるTECとEPCへの直接作用を検討した結果、遊走能が抑制され、Aktのリン酸化の抑制がみられた。ヒト腫瘍細胞皮下移植モデルにおいて、コントロール群に比べ、EGCG治療群は、腫瘍抑制効果ならびに腫瘍血管の減少を示した。これらの結果より、EGCGがTECとEPCへの直接的な抑制作用をもつ腫瘍血管新生阻害剤として応用が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The epigallocatechin-3 gallate (EGCG) in green tea suppresses tumor growth, but it is not known whether it specifically inhibits tumor angiogenesis. We examined the anti-angiogenic effect of EGCG on tumor-associated endothelial cells (TECs), EPCs, and normal endothelial cells (NECs). TECs were isolated and cultured from human tumor xenografts in nude mice. EGCG suppressed the migration of TECs and EPCs. EGCG also inhibited the phosphorylation of Akt in EPCs. MMP-9 in the bone marrow is involved in mobilizing bone marrow-derived VEGFR-2 positive cells into peripheral circulation. Expression of MMP-9 mRNA was suppressed in bone marrow stromal cells by EGCG. In vivo model, EGCG reduced melanoma growth. Our study showed that EGCG has anti-angiogenic effects. EGCG is a promising angiogenesis inhibitor for cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	750,000	225,000	975,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

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：緑茶カテキン、腫瘍血管新生、血管内皮前駆細胞、血管新生阻害薬

1. 研究開始当初の背景

世界中で嗜好されている緑茶の主成分であるカテキンの一つであるエピガロカテキンガレート(Epigallocatechin-3 Gallate : EGCG)は腫瘍細胞に対する抑制効果をもつことで広く知られている。また、緑茶の飲用は動物モデルでいくつかの癌の増殖を抑えることが知られている。

腫瘍血管新生は腫瘍の進展、転移にも深く関与している。腫瘍の血管は腫瘍組織に栄養や酸素を供給し、腫瘍の進展と成長には、必要不可欠である。また、腫瘍細胞が遠隔転移をする際には血管は関門の役割を果たして、転移にも大きな役割を果たしている。

このような腫瘍内の血管を攻撃して腫瘍を兵糧攻めにする血管新生阻害療法は新たながんの治療法としてとして現在注目されている新たな治療法である。

2. 研究の目的

緑茶カテキン EGCG(エピガロカテキンガレート)の腫瘍血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell:EPC)に対する影響を検討し、安全で安価な新規抗腫瘍治療薬への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍血管内皮細胞と正常皮膚血管内皮細胞の分離、培養、特性解析(フローサイトメーター、PCR による解析、チューブ形成能アッセイ)を行う。

(2) 緑茶カテキン EGCG の腫瘍血管内皮細胞の生物学的活性(増殖、遊走能)に対する影響を検討する。

(3) 緑茶カテキン EGCG の腫瘍血管内皮での細胞内シグナリング(PI3K 経路、Akt)に対する影響を解析する。

(4) 血管内皮前駆細胞(EPC)の末梢血への動員に関与していることが知られている骨髓間質ストローマ細胞を分離する。

骨髓間質ストローマ細胞に0, 25, 50, 100uMのEGCGを添加し、EPCの動員に関与している骨髓ストローマ細胞のMMP-9の発現を解析する。

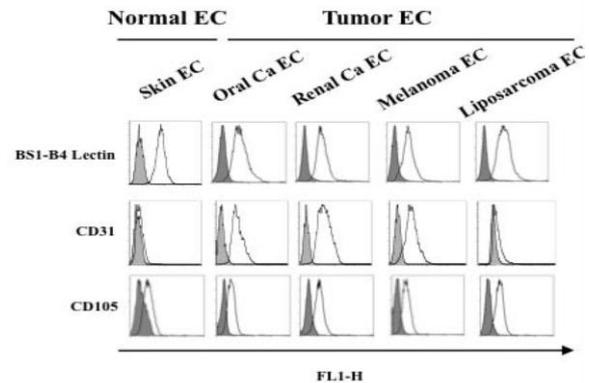
(5) ノードマウスに高転移性の腫瘍由来血の悪性黒色種を皮下移植後、EGCGを腹腔に投与し、治療実験を行う。

4. 研究成果

(1) 非常に分離・培養が困難であるとされていたヒト腫瘍細胞を皮下移植したノードマウスモデルからの腫瘍血管内皮細胞(口腔癌、腎癌、メラノーマ由来)の分離・培養を、申請者らが確立した手技により、純度の高い血管内皮を分離することができた。分離直後、直ちに分離細胞の再解析をフローサイトメーターも用い、血管内皮マーカーである CD31 が

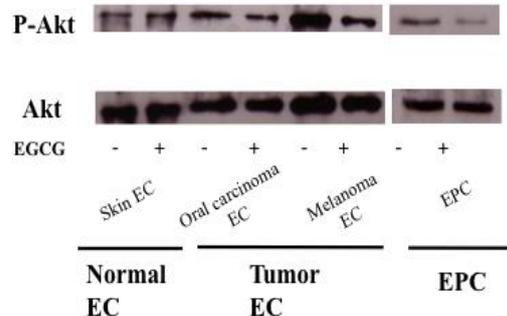
95%以上であることを確認した。

培養後、フローサイトメーターを用い、血管内皮マーカー(CD31、CD54、CD105、CD144など)の発現を確認した。また、分離・培養した血管内皮の管腔形成能を確認できた。

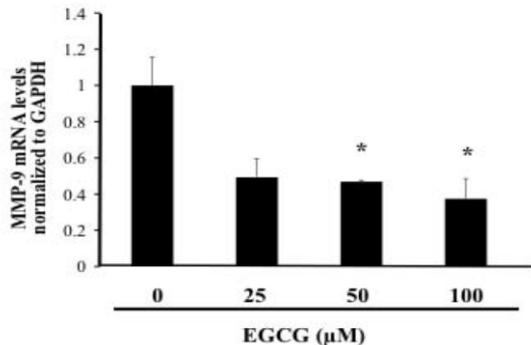


血管内皮前駆細胞 EPC として、nude mouse の末梢血から、シヨ糖勾配法により単核球分画を回収し、フィブロネクチンコート上の dish で培養された細胞を用いた。

(2) このようにして分離・培養した血管内皮細胞を in vitro で解析した。緑茶カテキン EGCG が、腫瘍血管内皮細胞の増殖、遊走に与える影響を検討した。また、緑茶カテキン EGCG が、血管内皮細胞の生存シグナル伝達系において重要な役割を担っている Akt、Erk に与える影響についても解析できた。緑茶カテキン EGCG は、正常血管内皮に比べ、腫瘍血管内皮(口腔癌血管内皮細胞:Oral Carcinoma EC、メラノーマ由来血管内皮細胞:Melanoma EC)と血管内皮前駆細胞(EPC)の増殖と遊走を抑制し、生存シグナル PI3K 経路のキープレーヤーである Akt ならび MAPK 経路の Erk のリン酸化を腫瘍血管内皮で特異的に抑制した。

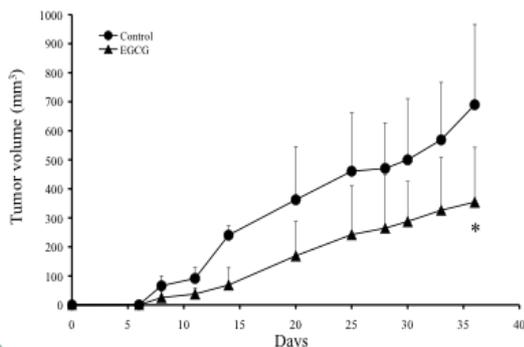


(3) 口腔癌担癌ヌードマウスの骨髄から分離培養された骨髄stromal cellにおける、EGCGによりMMP-9の発現が抑制された。



(4) ヒト高転移性メラノーマ細胞皮下移植モデルにおいて、緑茶カテキンEGCGによる治療実験を行った。コントロール群に比較して、緑茶カテキンEGCG投与群では、腫瘍の増殖が有意に抑制された。これらの腫瘍の凍結切片を血管内皮マーカーであるCD31で免疫染色を行った。EGCG投与群では、血管数が減少し、定量的解析により微小血管密度(Micro Vascular Density:MVD)は有意に減少していた。

(5) まとめ



緑茶カテキン EGCG が腫瘍血管内皮、血管内皮 EPC に対する抑制作用を有する、腫瘍血管新生阻害剤として単独もしくは他の治療法との併用で、応用が可能であることが示唆された。

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 9 件)

①Muraki C., Ohga N*, Hida Y., Nishihara H., Kato Y., Tsuchiya K., Matsuda K., Totsuka Y., Shindoh M. and Hida K.: Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells, *Int J Cancer*, 査読有、in press, 2011
*equally contributed

②Kurosu T., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Akiyama K., Kakuguchi W., Kuroshima T., Kondo M., Akino T., Totsuka Y., Shindoh M., Higashino F. and Hida K.: HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing mRNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium, *Br J Cancer*, 査読有、104(5), 819-829, 2011

③Hida K., Ohga N., Kurosu T., Totsuka Y. and Shindoh M.: Crosstalk between blood vessels and tumor microenvironment, *Oral Sci Int*, 査読有、7(1), 1-10, 2010

④Kajimoto K., Hossen MN., Hida K., Ohga N., Akita H., Hyodo M., Hida Y. and Harashima H.: Isolation and Culture of Microvascular Endothelial Cells from Murine Inguinal and Epididymal Adipose Tissue, *J Immunol Methods*, 査読有、357(1-2), 43-50, 2010

⑤Matsuda K., Ohga N*, Hida Y., Muraki C., Kurosu T., Tsuchiya K., Akino T., Shih SC, Totsuka Y., Klagsbrun M., Shindoh M. and Hida K.: Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、394, 947-954, 2010
*equally contributed

⑥Suzuki Y., Ohga N., Morishita Y., Hida K., Miyazono K., and Watabe T.: BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo, *J Cell Sci*, 査読有、123(10), 1684-1692, 2010

⑦Tsuchiya K., Hida K*, Hida Y., Muraki C., Ohga N., Kondo T., Miseki T., Nakagawa K, Shindoh M., Harabayashi T., Shinohara N., Nonomura K. and Kobayashi M.: Adrenomedullin antagonist suppresses tumor formation in renal cell carcinoma through inhibitory effects on tumor endothelial cells and endothelial

progenitor mobilization, *Int J Oncol*, 査読有、36(6), 1379-1386, 2010

⑧Hida K*, Ohga N., Hida Y. and Shindoh M.: Significance of Antiangiogenic Therapy in Head and Neck Cancer-Heterogeneity of Tumor Endothelium. *Jpn Dent Sci Review*, 査読有、46, 26-32, 2009

⑨Ohga N., Hida K*, Hida Y., Muraki C., Tsuchiya K., Matsuda K., Ohiro Y., Totsuka Y. and Shindoh M.: Inhibitory Effects of Epigallocatechin-3 Gallate, a Polyphenol in Green Tea, on Tumor-Associated Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells. *Cancer Sci*, 査読有、100(10), 1963-1970, 2009

[学会発表] (計4件)

①大賀則孝: 緑茶カテキン EGCG は腫瘍血管内皮細胞ならびに血管内皮前駆細胞に対する抑制効果を有する、平成22年6月24日、第64回日本口腔科学会学術集会、札幌プリンスホテル (札幌)

②大賀則孝: 緑茶ポリフェノールは腫瘍血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞に対する抑制抗効果を有する、第54回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成21年10月9日、札幌コンベンションセンター (札幌)

③大賀則孝: 緑茶ポリフェノール EGCG は腫瘍血管内皮に対する制御効果を有する、第17回日本血管生物医学会、平成21年10月9日、東京大学安田講堂 (東京)

④大賀則孝: 緑茶ポリフェノール EGCG は腫瘍血管内皮に対する制御効果を有する、第68回日本癌学会学術総会、平成21年10月2日、パシフィコ横浜 (横浜)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

①名称: 腫瘍血管新生阻害剤
発明者: 樋田京子、樋田泰浩、大賀則孝
権利者: 北海道大学

種類: 特許出願
番号: 特願2010-062825
出願年月日: 平成22年3月10日
国内外の別: 国内

②名称: 腫瘍血管新生阻害剤
発明者: 樋田京子、樋田泰浩、大賀則孝
権利者: 北海道大学

種類: 特許出願
番号: 特願2010-062831
出願年月日: 平成22年3月10日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大賀 則孝 (OHGA NORITAKA)

北海道大学・大学院歯学研究科・特任助教

研究者番号: 40548202

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし