

令和元年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20555

研究課題名(和文) 活性酸素種の制御による腫瘍血管新生阻害の検討

研究課題名(英文) Tumor angiogenesis inhibition by regulation of reactive oxygen species

研究代表者

北條 敬之 (Hojo, Takayuki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60756691

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)：本研究では、われわれは活性酸素種(ROS)が腫瘍血管に蓄積していることと、ROSがVEGFやBiglycanなどの血管新生関連遺伝子の発現を亢進させ、TECの運動能亢進を引き起こすことを明らかにした。これらの遺伝子の中で、われわれはBiglycanというスモールロイシンリッチプロテオグリカンに着目した。Biglycanの受容体として知られているToll様受容体2および4の阻害は、ROSによって引き起こされるTECの運動能亢進をキャンセルした。また、Smad2/3がBiglycanの発現を制御していることも見出した。これらのことにより、ROSを制御することによる腫瘍血管新生阻害の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素種は、細胞死との関連が広く知られており、細胞を傷害する毒物として認識されてきた。そのため、老化や発がんなど多くの疾患の要因となっていることが数多く報告されている。一方で、がんにおいては、活性酸素種ががん細胞の転移能や治療抵抗性に関与するなどこれまでに数多く検討されているが、腫瘍血管での検討はほとんど行われていなかった。本研究により腫瘍血管内皮細胞の異常な血管新生能獲得にがん組織内の活性酸素種が影響することを解明し、それを制御することができたことは、がん治療の一助になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that reactive oxygen species (ROS) were accumulated in tumor blood vessels and ROS enhanced TEC migration with upregulation of several angiogenesis related gene expressions. Among these genes, we focused on Biglycan, a small leucine-rich proteoglycan. Inhibition of Toll-like receptors 2 and 4, known BIGLYCAN (BGN) receptors, cancelled the TEC motility stimulated by ROS. We also showed that Smad2/3 regulated Biglycan expression in TEC. These results indicated that regulation of ROS can inhibit tumor angiogenesis.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：腫瘍血管新生 活性酸素種 腫瘍血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍血管新生と腫瘍微小環境

腫瘍血管はがんへの酸素や栄養の供給を担っているため、腫瘍血管新生はがんの増大や転移に不可欠である。しかし、がん細胞からの過剰な VEGF (血管内皮増殖因子) などにより、無秩序な血管新生がおこり、走行が乱雑で未熟な漏れやすい血管が作られることから有効な血液循環が得られず、がん組織内は低酸素・低栄養状態に陥っていることが知られている。そのような環境では細胞内に活性酸素種 (ROS) が蓄積する。

(2) ROS とがん

活性酸素種は酸化ストレスの原因であり、細胞死を引き起こすことが広く知られている。しかし、がん細胞はその細胞死を回避し、活性酸素種をうまく利用して、抗がん剤抵抗性、増殖や転移の増悪など、がんの悪性化に深く関与させている。

(3) 腫瘍血管内皮細胞の特異性

申請者と共同研究先である血管生物学研究室では、これまで腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞と比較して、染色体異常をもつこと、特異遺伝子 (腫瘍血管内皮細胞マーカー) の発現が亢進していること、腫瘍血管新生に重要な増殖能、生存能、運動能が高いこと、薬剤抵抗性があることなど、様々な特異性をもつことを明らかにしてきた (*Hida et al. Cancer Res 2004*, *Matsuda et al. Biochem Biophys Res Commun 2010*, *Ohga et al. Am J Pathol. 2012*, *Akiyama et al. Am J Pathol. 2012* など)。また最近、腫瘍内の血管が低酸素に曝されると活性酸素種が蓄積され、それらが血管内皮細胞の染色体異常の原因となりうることを明らかにした (*Kondoh et al. Plos One 2014*)。さらに、腫瘍血管は活性酸素種が誘導する細胞死に抵抗性を示すことも報告されている (*Okuno et al. Nat Med. 2012*)。しかし、腫瘍血管内皮特異的な分子機構は未だ不明な点が多く、活性酸素種の関与についてもほとんど報告がない状況であった。

2. 研究の目的

われわれはこれまで得られてきた知見を踏まえ、腫瘍血管内皮細胞の異常な血管新生能獲得にがん組織内の活性酸素種が影響することを解明し、それを制御することができれば、がん制御の大きな一助となり得ると考えた。そして、現在の腫瘍血管新生阻害療法の限界を打破できる新しい治療法開発にもつながると考えられた。

3. 研究の方法

(1) in vivo 腫瘍血管における活性酸素の可視化

腫瘍血管が低酸素に曝されていることは低酸素プローブを用いて示したが、そこに活性酸素種が蓄積されているかどうかは明らかではない。活性酸素種に反応することにより赤色蛍光を発する DHE 試薬を用いて、in vivo 腫瘍血管における活性酸素種の蓄積を可視化する。

(2) 細胞内活性酸素量の測定

分離培養した腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の細胞内活性酸素量を比較する。具体的には、DHE 試薬を用いて、蛍光プレートリーダーもしくはフローサイトメトリーで検出し定量する。フローサイトメトリーの技術は習得済みである。さらに、低酸素 (1%O₂)・低栄養 (低血清培地) 培養や活性酸素誘導剤 (Pyocyanin) 処理により、細胞内活性酸素種量がどのように変化するかを検討する。

(3) 活性酸素種が腫瘍血管内皮細胞の血管新生能へ及ぼす影響の検討

血管内皮細胞に活性酸素種を蓄積させ、血管新生能に及ぼす影響を、Boyden chamber を用いた細胞遊走能アッセイにより検討する。

(4) 活性酸素種による血管内皮細胞の遺伝子発現変動解析

血管内皮細胞に活性酸素種を誘導し、活性酸素種が VEGF などの血管新生に関わる遺伝子や腫瘍血管内皮細胞マーカーとして報告されている遺伝子の発現に及ぼす影響を定量的 Real Time-PCR 法により解析する。

(5) 活性酸素種を介した細胞内シグナル伝達の解析

血管内皮細胞に活性酸素種を誘導し、活性酸素種が細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を、血管新生に重要な NF-κB、ERK シグナル経路を中心に Western blotting 法もしくは細胞免疫染色法により解析する。

(6) 抗酸化剤を用いた腫瘍血管内皮細胞の活性酸素種制御の検討

既存の抗酸化剤 (DPI) を用いて、腫瘍血管内皮細胞の活性酸素種が除去されうるかを DHE 試薬を用いてプレートリーダーおよびフローサイトメトリーにより解析する。次いで、抗酸化剤が上記で解析した血管新生関連遺伝子、腫瘍血管内皮マーカーならびに細胞内シグナル経路へ及ぼす影響を検討する。さらに、それらが腫瘍血管内皮細胞の高い運動能に及ぼす影響をも

たらずかを遊走能アッセイにより解析する。

(7) in vivo における腫瘍血管内皮の異常性獲得と活性酸素種との因果関係の検討

担癌マウスに既存の抗酸化剤 (DPI) を腹腔内投与し、上記で得られた結果を検討する治療実験を行う。腫瘍の大きさ、微小血管密度、腫瘍血管内皮細胞マーカー発現への影響などを検討する。

4. 研究成果

(1) in vivo 腫瘍血管における活性酸素の可視化

ヒト高転移性腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、その腫瘍塊から凍結切片を作成した。また、比較対象としてマウスの皮膚組織の凍結切片も作成した。それを活性酸素種に反応することにより赤色蛍光を発する DHE 試薬を用いて染色すると、マウスの皮膚血管と比較し腫瘍血管が強く染色され、腫瘍血管により多くの活性酸素種が蓄積していることが可視化できた。

(2) 細胞内活性酸素量の測定

分離培養した腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞を活性酸素種が蓄積するといわれている低酸素 (1%O₂)・低栄養 (低血清培地) 環境で培養することや活性酸素誘導剤 (Pyocyanin) 処理をすることによって、活性酸素種が蓄積していることを DHE 試薬で染色しフローサイトメトリーやプレートリーダーで解析可能であることが明らかとなった。

(3) 活性酸素種が腫瘍血管内皮細胞の血管新生能へ及ぼす影響の検討

血管内皮細胞に活性酸素種を蓄積させ、血管新生能に及ぼす影響を、Boyden chamber を用いた細胞遊走能アッセイにより、活性酸素種は血管内皮細胞の郵送能を更新させることが明らかとなった。

(4) 活性酸素種による血管内皮細胞の遺伝子発現変動解析

血管内皮細胞に活性酸素種を誘導し、活性酸素種が VEGF や腫瘍血管内皮細胞マーカーとして報告されている遺伝子の発現に及ぼす影響を定量的 Real Time-PCR 法により解析したところ、活性酸素種が VEGF や主翼血管内皮細胞マーカーである Biglycan の発現を亢進させることが明らかとなった。

(5) 活性酸素種を介した細胞内シグナル伝達の解析

血管内皮細胞に活性酸素種を誘導し、活性酸素種が細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を、Western blotting 法により解析したところ、活性酸素種のより血管新生に重要な NF-κB、ERK シグナル経路と Smad2/3 の経路が活性化されることが分かった。

(6) 抗酸化剤を用いた腫瘍血管内皮細胞の活性酸素種制御の検討

既存の抗酸化剤 (DPI) を用いることにより、活性酸素種が除去され、今まで観測できていた運動能の亢進、VEGF や Biglycan の発現亢進、NF-κB、ERK、Smad2/3 シグナル経路の活性化がキャンセルされることが明らかとなった。

(7) in vivo における腫瘍血管内皮の異常性獲得と活性酸素種との因果関係の検討

担癌マウスに既存の抗酸化剤である DPI を腹腔内投与することにより、腫瘍血管の活性酸素種の減少、微小血管密度の減少、腫瘍血管内皮細胞マーカーである Biglycan の発現抑制が起こることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Hojo T, Maishi N, Towfik AM, Akiyama K, Ohga N, Shindoh M, Hida Y, Minowa K, Fujisawa T, Hida K: ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells.

Oncotarget, 8(28): 45484-45495, 2017 (10人中1番目) 査読有

DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17567>

Hida K, Maishi N, Annan, D. A.-M, Kondoh M, Hojo T, Habiba U, Ohga N, Ishikawa K, Sato M, Torii C, Yanagiya M, Morimoto M, Hida Y: Aneuploidy of a murine immortalized endothelial cell line, MS1, *J Oral Biosci*, 59(1): 50-54, 2017 (13人中5番目) 査読有

DOI: <https://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 (13人中8番目) 査読有

DOI: <https://doi.org/10.1111/pin.12474>

[学会発表] (計 2 件)

Dorcas A. Annan, Maishi N., Soga T., Hojo T., Randa Dawood, Hida Y., Kikuchi H., Hida K. :
Tumor endothelial cells tolerate low pH environments by upregulating proton transporters , 第 5 回
がんと代謝研究会 in 札幌 , 2017

Annan Dorcas Akuba Muhyia , 間石奈湖 , 曾我朋義 , 北條敬之 , 樋田泰浩 , 菊地 央 , 樋田
京子 : Tumor endothelial cells are resistant to acidic environments , 第 49 回北海道病理談話会,
2016

〔 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 :
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 :
国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

<https://www.den.hokudai.ac.jp/vascular-biol-pathol/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :
ローマ字氏名 :
所属研究機関名 :
部局名 :
職名 :
研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 :
ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。