

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17101

研究課題名(和文)血管内皮細胞の異常性の獲得に対し低酸素環境が及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the effects of hypoxic environment on the acquisition of vascular endothelial cell abnormalities

研究代表者

近藤 美弥子 (Kodnoh, Miyako)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10631864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と比較して様々な異常性を獲得しているがその機序については明らかにされていない。腫瘍組織が陥っている低酸素環境が、正常血管内皮細胞に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。それには活性酸素種(ROS)が重要な役割を果たしている。低酸素条件下で培養した正常血管内皮細胞には異数性が見られ染色体異常をもたらす可能性が示唆された。また、腫瘍血管内皮細胞に見られる遺伝子発現変化と同様の挙動をしめした。低酸素で産生されるROSを制御することで特定の異常性の発現をすることが示唆された。腫瘍組織内において、異数性を示す血管内皮細胞と低酸素部位の位置的關係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織は低酸素環境に陥っているが、腫瘍内には血管新生が起こっている。この腫瘍内の血管内皮細胞を標的とした腫瘍の治療薬が使用されているが、現在使用されている治療薬は正常な組織の正常な血管内皮細胞にも影響を及ぼす副作用が存在する。正常血管内皮細胞が腫瘍血管内皮細胞の特異性を獲得する機序を解明することで、その差異を知ることができる。さらには、この特異性を明らかにすることで、さらに精度の高い、腫瘍の治療薬ができることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumor vascular endothelial cells have acquired various abnormalities as compared with normal vascular endothelial cells. The mechanism of the acquisition of the anomaly is often unknown. Tumor tissue is in a hypoxic environment, and it has been suggested that this hypoxic environment may affect normal vascular endothelial cells. We have also found that reactive oxygen species (ROS) may play an important role in the mechanism. The behavior of normal vascular endothelial cells under hypoxia was further investigated.

It was suggested that aneuploidy was observed in normal vascular endothelial cells cultured under hypoxic condition, which may cause chromosomal abnormality. In addition, under the conditions, it behaved similarly to the gene expression changes observed in tumor vascular endothelial cells. The positional relationship between aneuploid vascular endothelial cells and hypoxic sites in tumor tissues was clarified.

研究分野：歯科

キーワード：低酸素 血管内皮細胞 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、低酸素(Hypoxia)に陥っており、低酸素はがんの悪性度と関連していることが知られている。そのような低酸素環境では細胞は酸化ストレスに曝される。低酸素環境において産生される活性酸素種(ROS)は、過剰に蓄積すると細胞の遺伝子異常などを誘発することが知られている。腫瘍内では腫瘍細胞のみならず腫瘍血管もまた低酸素に曝されていることがあることが見いだされた。

一方近年、腫瘍血管内皮細胞(TEC)と正常血管内皮細胞(NEC)の間に性質の違いがあることがわかってきた。申請者らのグループでも以下のことを報告している。

TECが、上皮増殖因子レセプター(EGFR)の他にシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、血管内皮増殖因子(VEGF)、プロスタグランジン E2(PGE2)などの血管新生因子の発現が亢進していること
特異遺伝子を発現していること
ある種の抗がん剤に対して薬剤抵抗性をもつこと
染色体異常があること

しかしながら TEC の異常性獲得の機序に関しては未だ不明な点が多く、低酸素環境が血管内皮細胞に及ぼす影響について詳細な検討が必要とされている。

2. 研究の目的

腫瘍組織は過剰な細胞の増殖と不十分な血管新生により低酸素環境に陥っている。腫瘍細胞は低酸素環境において、細胞死の回避、薬剤抵抗性や浸潤能、転移能の亢進などを獲得する可能性が明らかになってきた。一方、申請者らはこれまでに、腫瘍内では腫瘍血管ですら低酸素に曝されている場合があることを見出した。腫瘍血管内皮細胞は染色体異常など、正常血管内皮細胞との間に性質の違いがあることが知られている。本研究では低酸素環境が血管内皮細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性に着眼し、血管内皮細胞の異常性獲得の機序を解析する。

3. 研究の方法

正常血管内皮細胞を低酸素培養条件において培養し、細胞増殖、遊走能、接着性、薬剤応答性、未分化能の獲得の有無を検証する。その際、低酸素環境のみならず腫瘍組織を模した環境設定を行う。我々はすでに低酸素環境が正常血管内皮細胞に対して、染色体の異常性の獲得を誘発する可能性を見いだしている。また、その機序において ROS が重要な役割を果たしている可能性も示唆してきた。以上を踏まえ、以下の検討を行った。

(1)低酸素培養条件における細胞の表現型の解析：血管内皮細胞の増殖能、郵送能、細胞の接着能、未分化能の維持、幹細胞性の獲得の有無、薬剤耐性の有無、染色体異常の獲得の有無などを解析する。

(2)表現型の変化に伴う遺伝子発現の変化の解析による腫瘍血管内皮マーカー候補分子の探索：低酸素環境による遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析によって確認し、腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現と比較検討する。発現が亢進、あるいは低下した分子を探索し Real time PCR 法で確認を行う。

(3)低酸素環境と活性酸素の関連の検討

低酸素培養条件において見出された異常性について低酸素環境で産生された ROS を抑制することでその遺伝子発現を妨げることができるか。細胞の表現型、それに伴う遺伝子発現の変化を解析する。

見出された異常性について、正常血管内皮細胞に ROS を誘導することでも誘発されるかを検討する。

結果をもとに、腫瘍血管内皮細胞の異常性が、ROS を抑制することによって変化するかを検討する。

4. 研究成果

我々はこれまでに通常酸素分圧下において高栄養の血管内皮細胞を用いて、腫瘍組織から腫瘍血管内皮細胞の分離、培養を行い その異常性、特異性を確認してきた。

さらに我々はすでに、低酸素環境が正常血管内皮細胞に対して、染色体の異常性の獲得を誘発する可能性を見いだしている、また、その機序において低酸素環境において産生される、活性酸素種(ROS)が重要な役割を果たしている可能性も示唆してきた。以上を踏まえ、低酸素条件における正常血管内皮細胞の挙動について検討を行った。

1)低酸素培養条件における細胞の表現型の解析：血管内皮細胞の増殖能、遊走能、細胞の接着能、未分化能の維持、幹細胞性の獲得の有無、薬剤耐性の有無、染色体異常性の獲得の有無など

を解析した。

2) 表現型の変化に伴う遺伝子発現の変化の解析による腫瘍血管内皮マーカー候補分子の探索：低酸素培養条件による正常血管内皮細胞の遺伝子発現変化を解析し、発現が亢進、あるいは低下した分子に関して、Real time PCR法で確認を行った。

3) 低酸素培養条件において見出された異常性について、低酸素で産生されるROSを抑制することでその誘発を妨げることが出来るか。細胞の表現型、それに伴う遺伝子発現の変化を解析し、検討した。

4) 見出された異常性について、正常血管内皮細胞にROSを誘導することでも誘発されるかを検討した。

5) 実験の結果をもとに、腫瘍血管内皮細胞の異常性が、ROSを抑制することによって変化するかを検討した。また、in vivo 腫瘍組織において血管内皮細胞の低酸素状態を解析するため、腫瘍の組織切片を用いて蛍光二重免疫染色を行い、腫瘍血管の低酸素性と、がんの悪性度との関連について比較検討を行った。ROSなどの発現因子についても検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 近藤美弥子, 中澤誠多朗, 岡田和隆, 松下貴恵, 山崎 裕,	4. 巻 32-1
2. 論文標題 行動療法により良好な経過をたどった高齢者味覚障害の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 北海道歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 17-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 59
2. 論文標題 Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Biosci	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.job.2016.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤美弥子
2. 発表標題 高齢者に対するインプラント撤去を含めた予後管理と、治療計画に関する提案
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----