

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19149

研究課題名(和文)腫瘍血管の異常性獲得に乳酸アシドーシスが及ぼす影響の検討

研究課題名(英文)The effect of lactic acidosis on the acquisition of abnormalities in tumor blood vessels

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と異なり乳酸アシドーシス下で増殖することを明らかにし、腫瘍血管ではin vitroおよびin vivoの両方でpH調節因子であるCAIIの発現が亢進していることを見出した。CAIIのノックダウンにより、乳酸アシドーシス下での腫瘍血管内皮細胞の生存率が低下した。VEGF-Aは、正常血管内皮細胞においてCAIIの発現を誘導した。アセタゾラミドによるCAIIの阻害は、in vivoでの腫瘍血管新生にはほとんど効果を示さなかったが、肺転移を減少させた。これらの知見から、CAIIのようなpH調節因子は、血管新生阻害療法のターゲットとなりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は有酸素下においても優先的に解糖系を利用することによりATPを産生する。このことはワールブルグ効果として古くから知られている。その結果、がん細胞は代謝産物として多くの乳酸を産生し、がん組織内は乳酸アシドーシスとなっている。乳酸アシドーシスは、免疫細胞に影響を与えてがんの悪性化のきっかけとなりうる事が知られている。一方、がん組織内の環境が腫瘍血管内皮細胞の腫瘍血管の異常性獲得に寄与していることをわれわれは報告してきたが、乳酸アシドーシスが及ぼす影響については不明であった。本研究により、腫瘍血管のpH調節因子が血管新生阻害療法の新たなターゲットとなりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The present study shows that, unlike normal endothelial cells (NECs), tumor endothelial cells (TECs) proliferate in lactic acidic. TECs showed an upregulated CAII expression both in vitro and in vivo. CAII knockdown decreased TECs survival under lactic acidosis conditions. Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor signaling induced CAII expression in NECs. CAII inhibition with acetazolamide minimally reduced tumor angiogenesis in vivo. However, acetazolamide-treated mice showed decreased lung metastasis. These findings suggest that pH regulators like CAII are promising targets of antiangiogenic therapy.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：腫瘍血管新生 乳酸アシドーシス 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳酸アシドーシスとがん

がん細胞は有酸素下においても優先的に解糖系を利用することにより ATP を産生する。このことはワールブルグ効果として古くから知られている。その結果、がん細胞は代謝産物として多くの乳酸を産生し、腫瘍微小環境は乳酸アシドーシスとなっている。乳酸は腫瘍関連マクロファージをがんの悪性化を引き起こす M2 型へ変化させたり、細胞傷害性 T 細胞の働きを抑制したりすることが知られている。このように、がんはワールブルグ効果により得た乳酸を利用して腫瘍微小環境に影響を与え、がんの悪性化に利用している。

(2) 腫瘍血管の異常性と腫瘍微小環境

申請者と共同研究先である北海道大学大学院歯学研究院血管生物分子病理学教室(樋田 京子教授)では、腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞と比較し特異遺伝子(腫瘍血管内皮マーカー)を発現亢進しており、それらの一部はエピジェネティックな変化によるものであること(Maishi et al. *Sci Rep* 2016)、血管新生能が亢進していることなど様々な特異性を明らかにしてきた。(Hida et al. *Cancer Res* 2004, Ohga et al. *Am J Pathol.* 2012, Akiyama et al. *Am J Pathol.* 2012 など) また、申請者は前回の若手研究(B)により、腫瘍血管内皮細胞が腫瘍微小環境の活性酸素種(ROS)を特異な経路で利用し TEC マーカーの一つである Biglycan の発現亢進を起こすことにより更なる血管新生能を獲得していることを明らかにした。(Hojo et al. *Oncotarget* 2017)

酸性環境や乳酸はそれぞれが血管内皮細胞に影響を与え血管内皮増殖因子(VEGF)の発現亢進や、NF- κ B の活性化を介して、遊走能や管腔形成能を亢進させたりすることが知られている。(D'Arcangelo et al. *Circ Res* 2000, Vegran et al. *Cancer Res* 2011)しかし、ワールブルグ効果で産生された乳酸によりどちらの影響も受ける乳酸アシドーシス環境での腫瘍血管内皮細胞に対する影響に関する報告は見当たらなかった。

2. 研究の目的

腫瘍血管内皮細胞の異常な血管新生能獲得機構へのがん組織内の乳酸アシドーシスの影響やその環境下で生存するための特異な pH 制御機構を解明することにより、腫瘍血管新生阻害療法の新たな糸口を見つけること。

3. 研究の方法

(1) 乳酸アシドーシスが腫瘍血管内皮細胞の血管新生能へ及ぼす影響の検討

血管内皮細胞を乳酸アシドーシス環境で培養し、血管新生能に及ぼす影響を、細胞死を検出する PI 試薬を用いた生存能アッセイ、細胞遊走能アッセイ、Matrigel を用いた管腔形成能アッセイ、MTS 試薬を用いた細胞増殖能アッセイにより検討する。

(2) 血管内皮細胞における pH 制御遺伝子の解析

血管内皮細胞において、がん細胞で発現亢進の報告がある pH 制御遺伝子(例: CAs, NHE1 など)の発現を定量的 Real Time-PCR 法により解析する。また、siRNA により標的遺伝子をノックダウンすることによる生存能や細胞遊走能の変化も上述の方法で解析する。

(3) 腫瘍微小環境が腫瘍血管内皮細胞における pH 制御機構に与える影響の解析

がん細胞を培養した培地で腫瘍血管内皮細胞を培養し、腫瘍微小環境が上述の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。

(4) *In vivo* 腫瘍血管における pH 制御分子の解析

上述の分子がどのように発現しているのかを、免疫染色により解析する。

(5) *In vivo* において pH 制御機構の阻害による腫瘍血管新生への効果の解析

腫瘍血管内皮細胞特異的な pH 制御機構を *In vitro* で特定し、その阻害薬などを用い *In vivo* で血管新生阻害効果や腫瘍増大阻害効果、転移抑制効果などを評価することにより解析する。

4. 研究成果

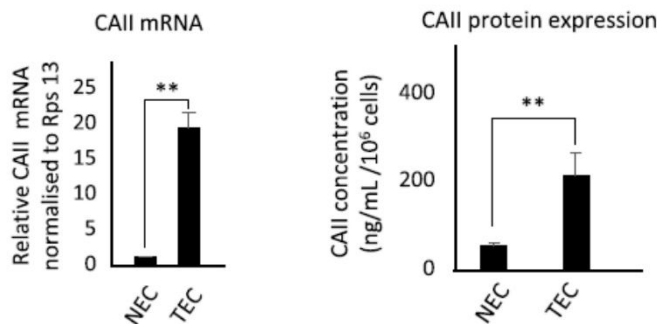
(1) 乳酸アシドーシスが腫瘍血管内皮細胞の血管新生能へ及ぼす影響の検討

血管内皮細胞を乳酸アシドーシス環境で培養し、MTS 試薬を用いた細胞増殖能アッセイを行ったところ、乳酸アシドーシス環境において、腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と異なり増殖することが明らかとなった。

(2) 血管内皮細胞における pH 制御遺伝子の解析

血管内皮細胞において、がん細胞で発現亢進の報告がある pH 制御遺伝子(例: CAs, NHE1 など)の発現を定量的 Real Time-PCR 法により解析したところ、正常血管内皮細胞と比較し腫瘍血

管内皮細胞において CAII の発現が亢進していた。腫瘍血管内皮細胞における CAII の発現亢進は ELISA 法によっても確認できた。

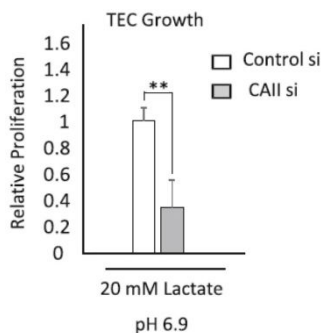


** : $p < 0.001$

NEC: 正常血管内皮細胞

TEC: 腫瘍血管内皮細胞

また、siRNA により腫瘍血管内皮細胞の CAII をノックダウンし、乳酸アシドーシス環境で培養し MTS 試薬を用いた細胞増殖能アッセイを行ったところ、ノックダウンにより細胞増殖能が抑制された。



** : $p < 0.001$

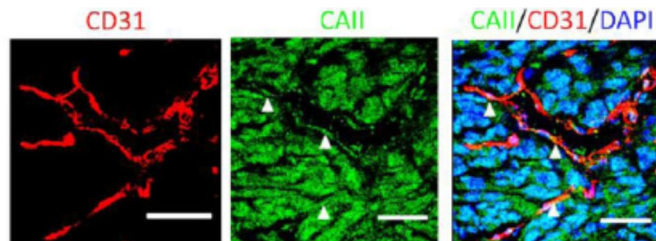
TEC: 腫瘍血管内皮細胞

(3) 腫瘍微小環境が腫瘍血管内皮細胞における pH 制御機構に与える影響の解析

がん細胞を培養した培地で正常血管内皮細胞を培養し、腫瘍微小環境が上述の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、CAII の発現が亢進した。

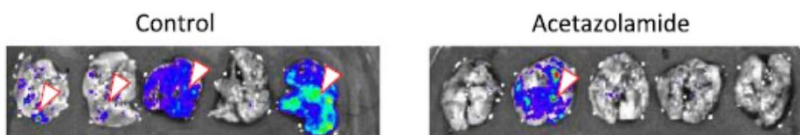
(4) *In vivo* 腫瘍血管における pH 制御分子の解析

CAII が *In vivo* 腫瘍血管においてどのように発現しているのかを、免疫染色により解析したところ、腫瘍血管 (CD31) に CAII が共染色され、CAII の発現が確認できた。



(5) *In vivo* において pH 制御機構の阻害による腫瘍血管新生への効果の解析

腫瘍血管内皮細胞特異的な pH 制御因子が CAII であったため、その阻害薬であるアセタゾラミドを用い *In vivo* で血管新生阻害効果や腫瘍増大阻害効果、転移抑制効果などを評価した結果、腫瘍血管新生阻害にはほとんど効果を示さなかったが、肺転移を減少させた。



青 : 肺転移

これらの知見から、pH 調節因子である CAII は、血管新生治療のターゲットとなりうることが示唆された。

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 2件）

1. 著者名 Maishi Nako, Kikuchi Hiroshi, Sato Masumi, Nagao-Kitamoto Hiroko, Annan Dorcas A., Baba Shogo, Hojo Takayuki, Yanagiya Misa, Ohba Yusuke, Ishii Genichiro, Masutomi Kenkichi, Shinohara Nobuo, Hida Yasuhiro, Hida Kyoko	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of Immortalized Human Tumor Endothelial Cells from Renal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4595 ~ 4595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Annan Dorcas A., Maishi Nako, Soga Tomoyoshi, Dawood Randa, Li Cong, Kikuchi Hiroshi, Hojo Takayuki, Morimoto Masahiro, Kitamura Tetsuya, Alam Mohammad Towfik, Minowa Kazuyuki, Shinohara Nobuo, Nam Jin-Min, Hida Yasuhiro, Hida Kyoko	4. 巻 17
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis in the tumor microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 169 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-019-0478-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Annan DA, Maishi N, Soga T, Hojo T, Hida Y, Hida K
2. 発表標題 Glutamine metabolism facilitates tumor endothelial cell proliferation via redox homeostasis
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maishi Nako., Dorcas A. Annan, Soga Tomoyoshi., Dawood Randa, Li Cong, Kikuchi Hiroshi., Hojo Takayuki., Morimoto Masahiro., Kitamura Tetsuya., Mohammad Towfik Alam, Shinohara Nobuo., Hida Yasuhiro., Hida Kyoko.
2. 発表標題 Carbonic anhydrase 2 (CA) is essential for tumor endothelial cell proliferation
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 2. Annan Dorcas A., Maishi Nako., Soga Tomoyoshi., Dawood Randa, Li Cong, Kikuchi Hiroshi., Hojo Takayuki., Morimoto Masahiro., Kitamura Tetsuya., Mohammad Towfik Alam, Minowa Kazuyuki., Shinohara Nobuo., Hida Yasuhiro., Hida Kyoko.
2. 発表標題 Carbonic anhydrase 2 (CAII) is essential for tumor endothelial cell proliferation
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 2. Annan Dorcas A., Maishi Nako., Soga Tomoyoshi., Dawood Randa, Li Cong, Kikuchi Hiroshi., Hojo Takayuki., Morimoto Masahiro., Kitamura Tetsuya., Mohammad Towfik Alam, Minowa Kazuyuki., Shinohara Nobuo., Hida Yasuhiro., Hida Kyoko.
2. 発表標題 Carbonic anhydrase 2 (CA) is essential for tumor endothelial cell proliferation under various metabolic conditions
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------