

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390506

研究課題名（和文） がん微小環境に着目した新たな腫瘍血管新生阻害療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel antiangiogenic therapy based on tumor microenvironment

研究代表者

樋田 京子 (HIDA KYOKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教授

研究者番号：40399952

研究成果の概要（和文）：

腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現しているマーカーをシグナル伝達経路、新規性などの観点からピックアップした。siRNAによるマーカーのノックダウンを行い、マーカーの発現抑制が及ぼす細胞への増殖・遊走能への影響を解析した。その後蛍光免疫2重染色によりおこない、ヒト腫瘍血管における発現を確認した。ヒトにも発現が認められたマーカーの阻害剤を用いたところ、*in vivo* 血管新生の抑制を伴う抗腫瘍効果をもとめた。腫瘍血管内皮特異マーカーを標的とする治療の実現が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To develop novel anti-angiogenic therapy reflecting on tumor microenvironment more, we compared gene expression between tumor endothelial cell (TEC) and normal endothelial cell (NEC) and identified TEC specific genes by DNA microarray analysis.

We picked up these genes and analyzed the function of these molecules in TECs by knock down using siRNA.

Knock down of some genes inhibited TEC survival and some inhibited cell migration on TEC. Furthermore, inhibition of several TEC markers showed tumor growth suppression *in vivo*. These results suggested that it enabled us to develop novel anti-angiogenic therapy targeting TEC specifically.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,300,000 | 1,890,000 | 8,190,000 |
| 2009年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 2010年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

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：血管新生阻害、腫瘍、微小環境、血管内皮

1. 研究開始当初の背景

これまでのがん化学療法または放射線治療の多くが、がん細胞を標的とした治療であったが、最近、腫瘍微小環境が正常組織とは異

なることが報告され、また癌の治療にはがん細胞のみでなく微小環境にある間質もあわせて標的とした方がより効果的であることが示唆され始めた。腫瘍の血管は腫瘍の進展

と転移に大きな役割を果たしている。世界で初めての血管新生阻害剤 Bevacizumab (商品名アバスタ)が 2004 年に承認され癌患者の延命をもたらした。しかし、その一方で、副作用の報告もなされている。申請者らは Tumor EC の分離と培養に世界に先駆けて成功した後に、Tumor EC が Normal EC とは様々な点で異なることを報告してきた (Hida K., et al. Cancer Re 2004).

理想的な血管新生阻害剤を開発するためには、Tumor EC のマーカーの同定が必須である。それは Tumor EC の分離によって初めて可能となる。そのことを目的として申請者は前回の基盤研究で 4 つの異なる腫瘍(口腔扁平上皮癌を含む)から純度の高い Tumor EC を分離することができた。さらに遺伝子の発現パターンを DNA microarray にて Normal EC と比較検討することまで研究を進めることができた。DNA microarray の 3 度の解析でしかも、4 つの Tumor EC に共通して発現亢進している遺伝子を汎腫瘍血管内皮マーカーとして重要なものとしてピックアップすることに成功している。驚くことに、これらのなかには 1000 倍以上も発現亢進している遺伝子や、新規の遺伝子などが含まれていた。全部で 5 倍以上発現亢進しているものが 70 遺伝子ピックアップされた。

2. 研究の目的

今回の研究目的は Tumor EC マーカーのうち中和抗体を作製できるものや、ワクチンを作成できるマーカーをピックアップし実際に作成、それらを Tumor EC と Normal EC を用いて効果をスクリーニングし、さらにはマウスの腫瘍モデルで血管新生阻害効果さらには抗腫瘍効果を確認し、実用化をはかることである。これらは現存する血管新生阻害剤よりもはるかに Tumor EC 特異性が高いことが予測され、また、がん細胞のみを攻撃する従来の治療法に併用、または単独で使用することで多くのがん患者の QOL 向上へとつながるものと思われる。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイのデータ解析

4 種類の Tumor EC ならびに Normal EC の mRNA 発現を Agilent DNA microarray chip を用いて比較した。Tumor EC に共通して発現の亢進している遺伝子群のうち、シグナル伝達経路ごとのグループ分け、さらには新規性など、

さらには未知の遺伝子に関しては gene cards などのデータベースを用いて、塩基配列から細胞表面タンパクか分泌タンパクかなどの予測を行い、Tumor EC マーカーとしての有用性の観点から、さらに追跡すべきものを絞り込んだ。

(2) 腫瘍血管内皮細胞の正常血管内皮との遺伝子発現の比較検討

上記で Tumor EC 特異マーカーとして絞り込まれたものに対する primer を作成し、Tumor EC ならびに Normal EC から RNA を抽出して cDNA を作製し、real-time PCR によって DNA microarray の結果を確認する。その際に実際にアレイに使った血管内皮以外に、他の腫瘍から分離した Tumor EC からの cDNA を用いて、Tumor EC マーカーの汎用性を探った。

(3) 腫瘍血管内皮マーカーの in situ における発現解析

上述のマーカーについてはその転写産物であるタンパクに対する抗体が市販されていれば、免疫染色によって in vivo における血管内におけるタンパクの発現の有無を確認した。

(4) 新しい腫瘍血管内皮マーカーの意義についての解析

ピックアップした Tumor EC マーカーの siRNA を作成し、それらが腫瘍血管の生物学的性質にどのような影響を及ぼすかを検討した。また、Tumor EC 特異に発現している蛋白に対する既知の中和抗体、kinase inhibitor などがすでに市販されていれば、それらを優先して調べる。また分泌タンパクに関しては血管新生阻害療法の奏功性を評価するバイオマーカーとしての有用性も解析した。

4. 研究成果

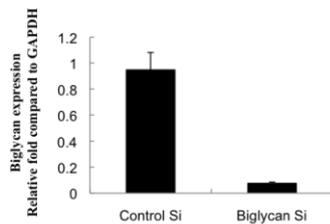
(1) 腫瘍血管内皮マーカーのピックアップ
4 種類の Tumor EC ならびに Normal EC の mRNA 発現の Agilent DNA microarray chip を用いたマイクロアレイによる比較により、これら Tumor EC に特異性のあるものをピックアップした。シグナル伝達経路ごとのグループ分け、さらには新規性など、さらには未知の遺伝子に関しては gene cards などのデータベースを用いて、塩基配列から細胞表面タンパクか分泌タンパクかなどの予測を行い、Tumor EC マーカーとしての有用性の観点から、さらに追跡すべきものを約 40 遺伝子にまで絞り込んだ。

(2) 腫瘍血管内皮マーカーの機能解析
創薬のターゲットとなるマーカーの絞り込

みをさらに行うために siRNA によるマーカーのノックダウンを行った。

初代培養の血管内皮にまずは siRNA を効率よく導入できる条件 (トランスフェクション試薬や条件)

を検討し、マーカーの発現抑制が及ぼす細胞への影響を解析した。そのうち先



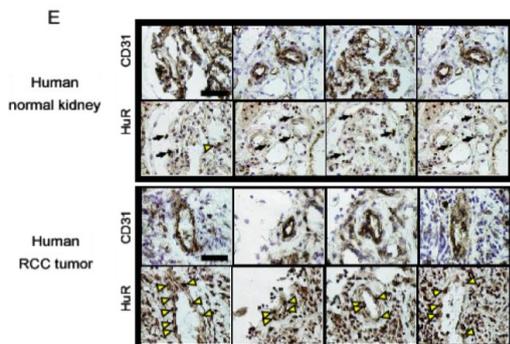
ず siRNA によりノックダウンが可能であった遺

(図 1) 腫瘍血管内皮マーカーノックダウンの例

伝子について先に生物学的な影響を見ることとした。siRNA によるノックダウンに成功した 13 遺伝子の解析を先行した。図 1 に示す biglycan 以外に LOX, VEGF-A, COX-2 などについても同様に分子の阻害を行い腫瘍血管内皮における機能を解析した。

(3) 腫瘍血管内皮マーカーの in situ における発現解析

上記の(2)と平行して, in vitro のみならず, in situ における腫瘍組織内の血管に腫瘍血管内皮マーカーの発現が認められるかについて抗体が市販されているものを優先して解析を進めた。免疫染色は北海道大学病院で悪性腫瘍と診断された症例の凍結切片を用いて行った。マウスの腫瘍血管内皮細胞を用いてピックアップされたマーカーのうち最低でも 10 の遺伝子が in situ においても腫瘍血管に発現していることが確認された。



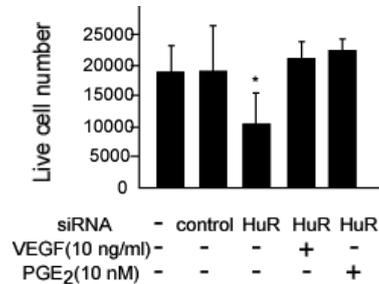
(図 2) 腫瘍血管内皮マーカーのひとつ HuR の腫瘍組織における発現解析

(4) 腫瘍血管内皮マーカー阻害による影響の解析

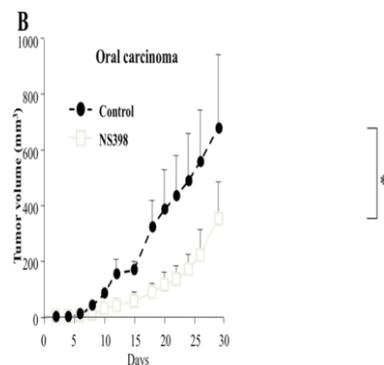
腫瘍血管内皮マーカーのうち siRNA によるノックダウンが可能であったものと市販の阻害剤の利用が可能であったものに関してマーカーの阻害が腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響について解析を進めた。

それぞれのマーカーによって血管内皮細胞の生存性に関わるもの 4 遺伝子, 遊走に関わる遺伝子が 6 つ認められた。

これらのことより, 確かに Tumor EC マーカーを標的として抗腫瘍効果をもたらす治療が成り立つことが示唆された。



(図 3) 腫瘍血管内皮マーカーのひとつ HuR のノックダウンが腫瘍血管内皮細胞の生存性を低下させた



(図 4) 腫瘍血管内皮マーカーのひとつ COX-2 の阻害が腫瘍の増殖を阻害した

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 14 件)

*責任著者

① Muraki 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

② Kurosu 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
- ③ Hida 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
- ④ Matsuda 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
- ⑤ Tsuchiya 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
- ⑥ Ohga 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
- ⑦ Akino T., Hida K.*., Hida Y., Tsuchiya K., Freedman D., Muraki C., Ohga N., Matsuda K., Harabayashi T., Shinohara N., Nonomura K., Klagsbrun M. and Shindoh M.: Cytogenetic Abnormalities of Tumor-Associated Endothelial Cells in Human Malignant Tumor. *Am J Pathol*, 査読有、175(6), 2657-2667, 2009
- [学会発表] (計 66 件)
- ① 樋田京子: 第 9 回口腔医科学フロンティア学術集会、がん微小環境内における腫瘍-血管の相互作用、2011. 3. 5、九州大学 (福岡)
- ② 樋田京子: The 8th Annual Meeting for the Japanese Association for Cancer and Hypoxia Research, “低酸素環境における腫瘍血管ダイナミクス”、2011. 1. 29、北海道大学 (札幌) (シンポジスト)
- ③ 樋田京子: 北海道大学・ソウル大学合同シンポジウム Innovative Nanomedicine based on functional nucleic acids ナノバイオが拓く次世代核酸医薬, “Crosstalk between Tumor Endothelial Cells and Microenvironment”、2010. 11. 26、北海道大学 (札幌) (シンポジスト)
- ④ 樋田京子: 第56回日本病理学会秋期特別総会、“Crosstalk between tumor endothelial cells and microenvironment”、2010. 11. 26、西日本総合展示場、北九州国際会議場 (北九州) (シンポジスト)
- ⑤ 樋田京子: 北海道大学大学院歯学研究科・全北大学校歯医学専門大学院姉妹校提携20周年記念学術講演会、“Crosstalk between blood vessels and tumor microenvironment”、2010. 10. 14、北海道大学 (札幌) (シンポジスト)
- ⑥ 樋田京子: 平成22年度北海道癌談話会秋季シンポジウム「腫瘍血管新生の基礎と臨床」、 “腫瘍血管内皮細胞を標的とした新たな治療法の開発”、2010. 10. 9、アスティ45 (札幌) (シンポジスト)
- ⑦ 樋田京子: 第64回日本口腔科学会学術集会、“腫瘍血管内皮細胞の異常と新たな治療法の開発”、2010. 6. 24、札幌プリンスホテル (札幌) (シンポジスト)
- ⑧ Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Akino T., Hirata N., Kurosu T., Ishikawa S., Kondo M., Maishi N., Kawamoto T., Inoue N., Shindoh M. and Hida K.: Endothelial cells acquire abnormalities by factors from tumor cells, AACR 101st ANNUAL MEETING 2010, 2010. 4. 20, Washington DC (USA)
- ⑨ Hida K., Akino T., Hida Y., Tsuchiya K.,

- Freedman D., Muraki C., Ohga N., Matsuda K., Akiyama K., Kurosu T., Kondo M., Maishi N., Harabayashi T., Shinohara N., Nonomura K., Klagsbrun M. and Shindoh M.: Cytogenetic Abnormalities of Tumor Endothelial Cells in Human Malignant Tumors, AACR 101st ANNUAL MEETING 2010, 2010. 4. 19, Washington DC (USA)
- ⑩ Hida Y., Ohga N., Muraki C., Akiyama K., Kondoh M., Maishi N., Kurosu T., Ishikawa S., Hirata N., Shindoh M. and Hida K.: A Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3 Gallate Specifically Targets Tumor-Associated Endothelial Cells, AACR 101st ANNUAL MEETING 2010, 2010. 4. 19, Washington DC (USA)
- ⑪ 樋田京子: 第43回加齢医学研究所シンポジウム「血管から見る医科学研究の新展開」、「腫瘍血管内皮細胞の特性と治療抵抗性」、2010. 3. 24、東北大学加齢医学研究所(仙台)(シンポジスト)
- ⑫ 樋田京子: The 4th Lecture Meeting SUTENT by Urology Specialist, “がん治療の最前線 血管新生阻害の最新アプローチ”、2010. 2. 26、フォーシーズンズ椿山荘(東京)
- ⑬ Ohga N., Hida K.: Inhibitory Effects of Epigallocatechin-3 Gallate, a Polyphenol in Green Tea, on Tumor-Associated Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells, AACR-JCA Joint conference: CANCER GENOMICS, EPIGENOMICS, AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL THERAPEUTICS, 2010. 2. 8, Waikoloa, Hawaii (USA)
- ⑭ 樋田京子: 公開シンポジウム「生体ナノ環境の時空間制御を目指して」、戦略的研究推進経費プロジェクト主催「血管を標的とする革新的医薬分子送達法の基盤技術の確立」、「生体ナノ環境を構成する間質細胞の時空間的ダイナミクスの解明」、2010. 1. 5、北海道大学大学院薬学研究院臨床薬学講義室(札幌)(シンポジスト)
- ⑮ 樋田京子: 第32回日本分子生物学会年会ワークショップ“腫瘍血管内皮細胞の異常と薬剤抵抗性”、2009. 12. 12、パシフィコ横浜(横浜)
- ⑯ 樋田京子: 第17回日本血管生物医学会“腫瘍血管内皮細胞の異常性”、2009. 10. 8、東京大学(東京)(シンポジスト)
- [図書](計4件)
- ① 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞の特性と治療抵抗性、丸山征郎、安藤丈治、佐藤靖史、倉林正彦、江頭健輔、山岸昌一編 血管医学 特集「がんと血管—イメージングから治療まで—」、メディカルレビュー社、10(4)、23-28、2009
- ② 樋田京子、秋野文臣、樋田泰浩: がん組織中の血管内皮細胞の異常性—遺伝子発現から染色体異常まで、落合淳志・高倉伸幸編 実験医学増刊号「癌の微小環境と適応応答の最前線」、羊土社、27(2)、149-155、2009
- ③ 樋田京子、樋田泰浩: 腫瘍血管内皮細胞の特性、血管新生 up-to-date 渋谷正史・佐藤靖史編「細胞」、ニューサイエンス社、40(12)、16-19、2008
- ④ 樋田京子: 磁気ビーズを用いたがん組織からの細胞分離法 がん転移研究の実験手法 第1版、日本がん転移学会編 清木元治・愛甲孝 編金芳堂、211-214、2008
- [産業財産権]
- 出願状況(計10件)
- ①名称: 腫瘍血管新生阻害剤
発明者: 樋田京子、樋田泰浩
権利者: 北海道大学
種類: 特許出願
番号: 特願 2010-254205
出願年月日: 2010年11月12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
権利者: 北海道大学
種類: 特許出願
番号: PCT/JP2010/063669
出願年月日: 2010年8月11日
国内外の別: 外国
- ③名称: 腫瘍血管新生阻害剤
発明者: 樋田京子、樋田泰浩
権利者: 北海道大学
種類: 特許出願
番号: PCT/JP2010/063124
出願年月日: 2010年8月3日
国内外の別: 外国

④名称：腫瘍血管新生阻害剤
発明者：樋田京子、樋田泰浩
権利者：北海道大学
種類：特許出願
番号：PCT/JP2010/063669
出願年月日：2010年3月18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/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋田 京子 (HIDA KYOKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号：40399952

(2) 研究分担者

進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20162802

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00109456

東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50301891

樋田 泰浩 (HIDA YASUHIRO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：30399919

北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00451451

(3) 連携研究者

なし