

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591847
 研究課題名（和文） 腎癌由来特異的腫瘍血管内皮細胞による血管新生阻害剤スクリーニングシステムの開発
 研究課題名（英文） Development of new screening system for anti-angiogenic drugs using tumor associated endothelial cells derived from renal cell carcinoma
 研究代表者
 篠原 信雄（SHINOHARA NOBUO）
 北海道大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：90250422

研究成果の概要（和文）：

血管新生阻害剤のスクリーニング評価をより腫瘍微小環境内を反映した系において確立することを目指してマウス皮下腫瘍モデルから採取した腫瘍血管内皮細胞を用いて正常血管内皮との差異を解析した。特にマイクロアレイをもちいて腫瘍血管内皮において発現が亢進している遺伝子について解析を進めた。

これらの遺伝子が薬剤耐性や細胞の高い生存能、遊走能といった、腫瘍血管内皮の生物学的特徴に強く関わっていることを明らかにした。（Akino T, Hida K, Shinohara N et. al. *Am J Pathol.* 2009）（Tsuchiya K, Hida K, Shinohara N et. al. *Int J Oncol.* 2010）

さらにマウスで発現が亢進している遺伝子が、ヒト腎癌由来の腫瘍血管内皮細胞にも同様に発現が亢進していることを明らかにした。

これらの知見により、血管新生阻害剤のスクリーニング評価系確立に一步近づいたと同時に、新たな腫瘍血管新生阻害開発に寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To develop a new screening system for anti-angiogenic drugs, we isolated normal endothelial cell (NEC) and tumor endothelial cell (TEC) from human renal cell carcinoma xenografts and from dermis of normal mice, respectively. We analyzed the difference between TEC and NEC and investigate the potential of TEC for the screening system which reflect tumor microenvironment.

Especially, we focused on several genes which were upregulated in TEC compared to NEC by DNA microarray analysis.

We found these genes had strong association with abnormal phenotypes of TECs such as drug resistance, high viability, and migration.

The specific phenotype in mouse TEC were also found in human TEC isolated from human renal cell carcinoma.

These results enable us to approach new anti-angiogenic drug screening system and new anti-angiogenic therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍血管内皮、スクリーニング、薬剤感受性、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍血管の解剖組織学的に形態が正常血管と異なることに関する報告はいくつかなされてきた。しかし腫瘍組織から腫瘍血管内皮を確実に分離、また培養する事には様々な難点があったことから、それらを用いた研究報告が圧倒的に少なかった。だが、共同研究者の樋田らが技術的な問題点を克服し純度の高いマウス腫瘍血管内皮細胞の分離・培養に成功し、それらが正常血管内皮細胞と比較して様々な異常をもつこと、さらに腫瘍血管内皮細胞が染色体異常すら持ちうることを報告した。

このことから、腫瘍血管内皮細胞は従来考えられていたよりも多様であり、この腫瘍血管内皮細胞の生物学的解析で血管新生をコントロールする機構を解明することにより、新たな血管新生阻害剤スクリーニングシステムが樹立される可能性がある。

2. 研究の目的

腎細胞癌、特にその多くを占める淡明細胞癌は血管新生が盛んな腫瘍として知られていた。現在はその機構に、淡明細胞癌に多くみられる VHL 遺伝子の変異、さらにはそれによりもたらされる HIF の活性化により、下流シグナルである VEGF が活性化することで腫瘍血管が新生してくると考えられている。これまでいくつかの VEGF の阻害剤が開発されてきた。2004 年 VEGF の中和抗体で Bevacizumab が血管新生阻害剤として初めて進行性大腸がんに対し米国食品医薬品局 (FDA) に認可された。現在では米国国立がん研究所 (NCI) が進行性腎細胞癌に対し推奨する治療薬上位 3 つまでもが、これまでの IFN- α や IL-2 のサイトカイン療法にかわり血管新生阻害剤が占めるようになり、臨床的に広く用いられてきている。それらの薬剤の優れた治療成績が報告されてきているものの、副作用、耐性の獲得などの問題が指摘されており、またその腫瘍血管に対する効果の機序については依然不明な点が多い。それは多くの血管新生阻害剤が分離培養の平易な正常血管内皮細胞を用いての創薬研究から生まれており、腫瘍血管内皮細胞への特異性が少ないことが大きな理由ではないかと考えられる。そこで今回の研究は、腎癌由来特異的腫瘍血管内皮細胞を用いて、腎癌治療に用いる血管新生阻害剤スクリーニングシステムの開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 腎癌腫瘍血管内皮細胞の正常血管内皮細胞との遺伝子発現の比較検討

各種組織型腫瘍、または正常血管内皮細胞の RNA を抽出し、遺伝子発現の差を比較検討する。比較は腫瘍—正常血管内皮、また、各組織型の腎癌からの血管内皮の間において行う。腎癌由来血管内皮に共通して正常血管内皮と比較し 5 倍以上発現が亢進しているものを腎癌腫瘍血管内皮特異マーカーとしてピックアップする。また、各組織型の腎癌の血管内皮について比較検討する。その中でやはり優位に発現が亢進しているものをその組織型の腎癌腫瘍血管内皮特異マーカーとして阻害剤や治療法を選択する際に考慮する。

(2) 腎癌腫瘍血管内皮細胞特異マーカーの in situ における確認

腎癌腫瘍血管内皮細胞特異マーカーについては免疫染色、または in situ hybridization により確認する。

4. 研究成果

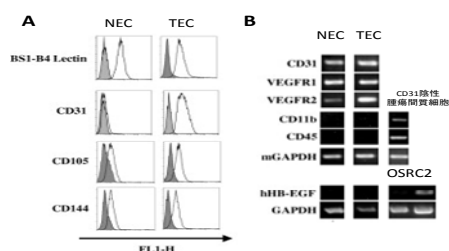
本研究はヒト腎がん由来の腫瘍血管内皮細胞を用いて、腎がん治療に用いる血管新生阻害剤スクリーニングシステムの開発を目指すことを目的に行った。

ヒト腎がん細胞株 (OSRC2) のマウス皮下移植腫瘍から腫瘍血管内皮 (TEC) を、ならびに正常皮膚から正常血管内皮 (NEC) を CD31 抗体を用いた磁気ビーズ法により分離し、実験に用いた。

(1) 実験に用いた TEC と NEC の特性解析

A: FACS 解析により、分離培養された血管内皮細胞の BS1-B4 レクチン結合、血管内皮マーカーである CD31、CD105、CD144 の発現が認められた。

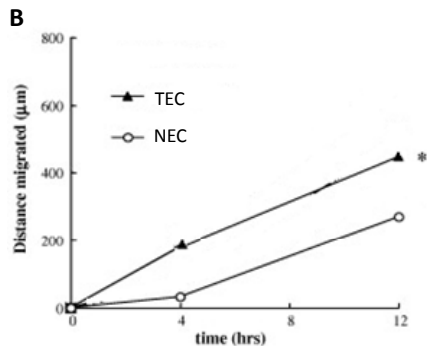
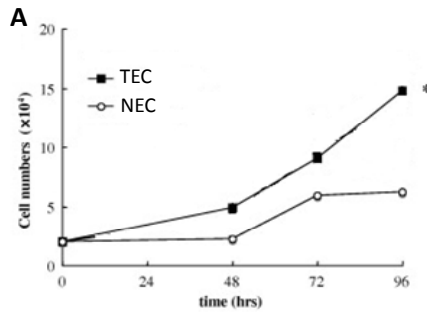
B: Regular PCR においても血管内皮マーカーである CD31、VEGFR2 の発現が認められた。また、単核球マーカーの CD11b、CD45 の発現は認められず血球成分の混入がないことが示され、HB-HGF の発現は認められずヒトがん細胞の混入がないことも示された。



(2) TEC は NEC に比較し増殖能・遊走能が高い

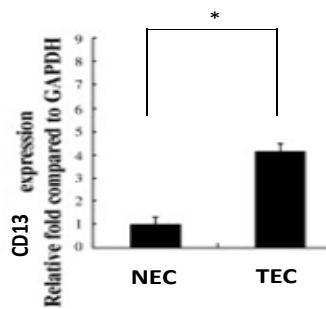
A: 血管内皮細胞の増殖を MTS アッセイで検討した。TEC は NEC に比較し細胞増殖能は促進していた。(*P<0.05)

B: Boyden chamber とファイブロネクチンでコーティングされた孔径 8 μ m のポリカーボネート膜を使用し、TEC と NEC の遊走能を解析した。TEC は NEC に比較し遊走能が促進していた。(*P<0.05)



(3) TEC は NEC と比較して遺伝子発現が異なる

Regular PCRにおいてTECはNECに比較し、腫瘍血管内皮特異マーカーとして知られるCD13の発現の亢進がみられた。(*P<0.05)

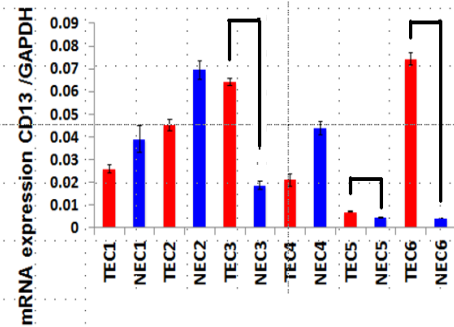


(4) ヒト腎がん血管内皮(6症例中3例)においてCD13の発現が高い

6例のヒト腎がん組織よりTECとNECを分離・培養しCD13の発現をRT-PCRで解析した。

TECはNECと比較しCD13の発現の亢進が認められた。

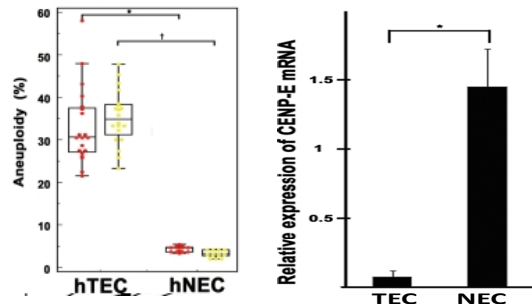
CD13 expression in cultured TECs and NECs



(5) TECは遺伝学的にNECと異なる

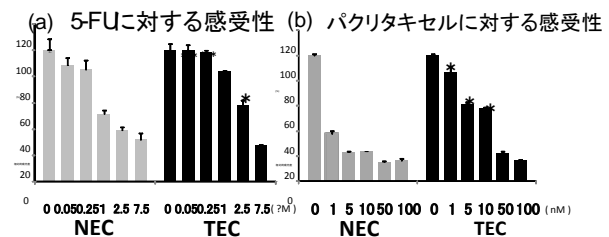
20例のヒト腎がん組織よりTECとNECを分離・サイトスピンで単層化し、7番染色体DNAプローブを用いたfluorescein in situ hybridization (FISH)法によりaneuploidyを比較した。

その結果、NECはdiploidであったのに対して、TECでは30%以上がaneuploidyを示し(いずれも未培養)、ヒト腎がんにおいてTECの一部には染色体異常があることが示された。その機序の一つとして、TECにおけるCEMP-EのmRNAの発現低下が考えられた。



(6) TECにおける薬剤感受性

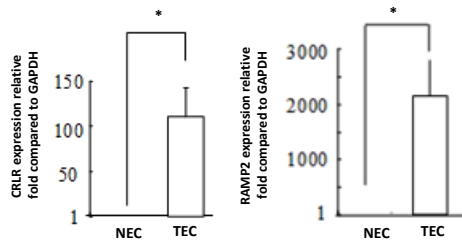
抗がん剤5-FU(a)、パクリタキセル(b)に対するTECとNECの薬剤感受性の違いを薬剤処理72時間後にMTSアッセイによって解析した。TECはNECと比較して5-FU、パクリタキセルに対して感受性が低かった(**P<0.05, *P<0.01 vs NEC)。



(7) TEC においてアドレノメジュリン受容体の発現は亢進している。

NEC と TEC におけるアドレノメジュリン受容体として知られる CRLR, RAMP2 の発現を RT-PCR 法において検討した。

NEC と比較して TEC において有意に CRLR と RAMP2 の発現がそれぞれ有意に亢進していた (*P<0.05)

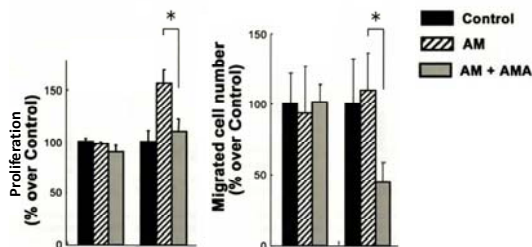


(8) TEC においてアドレノメジュリン(AM)添加により細胞増殖能、遊走能は促進され、その作用はアドレノメジュリンアンタゴニスト(AMA)添加により阻害された。

TEC と NEC の増殖能を MTS アッセイを用いて検討し、遊走能を Boyden chamber 法を用いて検討した。

TEC においては AM 添加により増殖能、遊走能は促進され、その作用は AMA 添加により阻害された (*P<0.05)。

NEC においては AM, AMA は増殖能、遊走能に影響を及ぼさなかった。



(9)まとめ

マウス皮下移植腫瘍モデルから採取したヒト腎癌由来の TEC が NEC と比較して生物学的特徴(高い生存能、遊走能)や遺伝子発現において異なることが示された。

また、TEC は NEC と比較し、mRNA において CD13 の強い発現が確認された。このように TEC により強く発現する遺伝子を腫瘍血管内皮マーカーとして標的分子と出来れば、NEC に有害作用をもたらさず、TEC を選択的に阻害する新たな腫瘍血管新生阻害開発に寄与すると考えられた。

TEC は NEC と比較しアドレノメジュリンレセプターの発現が高く、アンタゴニストの投与により NEC には影響を及ぼさず、TEC 特

異的に増殖能、遊走能を抑制することができた。このような分子を標的とすることは新たな血管新生阻害剤の開発のみならず、阻害剤による治療前の治療効果スクリーニング(薬剤感受性スクリーニング)につながる可能性が示唆された。

今後も、TEC の細胞生物学的特性解析をすすめ、増殖や遊走を制御する因子ならびに機構を解析することにより、新たな腫瘍血管新生阻害剤(未知のものを含め)の効果をスクリーニングするシステム(cell-based assay)を樹立できる可能性が示唆された。

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)

- ①Kurosu 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), 2011. 819-829.
- ②Matsuda 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, 2010. 947-954.
- ③ Uemura H, Shinohara N., Yuasa T, Tomita Y, Fujimoto H, Niwakawa M, Mugiya S, Miki T, Nonomura N., Takahashi M, Hasegawa Y, Agata N, Houk B, Naito S, Akaza H. A phase II study of sunitinib in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma: insights into the treatment, efficacy and safety. Jap J Clin Oncol 査読有 40 2010 194-202
- ④Tsuchiya K, Hida K., Hida Y, Muraki C, Ohga N, Akino T, Kondo T, Miseki T, Nakagawa K, Shindoh M, Harabayashi T, Shinohara N., Nonomura K., 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. 2010 Jun;36(6):1379-86.

- ⑤ Shinohara N, Takahashi M, Kamishima T, Ikushima H, Otsuka N, Ishizu A, Shimazu C, Kanayama H, Nonomura K. The incidence and the mechanism of sunitinib-induced thyroid atrophy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Br J Cancer 査読有 104 2010 241-247.
- ⑥ Tomita Y, Shinohara N, Yuasa T, Fujimoto H, Niwakawa M, Mugiya S, Miki T, Uemura H, Nonomura K, Takahashi M, Hasegawa Y, Agata N, Houk B, Naito S, Akaza H. Overall survival and updated results from a Phase II Study of Sunitinib in Japanese Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. Jpn J Clin Oncol. 査読有 40(12) 2010 1166-72.
- ⑦ Naito S, Eto M, Shinohara N, Tomita Y, Fujisawa M, Namiki M, Nishikido M, Usami M, Tsukamoto T, Akaza H. Multicenter phase II trial of S-1 in patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol 査読有 28 2010 5022-5028.
- ⑧ Shinohara N, Kumagai A, Kanagawa K, Maruyama S, Abe T, Sazawa A, Nonomura K. Multi-center phase II trial of combination therapy with meloxicam, a COX-2 inhibitor, and natural interferon alfa for metastatic renal cell carcinoma. Jap J Clin Oncol 査読有 39 2009 720-726.
- ⑨ Akino T, Hida K, Hida Y, Tsuchiya K, Freedman D, Muraki C, Ohga N, Matsuda K, Akiyama K, Harabayashi T, Shinohara N, Nonomura K, Klagsbrun M, Shindoh M. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. Am J Pathol 査読有 175 2009 2657-2667.

[学会発表] (計3件)

- ① Kondoh M, Ohga N, Kurosu T, Kitayama K, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Ohsawa T, Yamamoto K, Hida Y, Shindoh M. and Hida K.: Gene expression analysis of circulating endothelial cells in cancer patients.
第69回日本癌学会学術総会
2010.9.22, 大阪
- ② Shinohara N.
The role of cytoreductive nephrectomy for patients with metastatic renal cell carcinoma.
27th Japan-Korea Urological Congress
2010.9.11, ウェスティン都ホテル京都

- ③ 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.
2010.4.17, Washington DC

[図書] (計3件)

- ① 篠原信雄: 医薬ジャーナル社、膀胱がん (吉田 修、大園誠一郎、赤座英之 編) インフォームドコンセントのための図解シリーズ. 2010年. P. 54-57.
- ② 樋田京子、秋野文臣、樋田泰浩: 羊土社、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. 2009年. P. 149-155.
- ③ 富田善彦、金山博臣、植村天受、篠原信雄: メディカルレビュー社、Year Book of RCC 2009. 2009年. P.1-256.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 信雄 (SHINOHARA NOBUO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90250422

(2) 研究分担者

樋田 京子 (HIDA KYOKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 40399952
野々村 克也 (NONOMURA KATSUYA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 60113750