

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 5 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791304

研究課題名（和文） 腫瘍血管は消化管腫瘍の新たな診断基準となり得るか？

研究課題名（英文） Do any microcirculation changes reflect the malignant transformation in the intestinal tract during the multistep carcinogenesis?

研究代表者

北原 秀治 (KITAHARA SHUJI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40510235

研究成果の概要（和文）：

われわれは、腫瘍細胞が良性から悪性へと転化する点と、腫瘍血管、リンパ管の新生パターンが変化する点との間に、相関関係が存在するのではないかという仮説を立て、 $Apc^{Min/+}$ マウスを用いて解析した。小腸上皮が腫瘍化していく段階で、新生血管は著しく形態的变化を認めた。さらに、上皮が悪性化するにつれて、血管新生因子であるVasohibin-2の発現が血管周囲に特異的に見られた。このように、腫瘍の悪性化を局所の微小循環系の変化との関連でとらえることができれば、新たな治療戦略の開発につながるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Apc^{Min/+} mice provide a unique orthotopic model for the development of spontaneous adenomatous polyposis and subsequent carcinomas, termed the adenoma-carcinoma sequence. In the current study, we sought to clarify the relationship between the patterns of tumor angiogenesis and the sequence of neoplastic transformation in intestinal epithelia, by the morphological characterization of this tumor models. We found that structural abnormalities of tumor vessels and the pattern of tumor angiogenesis in benign tumors resembled that in malignant tumors. Several angiogenic markers, such as VEGF were overexpressed in pre-neoplastic intestinal lesions from very early stages during the adenoma-carcinoma sequence in both mice and humans. A novel intrinsic angiogenic factor, Vasohibin-2 protein was detected around tumor blood vessels in adenocarcinomas in situ, but was absent from adenomas during early stages of *Apc^{Min/+}* tumors. These results indicated that malignant changes in local vascular networks occurred earlier than malignant transformation of the intestinal epithelia. Therefore, we suggest that microvascular changes in preneoplastic adenomatous polyposis may be an important diagnostic sign for the progression of intestinal adenocarcinoma and may be useful to predict the transformation of tumors from a benign to a malignant state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：血管新生、腫瘍血管、消化器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は、その増殖のために、酸素や栄養分の供給が不可欠であり、様々な血管増殖因子群による複雑な分子経路を利用して血管新生を行っている。その血管新生のメカニズムの解明は、抗血管療法などの臨床治療において非常に重要である。つい最近になって、腫瘍血管がこれまで信じられていた新生様式のみならず、その増殖のしかたに応じて、様々な新生パターンを示すことが報告されている。申請者はこのメカニズム解明の研究を行うにあたり大きく2つの疑問を掲げ、それに対する研究を行ってきた。その疑問とは、①生体内（新生の現場）で腫瘍の微小循環系はどのような機序で、どのような変化を伴って新生するのか？②腫瘍血管、リンパ管自体にも良性と悪性の違いはあるのか？また、それが腫瘍細胞の悪性転化、増殖、転移にどのように関わっているのか？申請者はこれまでに、腫瘍はその周囲の微小環境の変化に応じて、その微小循環系の新生パターンを様々に変化させるのではないかと、もしくは、微小循環系が変化することにより、腫瘍細胞が悪性へと転化するのか？という仮説を立てるに至った。申請者は、これらの疑問に答えるべく、生後数週より腸に腫瘍を発症するAPC^{Min/+}マウス及び、ヒト手術標本（腺腫、腺癌）を材料に、新生血管、リンパ管を種々のマーカーによる

多重免疫染色で可視化し、微細構造から三次元レベルに至るまでの形態解析を行った。

(H20.21年度若手研究（スタートアップ）)

その結果、実は悪性転化する前の正常粘膜から良性腫瘍（腺種）に変化する段階で、血管は非常に活発な変化を見せることがわかった。

そこで、本研究の目指す最終的ゴールは、消化管腫瘍の悪性化に伴う腫瘍血管、リンパ管の微細構造の変化を生存率と関連させ、それを指標とした新たな診断法の確立を目指すとともに、上皮の腫瘍化に伴う微小循環系の変化を防ぐ抗血管治療薬の開発のためのヒントを得るという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞の増殖の鍵を握る微小循環系（血管、リンパ管）の変化の過程を、前癌状態とも言うべきポリープ（腺腫）から、徐々に腺癌へ移行していく消化器系腫瘍の特徴を利用して追跡し、形態、機能の両側面からアプローチすることにより、腫瘍の悪性化の制御に関する基礎的な理解と、抗腫瘍血管療法をはじめとする治療への応用を目指す。

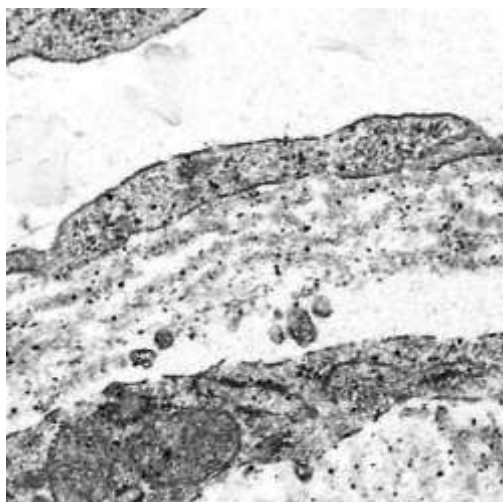
3. 研究の方法

動物は主に APC^{Min/+}マウスを使用した。この動物は生後約数週から腸に腺腫または腺癌

を多発し、腫瘍の観察が非常に容易であり、早期であれば組織の丸ごと全載標本 (Whole mount) による三次元解析も可能であった。この動物にできる腫瘍はヒトと同じく、良性の腺腫から悪性の腺癌へと変化する場合もある。この腫瘍の変化のメカニズムについては報告があるが、血管についての形態変化については不明な点が多く、これらを検索することは臨床的にも非常に応用価値は高い。戦略的には血管新生部を種々のマーカーによる多重免疫染色で可視化し、レクチン灌流法と組み合わせた三次元イメージング法及び、透過型電子顕微鏡による微細構造での形態解析とウェスタンブロットなどの分子生物学的手法などを主な研究手段として解析を行った。また、比較用として、ヒトの大腸癌標本も使用した。

4. 研究成果

小腸上皮が腫瘍化していく段階で、絨毛部分の血管は、良性腫瘍 (腺腫) においては、新生血管は著しい形態的变化を示し、密度の増加と、基底膜の不安定化が起こっていた (図)。微細構造では、絨毛先端の血管の内腔表面に微絨毛様の突起が出現するなどの変化が認められた。腫瘍が悪性化するにつれて、新生血管は密度をさらに増し、形態的にも著しい異型性を伴った。また、血管新生因子である Vasohibin-2 が、腫瘍細胞の悪性化



に際して特異的に発現した。

図 正常血管基底膜は、上皮が腫瘍化してくると、良性腫瘍の段階から基底膜が多層化してくる。

ヒトにおける大腸癌の発生には多段階発癌 (adenoma-carcinoma sequence) 及び、de novo 癌という考え方がある。前者は腸上皮に、Apc 遺伝子などの様々な遺伝的要素や環境の変化などが加わり、腫瘍化して行く。今回の研究結果より、腸上皮の腫瘍化とともに、血管、リンパ管にも特異的な形態的・機能的変化をきたす事が解った。このように、腫瘍の悪性化への転化を局所の微小循環系の変化との関連でとらえることができれば、新しい癌治療の開発につながるかもしれない。

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4件)

- ① Kitahara Shuji, (他4名, 1番目) Alteration of angiogenic patterns on B16BL6 melanoma development promoted in Matrigel, Med Mol Morphol. 43: 1, 26-36, 2010, 査読有
- ② 北原秀治, 癌の微小循環を三次元イメージングする, W' Wave (日本癌病態治療研究会誌), 第16巻, 第1号, 35-37, 2010, 査読無
- ③ Yumiko Momokia, Shuji Kitahara, (他3名, 2番目, Corresponding author), Establishment of a normalized revascularization mouse model using tumor transplantation, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, (in press), 2013, 査読有
- ④ Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, (他7名, 4番目) Tumor-Driven

Microvesicles Induce Proangiogenic Phenotype in Endothelial Cells via Endocytosis, PLoS One, 7 (3), e34045, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計 26 件)

① 北原秀治, シンポジウム「遺伝子異常vs 微小循環の異常」微小循環系の制御が腫瘍の悪性化抑制につながるか?, 第23回消化器癌発生学会, 2012. 11. 16, 徳島

② 北原秀治, サテライトシンポジウム, [頭頸部領域の微小循環系]、腫瘍における微小循環系の多様性, 第 54 回歯科基礎医学会総会, 2012. 9. 13, 福島

③ 北原秀治, 臨床的放射線耐性腫瘍を用いた新たな癌治療モデルの確立, 第55回日本放射線影響学会, 2012. 9. 6, 仙台

④ Shuji KITAHARA, Transplanting normal endothelial cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduces tumor volume, 14th INTERNATIONAL HISTOCHEMISTRY AND CUTOCHEMISTRY, 2012. 8. 26~29, Kyoto, japan

⑤ Hidehiko Nakanishi, The characterization of recovery process of alveoli and pulmonary microcirculation in the injured developing lung, 14th INTERNATIONAL HISTOCHEMISTRY AND CUTOCHEMISTRY, 2012. 8. 26 ~ 29, Kyoto, japan

⑥ Shuji KITAHARA, Does the regeneration of the normal vasculature in tumors suppress the tumor growth?, International Vascular Biology Meeting, 2012. 6. 2 ~ 5, Germany

⑦ 菊田幸子, Apcマウス小腸の腫瘍形成領域におけるカハールの介在細胞の免疫組織科学的解析, 第117回日本解剖学会総会, 2012. 3. 25, 山梨

⑧ 板垣裕子, 食餌性非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおける肝病態変化の形態学的解析, 第117回日本解剖学会総会, 2012. 3. 25, 山梨

⑨ 中西秀彦, 新生児期肺障害モデルにおける肺胞および肺胞微小循環系の再生過程の解析, 第117回日本解剖学会総会, 2012. 3. 25, 山梨

⑩ 北原秀治, 腫瘍血管の多様性~退縮、再生過程の形態学的解析, 第117回日本解剖学会総会, 2012. 3. 25, 山梨

⑧ 森島正恵, Nkx2.5ノックアウトマウスにおける心筋形態の解析第117回日本解剖学会総会, 2012. 3. 25, 山梨

⑪ 吉井明日香, 子宮内膜修復再生における形態学的解析, 第117回日本解剖学会総会, 2012. 3. 25, 山梨

⑫ 北原秀治, Do any microcirculation changes reflect the malignant transformation in the intestinal tract during the multistep carcinogenesis?, 第19回日本血管生物医学会, 2011. 12. 10, 東京

⑬ 中西秀彦, The characterization of regeneration process of pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung, 第19回日本血管生物医学会, 2011. 12. 10, 東京

⑭ 吉井明日香, Characterization of microcirculation changes during wound healing in the uterus of mice after the Cesarean operation, 第19回日本血管生物医学会, 2011. 12. 10, 東京

⑮ 北原秀治, 腫瘍血管の正常化は腫瘍細胞の放射線感受性を上げるか?, 第17回国際癌治療増感研究会, 2011. 5. 31, 仙台

⑯ Kitahara S, Do any microcirculation changes reflect the malignant

transformation in the intestinal tract during the multistep carcinogenesis? , EXPERIMENTAL BIOLOGY 2011, 2011. 4. 9~13, Washington

⑰ Itagaki H, A suitable model to investigate the regeneration of transplanted hepatocytes, EXPERIMENTAL BIOLOGY 2011, 2011. 4. 9~13, Washington

⑱ 北原秀治, A characterization of blood vessel regression during anti-cancer treatment for malignant tumors, 第116回日本解剖学会総会, 2011. 3. 29, 横浜

⑲ 桃木裕美子, 再生血管を用いた新しい癌治療の試み: 口腔癌細胞を用いた腫瘍血管退縮過程の解析, 第29回日本口腔腫瘍学会, 2011. 1. 27, 熊本

⑳ 北原秀治, 消化管腫瘍における微小循環系の変化は上皮の悪性化と相関するか?, 第18回日本血管生物医学会, 2010. 12. 2, 大阪

㉑ 北原秀治, 消化管腫瘍の悪性化に伴う微小循環系の解析, 第21回消化器癌発生学会, 2010. 11. 19, 軽井沢

㉒ 森美由紀, 腫瘍血管を標的とする放射線耐性口腔癌治療の有効性, 第53回日本放射線影響学会, 2010. 10. 20, 京都

㉓ 森美由紀, 血管新生阻害薬 RAD001 は放射線耐性口腔癌に有効か?, 第55回日本口腔外科学会総会, 2010. 10. 18, 幕張

㉔ 北原秀治, 消化管腫瘍を用いた多段階発癌に伴う微小循環系の解析, 第55回日本口腔外科学会総会, 2010. 10. 17, 幕張

㉕ 桃木裕美子, 口腔癌細胞を用いた腫瘍血管退縮過程の解析, 第55回日本口腔外科学会総会, 2010. 10. 17, 幕張

㉖ Kitahara S, Do any vascular change reflect the neoplastic transformation in the intestinal tract during the

adenoma-carcinoma sequence? , 16th International Vascular Biology Meeting, 2010. 6. 20~24, Los Angeles

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北原 秀治 (KITAHARA SHUJI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40510235