

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592953

研究課題名(和文) 抗酸化物質を用いた口腔癌周囲環境中の活性酸素を治療標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies by antioxidants for reactive oxidative species of tumor microenvironment in oral carcinoma

研究代表者

松沢 祐介 (Matsuzawa, Yusuke)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30351620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：今回、腫瘍血管内皮細胞における活性酸素(ROS)を介したさまざまなシグナル伝達が血管新生能に与える影響を与えるかについて検討した。低酸素低血清下でROSが蓄積し、その際の細胞の生存率は腫瘍血管内皮では有意に高いことがわかった。また、ピオシアニン処理によって腫瘍血管内皮においてROSの誘導をすると VEGFシグナリングが活性化することがわかり、抗酸化物質であるカテキンによりこのシグナル活性化は抑制された。またROSは血管内皮のaneuploidyも引き起こすことがわかった。本研究においてROSが腫瘍血管内皮細胞の生存活性に関与していることや腫瘍血管新生阻害剤としての抗酸化剤の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that inflammatory cells produce PGE-2, COX-2 in tumor stroma. Also we have found tumor endothelial cells also express these inflammatory cytokines. Thus, we hypothesized that reactive oxygen species (ROS), which is produced in inflammation, may contribute to chromosomal abnormality or genomic instability in tumor endothelial cells (TECs). Green tea catechin, EGCG has anti-oxidant and has anti-cancer effects. We have reported that EGCG inhibited VEGF-induced cell proliferation and migration in TEC, not in NEC (Cancer Sci. 2009). In this study, we addressed whether ROS in TEC is removed by EGCG, and analyzed the effects of ROS in TEC. By ROS accumulation, TEC could survive more compared to NEC. When ROS was induced by pyocyanin, VEGF/VEGFR signal was activated in TEC and it was inhibited by EGCG. In addition, ROS induced aneuploidy in TEC and EGCG inhibited VEGF and aneuploidy. These results suggested that ROS induced TEC abnormality via VEGF autocrine loop.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 活性酸素 染色体異常 抗酸化剤

## 1. 研究当初の背景

これまでに申請者らは、腫瘍血管内皮の分離・培養に成功し、舌癌由来をはじめとして、4種の腫瘍血管内皮分離・長期培養に成功している。(Hida.K et.al 2004 2005 Cancer Res、2008 Cancer Sci、2009 Cancer Sci、2010 Biochem Biophys Res Commun)さらに、腫瘍血管内皮が、癌細胞に見られるような 1)染色体異常、核異型などのゲノム不安定性を有し、2)特異遺伝子の発現、3)薬剤抵抗性など多くの点で正常血管内皮と異なることを報告してきた。(Hida.K et.al 2004 2005 Cancer Res)また、これらの腫瘍血管内皮は、分離・長期培養後も特異的性質が消失せず、保たれていることを報告している。(Hida.K et.al 2010 Biochem Biophys Res Commun)

申請者らは、腫瘍血管内皮の染色体異常、核異型などのゲノム不安定性に、腫瘍血管内皮が産生する活性酸素が関与しているのではないかと着想した。腫瘍間質の炎症性細胞が、PGE-2,COX-2 を産生していることは広く知られている。申請者らは、腫瘍血管内皮細胞も正常血管内皮細胞に比べて、PGE-2,COX-2 を高発現していることを見いだした。(Ohga.N, Hida.K et.al 論文投稿中)加えて、申請者らが分離・培養した腫瘍血管内皮は、腫瘍間質の炎症性細胞と同様に、IL-8 などのさまざま炎症性反応のメディエーターを多く出している。そこで、腫瘍間質内における炎症細胞と同様に、腫瘍血管内皮(Tumor endothelial cell:TEC)、腫瘍関連線維芽細胞(CAF:cancer associated fibroblast)が、活性酸素を産生し、腫瘍微小環境における炎症を誘発し、さらには発癌や悪性化進展の実行役として機能しているのではないかと考えた。

緑茶の主成分であるカテキンは、強い抗酸化作用を持ち、代表的な抗酸化物質である。また、カテキンは腫瘍細胞に対する抑制効果をもつことで広く知られている。最近、申請者らは、緑茶カテキンが腫瘍血管内皮の細胞運動能や血管内皮増殖因子 VEGF 刺激による細胞増殖シグナルを特異的に抑制することを見いだした。(Ohga.N, Hida K et. al Cancer Sci. 2009)

しかし、腫瘍血管内皮細胞や腫瘍関連線維芽細胞(CAF: cancer associated fibroblast)において、緑茶カテキンをはじめとする抗酸化物質により活性酸素(ROS)が除去されるか、また ROS を介したさまざまなシグナル伝達に影響を与えるかは未解明である。

そこで、癌周囲間質を構成する腫瘍血管内皮細胞、腫瘍関連線維芽細胞の活性酸素産生能を解析し、さまざまな抗酸化物質を用いて、細胞内での活性酸素の影響を減小させ、発癌さらには癌の悪性化進展を阻止する新規治療法開発の基盤的研究を行うことを目的とした。

## 2. 研究の目的

さまざまな環境要因からの活性酸素が、癌

の発症や進展に關与していると考えられている。口腔内は、喫煙、熱刺激、香辛料刺激、機械刺激などにより、活性酸素が発生しやすい環境である。

本研究では、癌細胞ならびに癌間質を構成する腫瘍血管内皮細胞、腫瘍関連線維芽細胞の活性酸素産生能を解析し、さまざまな抗酸化物質のそれらの細胞が産生する活性酸素に対する影響を検討する。微小環境内の活性酸素を標的とすることで、発癌、癌の悪性化進展を阻止する新規治療法開発の基盤的研究を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト舌癌細胞(HSC-3、SAS、HSC-4)をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍塊からの血管内皮マーカーである CD31 抗体を用いて、舌癌由来腫瘍血管内皮(TEC)(CD31 陽性)と舌癌由来腫瘍関連線維芽細胞(CAF)(CD31 陰性)を分離・培養する。

正常コントロールとして、正常皮膚から血管内皮を分離・培養する。PCR 法とフローサイトメーターを用いて、分離した TEC と CAF の血管内皮マーカー(CD31、54、105、144、146)、線維芽細胞マーカー(SMA、FAP、FSP-1、Desmin、Vimentin)の発現解析を詳細に行う。(大賀)

分離・培養した TEC、CAF と NEC における細胞内活性酸素の測定を、フローサイトメーターを用いて行う。また、酸化ストレスの指標であり、DNA が活性酸素により酸化されて生成される分子である 8-OHdG フローサイトメーターを用いて測定し、比較・解析する。

(2)フローサイトメーターとウエスタンブロット法を用いて、TEC と CAF における活性酸素(ROS)産生能と抗酸化酵素能(MnSOD、GPx、Cu,ZnSOD タンパク定量、MnSOD 活性)を検討する。

(3)ROS を介した NF- $\kappa$ B、Bax などの細胞内シグナル伝達を詳細に明らかにする。また、TEC と CAF にさまざまなストレス:熱刺激下(高温下、低温下)やずり応力機械刺激下で、TEC と CAF の活性酸素(ROS)産生能がどのように変化するかを解析する。

(4)癌組織は強い低酸素とともに、極度の低栄養状態にある。そこで、低酸素低酸素(1%~5%O<sub>2</sub>)、低栄養下(無血清培地下)で、TEC と CAF の活性酸素(ROS)能が変化するかを検討する。

## 4. 研究成果

(1)ヒト舌癌細胞(HSC-3、SAS、HSC-4)をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍塊からの血管内皮マーカーである CD31 抗体を用いて、舌癌由来腫瘍血管内皮(TEC)(CD31 陽性)と舌癌由来腫瘍関連線維芽細胞(CAF)(CD31 陰性)を分離・培養する。

正常コントロールとして、正常皮膚から血管

内皮を分離・培養する。PCR法とフローサイトメーターを用いて、分離したTECとCAFの血管内皮マーカー(CD31、54、105、144、146)、線維芽細胞マーカー(SMA、FAP、FSP-1、Desmin、Vimentin)の発現解析を詳細に行った(図1)。

分離・培養したTEC、CAFとNECにおける細胞内活性酸素の測定を、フローサイトメーターを用いて行った。また、酸化ストレスの指標であり、DNAが活性酸素により酸化されて生成される分子である8-OHdGフローサイトメーターを用いて測定し、比較・解析した。

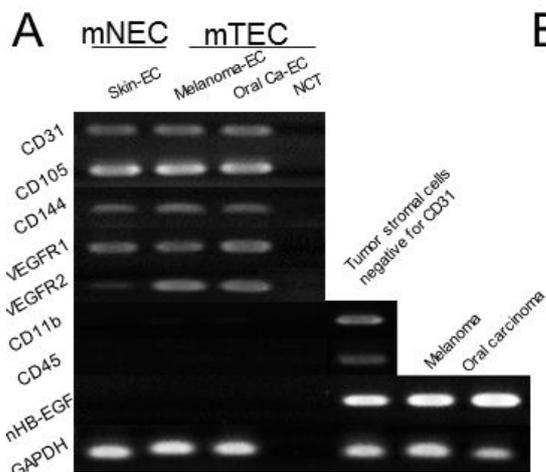


図1

(2) フローサイトメーターとウエスタンブロット法を用いて、血管内皮における活性酸素(ROS)産生能と抗酸化酵素能(MnSOD, GPx, Cu, ZnSODタンパク定量、MnSOD活性)を検討したところ、TECとNECの通常状態でのROSの蓄積量に大きな違いはなかった。

(3) ROSを介したNF- $\kappa$ B、Baxなどの細胞内シグナル伝達を詳細に明らかにする目的で低血清刺激や低酸素刺激によって血管内皮におけるROSの蓄積の程度をTEC、NEC間で比較した。

TEC、NECの間でROSの蓄積の程度に大きな差はなかったが、ROSの蓄積によってTECにおいて細胞遊走能の亢進ならびに低血清条件における細胞の生存率がNECよりも高いことがわかった(図2)。

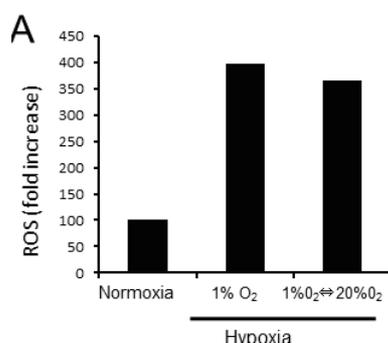


図2

(4) 血管内皮におけるROSの蓄積後の遺伝子発現の解析

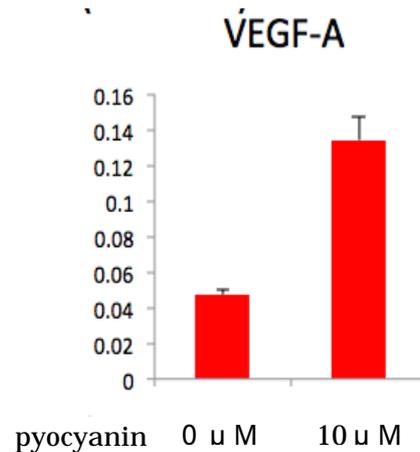


図3

Pyocyanin処理により血管内皮においてROSを誘導し、その後遺伝子発現変化を解析した。血管新生関連因子のいくつかはROSにより誘導された。例えばVEGF-A(図3)、その受容体であるVEGFR2のほか、TECマーカーのいくつかの発現も亢進していた。

これらのうち、Smad2/3、NF- $\kappa$ Bのシグナルを活性化に關与するものがあつた。これらは抗酸化剤NAC、DPI、EGCGによりキャンセルされ、ROSによって腫瘍微小環境内で血管内皮の形質変化がおこることが示唆された。

以上の結果は、腫瘍血管新生阻害を目的とした抗酸化剤の適応拡大といったことも可能となることを示唆する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

Otsubo T, Hida Y, Ohga N, Sato H, Kai T, Matsuki Y, Takasu H, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Nonomura K, Hida K: Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells, Cancer Sci, in press 査読有  
Kondoh M, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Maishi N, Alam Mohammad

Towfik, Inoue N., Shindoh M. and Hida K. : Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment, PLoS ONE, 8(11), e80349, 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0080349 査読有

Akhter A., Hayashi Y., Sakurai Y., Ohga N., Hida K., Harashima H. : A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence Int J Pharm 456(1) ,195-201, 2013 査読有

Osawa T., Ohga N., Akiyama K., Hida Y., Kitayama K., Kawamoto T., Yamamoto K., Maishi N., Kondoh M., Onodera Y., Fujie M., Nonomura K., Shindoh M. and Hida K. : Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis, Br J Cancer, 109(8), 2237-2247, 2013 DOI: 10.1038/bjc.2013.535 査読有

Kibria G., Hatakeyama H., Ohga N., Hida K., Harashima H. : The effect of liposomal size on the targeted delivery of doxorubicin to Integrin  $\alpha v(\beta)3$ -expressing tumor endothelial cells, Biomaterials, 34(22), 5617-5627, 2013 査読有

Yamada Y., Hashida M., Hayashi Y., Tabata M., Hyodo M., Naznin Ara., Ohga N., Hida K., Harashima H. : An approach to transgene expression in liver endothelial cells using a liposome-based gene vector coated with hyaluronic acid, J Pharm Sci, 102(9), 3119-3127, 2013 査読有

Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Hida Y., Kitayama K., Kawamoto T., Osawa T., Suzuki Y., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., Hida K. : The F-prostaglandin receptor is a novel marker for tumor endothelial cells in renal cell carcinoma, Pathol Int, 63(1), 37-44, 2013 DOI: 10.1111/pin.12031 査読有

澁川 統代子、三古谷 忠、松沢 祐介、伊藤 裕美、曾我部 いづみ、山本 栄治、戸塚 靖則、鄭 漢忠、二段階口蓋形成術を施行した片側完全唇顎口蓋裂児における咬合関係の評価、北海道歯学会雑誌、33号2巻、2013、140 - 152 査読有

Naznin Ara., Hyodo M., Ohga N., Hida K., Harashima H.: Development of a novel DNA aptamer ligand against primary cultured tumor endothelial cells, PLoS ONE, 7(12), e50174, 2012 査読有

Osawa T., Ohga N., Hida Y., Kitayama

K., Akiyama K., Onodera Y., Fujie M., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., Hida K. : Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner, Cancer Sci, 103(6), 1038-1044, 2012 査読有

Kawamoto T., Ohga N., Akiyama K., Hirata N., Kitahara S, Maishi N., Osawa T., Yamamoto K., Kondoh M., Shindoh M., Hida Y., Hida K. : Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis, PLoS ONE, 7(3), e34045, 2012 査読有

Yamamoto K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Kitayama K., Akiyama K., Osawa T., Kondoh M., Matsuda K., Onodera Y., Fujie M., Kaga K., Hirano S, Shinohara N., Shindoh M., Hida K. : Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells, Br J Cancer, 106(6), 1214-1223, 2012 査読有

Maishi N., Ohga N., Hida Y., Akiyama K., Kitayama K., Osawa T., Onodera Y., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., Hida K. : CXCR7 : A novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma, Pathol Int, 62(5), 309-317, 2012 査読有

Ohga N., Ishikawa S., Maishi N., Akiyama K., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Osawa T., Yamamoto K., Kondoh M., Ohmura H., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., Hida K. : Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells: Comparison between Tumor Endothelial Cells Isolated from Highly Metastatic and Low Metastatic Tumors, Am J Pathol, 180(3), 1294-1307, 2012 査読有

Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Ishikawa S., Maishi N., Akino T., Kondoh M., Matsuda A., Inoue N., Shindoh M. and Hida K. : Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 upregulation via VEGF signaling in tumor microenvironment, Am J Pathol, 180(3), 1283-1293, 2012 査読有

Kibria G., Hatakeyama H., Ohga N., Hida K., Harashima H.: Dual-ligand modification of PEGylated liposomes shows better cell selectivity and efficient gene delivery, J Controlled Release, 153(2), 141-148, 2011 査読有

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*, 130(1), 59-70, 2011 査読有

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*, 104(5), 819-829, 2011 査読有

Nitta Y., Hida K., Kitamura T., Higashino F., Ohga N., Fukushima K., Shindoh M.: Phenotype of tumor lymphatic vessels is a prognostic factor in human tongue squamous cell carcinoma, *Oncol Lett*, 2(1), 79-83, 2011 査読有

三古谷 忠、松沢 祐介、曾我部 いづみ、伊藤 裕美、山本 栄治、澁川 統代子、金子 知生、三上 愛、今井 智子、道念 正樹、村上 有二、渡辺 政明、中村 英司、井上 農夫男、戸塚 靖則、北海道大学病院高次口腔医療センターにおける口唇裂・口蓋裂患者の臨床統計的調査、*日本口蓋裂学会雑誌*、36(3) 2011、166 - 173 査読有

[学会発表](計12件)

松沢祐介、歯の移植の実際と成功のポイント、第58回日本口腔外科学会、2013.10.13 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 福岡

鳥居ちさほ、大賀則孝、秋山廣輔、間石奈湖、北條敬之、大廣洋一、小野貢伸、戸塚靖則、鄭 漢忠、樋田泰浩、進藤正信、佐藤靖史、樋田京子、口腔扁平上皮癌における新規予後因子 Vasohibin-1、第46回北海道病理談話会、2013.10.12、北海道大学 札幌

鳥居ちさほ、大賀則孝、秋山廣輔、間石奈湖、北條敬之、大廣洋一、小野貢伸、戸塚靖則、鄭 漢忠、樋田泰浩、進藤正信、佐藤靖史、樋田京子、口腔扁平上皮癌における新規予後因子 Vasohibin-1 の発現解析、第72回日本癌学会学術総会、2013.10.4 パシフィコ横浜 横浜

Yusuke Matsuzawa, Tadashi Mikoya, Toyoko Shibukawa, Izumi Sogabe, Yumi Ito, Kanchu Tei. Monocortical mandibular bone grafting for reconstruction of alveolar cleft followed by implant placement : report of a case. 12<sup>th</sup> International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, May 5 - 10, 2013. Hilton Orlando Lake Buena

Vista, Orland, USA

Hida K., Omura H., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Kawamoto T., Kondoh M., Hida Y. : Characterization of stem-like tumor endothelial cells, The 20th annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7, Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima, Japan

Ohga N., Yamamoto K., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Shindoh M., Hida K. : Biglycan is an autocrine angiogenic factor of tumor endothelial cells , The 20th annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7, Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima, Japan

Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik., Kawamoto T., Omura H., Yamada K., Torii C., Sakamoto H. Matsuda A., Hida K.: Tumor endothelium acquires drugresistance by MDR1/P-gp upregulation and metronomic chemotherapy combined with P-gp inhibitor enhances antiangiogenic activity in vivo , The 20th annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7, Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima, Japan

Kondoh M., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Hida Y., Shindoh M., Hida K.: Hypoxia induces angiogenic factors and aneuploidy in microvascular endothelial cells , The 20th annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7, Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima, Japan

松沢祐介、鄭 漢忠、小児の歯の移植に関する臨床統計的検討 .第24回日本小児口腔外科学会 2012.11.25 愛知学院大学 名古屋

松沢祐介、三古谷忠、澁川統代子、曾我

部いづみ, 伊藤裕美, 北村哲也, 進藤正信, 口蓋裂児の舌に発生した glial choristoma の 1 例 . 第 57 回日本口腔外科学会 2012.10.19 パシフィコ横浜 横浜

Yamamoto K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Kitayama K., Akiyama K., Osawa T., Kondoh M., Kaga K., Shinohara N., Shindoh M., Hirano S., Hida K. :Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumor endothelial cells, the 17th International Vascular Biology Meeting, 2012.6.5, Rhein-Main Hallen, Wiesbaden, Germany

松沢 祐介, 三古谷 忠, 澁川 統代子, 曾我部 いづみ, 伊藤 裕美, 井上 農夫男, 戸塚 靖則, 当科における顎裂部へのインプラントの適応 . 第 56 回日本口腔外科学会 2011.10.23 大阪国際会議場 大阪

〔図書〕(計 1 件)

松沢 祐介, 総編集 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 . 今日の治療指針 私はこう治療している Volume55 . 医学書院, 2013 : 1329

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松沢 祐介 (MATSUZAWA, Yusuke)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 30351620

### (2)研究分担者

大賀 則孝 (OGA, Noritaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 40548202

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

(平成 25 年 6 月 14 日削除)