

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890007

研究課題名(和文)腫瘍血管のがん転移への関与の解明とがん転移の制御

研究課題名(英文)Elucidation of involvement of tumor blood vessel in tumor metastasis and regulation of tumor metastasis

研究代表者

間石 奈湖 (Maishi, Nako)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00632423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管内皮細胞ががんの転移の過程において、がん細胞にどのように影響を与えるのかを検討した。血管内皮細胞のがん転移への関与について *in vivo* で解析を進め、転移能が高いがん由来の血管内皮細胞によるがん転移促進の可能性が示唆された。高転移性腫瘍内の血管内皮に特異的に発現する分子について、いくつか候補を見つけた。候補分子をノックダウンすると、上記でみられたがん転移促進がキャンセルされた。さらに、がん患者臨床検体においても、腫瘍血管にそのマーカーの発現が確認された。悪性度の高いがんにおいて、血管内皮細胞由来の分子ががんの転移に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of tumor endothelial cells on tumor cells in tumor metastasis. *In vivo* analysis showed that highly metastatic tumor derived endothelial cells could promote tumor metastasis. We found some genes were upregulated in highly metastatic tumor-derived endothelial cells. When the genes were knocked down, tumor metastasis promoted by tumor endothelial cells described above was cancelled. Furthermore, the expression of the molecules in tumor blood vessels was confirmed in human clinical samples. These data suggested that the molecules which were upregulated in highly metastatic tumor-derived endothelial cells were involved in tumor metastasis.

研究分野：腫瘍血管新生

科研費の分科・細目：医歯薬学・外科系歯学

キーワード：転移 腫瘍血管

1. 研究開始当初の背景

(1) がん患者の死亡原因の9割は、がんの転移によるものであり、がん転移は患者の予後を不良にする最大の要因である。がんの血行性転移の初期過程では、がん細胞が血管内皮に遊走、接着し、さらには血管内皮間を通り抜けて血管内に侵入する intravasation のステップが必須であることから、腫瘍血管はがんへの栄養供給だけではなく、がんの転移にも重要な関門としての役割を担っている。

(2) これまで申請者が所属する研究グループでは、腫瘍血管内皮細胞の分離と培養に成功し、それらが正常血管内皮と比較して遺伝子発現が異なること、growth factor や薬剤感受性が異なることなど、様々な異常性を見出してきた。さらに高転移性腫瘍由来血管内皮細胞が低転移性腫瘍由来血管内皮細胞に比べ、さまざまな異常性を獲得していることを最近見出した。そこで高転移性腫瘍内では血管内皮細胞が、がんの転移に積極的に関わっている可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

腫瘍血管内皮細胞、特に高転移性腫瘍由来の血管内皮細胞が、がんの転移を促進していることを in vivo において示す。さらに高転移性腫瘍由来血管内皮細胞において発現が高い分子のうち、がん転移に関与する分子の同定を行い、メカニズムの解明とその分子制御によるがん転移の制御を試みる。

3. 研究の方法

(1) in vivo における血管内皮細胞のがん転移促進の解析：高転移性腫瘍由来血管内皮細胞 (HM-TEC)、低転移性腫瘍由来血管内皮細胞 (LM-TEC)、正常皮膚由来血管内皮細胞 (NEC) にそれぞれ GFP 遺伝子導入を行い、Luciferase 遺伝子および RFP 遺伝子導入を行った低転移能のがん細胞と共にマウスに皮下移植し、転移の違いを比較する。解析方法は、Circulating Tumor Cell (CTC) として RFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで検出し、CTC 数を比較する。また、in vivo imaging 装置 (IVIS Spectrum) を用いて Luciferase 陽性細胞を検出し、肺転移を評価する。

(2) 高転移性腫瘍内の血管内皮に特異的に発現する分子の同定：これまで見出してきた悪性腫瘍由来の血管内皮細胞に特異的に発現する腫瘍血管内皮細胞マーカーのうち、低転移性腫瘍由来血管内皮に比べ、高転移性腫瘍由来血管内皮に有意に高く発現している分子を同定する。それらの分子に対し、siRNA によりノックダウンを行って、まず in vitro で腫瘍細胞の血管内皮への遊走、接着、細胞間隙遊走への影響を解析する。

(3) 高転移性腫瘍由来血管内皮細胞が発現する分子のがん転移促進に関わる in vivo 解析：高転移性腫瘍由来血管内皮に有意に高く発現している分子に対する sh ウィルスベクターの遺伝子組み換えを行い、高転移性腫瘍由来血管内皮に遺伝子導入する。それにより、安定してその分子の発現をノックダウンすることができる。ノックダウンを行った腫瘍血管内皮と、Luciferase 遺伝子および RFP 遺伝子導入を行った低転移性がん細胞をマウスに共移植し、上記同様、CTC 数および肺転移を評価する。

(4) 臨床検体におけるマーカーの発現と転移の検討：臨床検体において、上記で同定した腫瘍血管内皮マーカーの発現と転移、患者の予後との関連について病理学的な検索を行う。

4. 研究成果

(1) in vivo における血管内皮細胞のがん転移促進の解析：各血管内皮細胞に GFP 遺伝子導入を行い、がん細胞には Luciferase/ RFP 遺伝子導入を行った。がん細胞と血管内皮細胞をマウスに皮下移植し、転移の違いを比較した。HM-TEC 存在下ではがんの転移が促進された。

(2) 高転移性腫瘍内の血管内皮に特異的に発現する分子の同定：腫瘍血管内皮細胞マーカーのうち、LM-TEC に比べ、HM-TEC に有意に高く発現している分子をいくつかピックアップした。それらの分子に対する siRNA を用いて、in vitro で腫瘍細胞の血管内皮への遊走、接着、細胞間隙遊走への影響を解析した。遺伝子 X がノックダウンされた HM-TEC に対する腫瘍細胞の遊走が有意に抑制された。

(3) HM-TEC が発現する分子のがん転移促進に関わる in vivo 解析：上記(2)でピックアップされた遺伝子 X に対する sh ウィルスベクターの遺伝子組み換えを行った。ノックダウンされた HM-TEC とがん細胞をマウスに共移植すると、上記で促進された肺転移が抑制された。

(4) 臨床検体におけるマーカーの発現と転移の検討：腎癌、肝臓癌、大腸癌などの臨床検体において、上記で同定した腫瘍血管内皮マーカーの発現を免疫染色法により解析した。病理学的な背景や予後との関連は、症例数を増やして検討中である。

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7件)

1. Otsubo T., Hida Y., Ohga N., Sato H., Kai T.,

- Matsuki Y., Takasu H., Akiyama K., **Maishi N.**, Kawamoto T., Shinohara N., Nonomura K. and Hida K. : Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expression of Tumor and Normal Endothelial Cells, **Cancer sci**, 105(2014), 560-567, 2014 査読有
DOI: 10.1111/cas.12394
2. 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 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0080349
3. Hida K., Ohga N., Akiyama K., **Maishi N.**, Hida Y. : Heterogeneity of tumor endothelial cells, **Cancer Sci**, 104(11), 1391-1395, 2013 査読有
DOI: 10.1111/cas.12251
4. 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, 2237-2247, 2013 査読有
DOI: 10.1038/bjc.2013.535
5. **Maishi N.**, Kawamoto T., Ohga N., Yamada K., Akiyama K., Yamamoto K., Osawa T., Hida Y. and Hida K. : Application of POLARIC™ fluorophores in an in vivo tumor model, **Oncol Rep**, 30(4), 1695-1700, 2013 査読有
DOI: 10.3892/or.2013.2620
6. 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 査読有
DOI: 10.1111/pin.12031
7. Hida K., Akiyama K., Ohga N., **Maishi N.**, Hida Y. : Tumor endothelial cells acquire drug resistance in a tumor microenvironment, **J Biochem**, 153(3), 243-249, 2013 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvs152
- [学会発表](計10件)
1. **Maishi N.**, et al: Tumor endothelial cells promote metastasis, The 18th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2013.11.30, 岐阜都ホテル(岐阜市)
2. **閻石奈湖**など: がん転移における腫瘍血管内皮細胞の役割, 第46回北海道病理談話会, 2013.10.12 北海道大学(札幌市)
3. **閻石奈湖**など: 血管内皮細胞によるがん転移促進, 第72回日本癌学会学術総会, 2013.10.3-5 パシフィコ横浜(横浜市)
4. **閻石奈湖**など: がん転移における腫瘍血管内皮細胞の役割, 第21回日本血管生物医学学会学術集会, 2013.9.26-28 千里阪急ホテル(大阪府豊中市)
5. **閻石奈湖**など: がん転移における腫瘍血管内皮細胞の役割, 第22回日本がん転移学会学術集会・総会, 2013.7.11-12 ホテルブエナビスタ(松本市)
6. **閻石奈湖**など: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移への関与, 第102回日本病理学会総会, 2013.6.6-8 ロイトン札幌, さっぽろ芸文館(札幌市)
7. **閻石奈湖**など: 転移能の異なる腫瘍由来の血管内皮細胞の特性解析, 第67回日本口腔科学会学術集会, 2013.5.22-24 栃木総合文化センター(宇都宮市)
8. **閻石奈湖**など: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移への関わり, 第67回日本口腔科学会学術集会, 2013.5.22-24 栃木総合文化センター(宇都宮市)
9. **閻石奈湖**など: The role of tumor endothelial cells in tumor metastasis, 第71回日本癌学会学術総会, 2012.9.21 ロイトン札幌(札幌市)
10. **閻石奈湖**など: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移への関わり, 第92回北海道医学大会(第106回北海道癌談話会例会 腫瘍系分科会), 2012.9.8 北海道大学(札幌市)
- [図書](計0件)
- [産業財産権]
出願状況(計0件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
取得状況(計0件)
名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/vascular-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間石 奈湖 (MAISHI, Nako)
北海道大学・大学院歯学研究科・特任助教
研究者番号：00632423

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：