

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462846

研究課題名(和文)腫瘍血管における薬剤抵抗性関連トランスポーター発現解析

研究課題名(英文)Analysis of the expression of drug resistance-related genes in tumor blood vessels

## 研究代表者

鈴木 裕子 (SUZUKI, Yuko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・学術研究員

研究者番号：90646118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで正常血管内皮細胞に比べ、腫瘍血管内皮細胞において薬剤抵抗性関連トランスポーター P-glycoprotein (P-gp) の発現が高いことを見出した。本研究では、これらのトランスポーター発現ががんの治療抵抗性に関わる可能性について検討した。In vitroにおいて腫瘍血管内皮細胞にPaclitaxelとP-gp阻害剤を併用すると、Paclitaxel単独処理よりも増殖抑制効果が得られた。担癌マウスにPaclitaxelとP-gp阻害剤を投与すると、Paclitaxel単独投与よりも抗腫瘍効果が得られた。腫瘍血管内皮のP-gp阻害ががん治療に有用である可能性が示唆された。

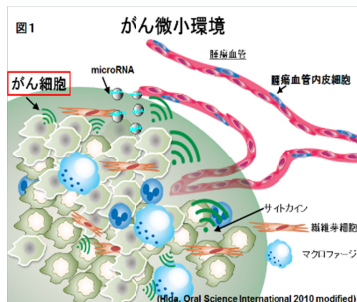
研究成果の概要(英文)：We have reported that drug resistance-related gene, P-glycoprotein (P-gp) is upregulated in tumor endothelial cells (TECs). In this study, we examined the involvement of P-gp expression of TEC in cancer refractory. When TECs were treated with both paclitaxel and P-gp inhibitor, TEC proliferation was inhibited compared to paclitaxel alone group. Combination treatment with paclitaxel and P-gp inhibitor abrogated TEC resistance in mouse tumor model. These results suggested that inhibiting P-gp in TECs may be a good strategy for cancer therapy.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：腫瘍血管 薬剤抵抗性 トランスポーター

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の抗がん剤に対する薬剤耐性は、がんの再発や予後不良に大きく影響する重要な因子である。腫瘍微小環境において、がんの間質細胞もその薬剤抵抗性に重要な役割を担っていることが報告されている。このがん間質細胞が新たながん治療に対する薬剤耐性のメカニズムとして注目を浴びてい



る(図1)。

がん間質における腫瘍血管は、腫瘍の進展や転移に重要な働きを担っており、腫瘍血管を標的とする血管新生阻害療法が新たな癌の治療戦略として期待されている。血管新生阻害療法の1つに抗がん剤を低濃度・長期間投与することで腫瘍血管をたく Metronomic Chemotherapy があるが、がん種によっては十分に奏功していない。これまでに代表者が所属する血管生物学教室では、舌癌、腎がん、メラノーマなどの4種の腫瘍由来の腫瘍血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cell: TEC) の分離・長期培養に成功し、正常血管内皮細胞 (Normal Endothelial Cell: NEC) に比べ様々な異常性があることを報告してきた。また、がん細胞由来液性因子によって血管内皮細胞も薬剤耐性関連トランスポーターの一つ P-glycoprotein (P-gp) の発現亢進を伴った薬剤耐性を獲得しうることを見出し、腫瘍血管におけるトランスポーターの発現亢進はがんの治療抵抗性に重要ではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

腫瘍血管内皮細胞における薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析を行い、血管新生阻害療法に対する治療抵抗性との相関を検討するとともに、薬剤耐性を回避できる新たな治療法の開発を目指した基盤研究を行う。

### 3. 研究の方法

(1) マウス血管内皮細胞の分離培養：ヌードマウスゼノグラフト腫瘍から腫瘍血管皮細胞を分離する。正常コントロールとして正常マウス皮膚から正常血管内皮細胞を分離する。腫瘍血管内皮細胞は腫瘍組織中の細胞のうち2~5%しかおらず、希少である。PCR法とフローサイトメーターを用いて、分離した血管内皮の特性解析をおこなう。

(2) 血管内皮細胞の薬剤耐性関連トランス

ポーター発現解析：組織免疫染色法により、腫瘍血管における薬剤耐性関連トランスポーター発現解析を行う。分離培養後の血管内皮細胞からRNAならびにタンパクを採取し、遺伝子レベル、タンパクレベルでの薬剤耐性関連トランスポーター発現解析を行う。

(3) In vitro における抗がん剤とトランスポーター阻害剤併用療法の有効性の検討：in vitro において腫瘍血管内皮細胞の抗がん剤に対する抵抗性がP-gp阻害剤でキャンセルされるかを検討する。トランスポーター阻害剤としてベラパミルを使用し、増殖能をMTS assayにより検討する。

(4) In vivo における抗がん剤とトランスポーター阻害剤併用療法の有効性の検討：マウス腫瘍モデルにおいて、抗がん剤とトランスポーター阻害剤を用いて、血管新生阻害効果が得られるか検討する。腫瘍径の計測、CD31陽性血管計測による微小血管密度の算出、Cleaved Caspase-3染色による腫瘍細胞および腫瘍血管におけるアポトーシス細胞数の算出を行い評価する。

(5) 臨床検体における腫瘍血管の薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析：共同研究を行っている臨床講座から腎がん、消化器がんなどの臨床検体を入手し、組織免疫染色により腫瘍血管の薬剤耐性関連トランスポーター発現量を解析する。

### 4. 研究成果

(1) マウス血管内皮細胞の分離培養：ヒト腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍塊から腫瘍血管皮細胞を、正常コントロールとして正常マウス皮膚から正常血管内皮細胞を分離し、培養した。PCR法とフローサイトメーター解析により、分離した血管内皮が血管内皮マーカーCD31、VE-cadherinを発現し、ヒト癌細胞マーカーhHB-EGFや血球細胞CD45、CD11bの発現が陰性であることを確認した。他細胞の混入がない純度の高い細胞を得ることができ、以下の解析に用いた。

(2) 血管内皮細胞の薬剤耐性関連トランスポーター発現解析：蛍光二重組織免疫染色により腫瘍血管におけるP-gpの発現を検討した。CD31陽性血管にP-gpが共局在し、腫瘍血管におけるP-gp発現が観察された。分離培養後の血管内皮細胞の薬剤耐性関連トランスポーター発現解析を行ったところ、NECに比べTECでMDR1遺伝子ならびにP-gp発現の亢進が認められた。

(3) In vitro における抗がん剤とトランスポーター阻害剤併用療法の有効性の検討：in vitro において腫瘍血管内皮細胞に抗がん剤PaclitaxelとP-gp阻害剤ベラパミルを併用したところ、Paclitaxel単独処理に比べ、

P-gp 阻害剤併用により,腫瘍血管内皮細胞の増殖が抑制された.

(4) In vivo における抗がん剤とトランスポーター阻害剤併用療法の有効性の検討: マウスに腫瘍細胞を皮下移植し, 抗がん剤 Paclitaxel 単独投与ならびにトランスポーター阻害剤ベラパミルもしくは PSC833 の併用療法による抗腫瘍効果の違いを比較した. 抗がん剤単独投与に比べ, トランスポーター阻害剤併用により, 腫瘍体積, 微小血管密度ならびに転移が抑制された. また組織免疫染色により Cleaved Caspase-3 染色が腫瘍血管でも見られ, 腫瘍血管のトランスポーター阻害を介して抗腫瘍効果が得られたことが示された.

(5) 臨床検体における腫瘍血管の薬剤耐性関連トランスポーターの発現解析: 腎がん, 大腸がんの癌部ならびに非癌部の組織検体を用いて, 血管マーカーCD31 とトランスポーターP-gp の蛍光二重免疫染色を行った. 腫瘍血管にのみ P-gp 発現が認められ, マウスで得られた知見がヒトでもあてはまることを確認した.

#### 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6件)

1. Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M., Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and \*Hida K. : CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836 2015, DOI: 10.1002/ijc.29655 査読あり
2. Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and \*Hida K. : Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015, DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017 査読あり
3. Ohmura-Kakutani H., Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Iida J., Shindoh M., Tsuchiya K., Shinohara N., \*Hida K. : Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype, *PLoS ONE*, 9(12):e113910, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0113910. 査読あり
4. Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N.,

Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and \*Hida K. : Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 105(12), 1533-1540, 2014, DOI: 10.1111/cas.12549. 査読あり

5. 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*, 105(5), 560-567, 2014, DOI: 10.1111/cas.12394 査読あり
6. Akiyama K., Maishi N., Ohga 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 査読あり DOI: 10.1111/pin.12031

[学会発表](計13件)

1. Maishi N. : Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (国際学会) 2016.3.30 (Breckenridge, Colorado, USA)
2. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K. : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, Tenth AACR-JCA Joint Conference "Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics" (国際学会) 2016.2.17 (Maui, Hawaii, USA)
3. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本(永尾)宗子, Mohammad Alam T., 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.8 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
4. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K. : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, The European Cancer Congress 2015 (国際学会) 2015.9.27 (Vienna, Austria)
5. Maishi N., Hida K. : Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors, Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization (招待講演)(国際学会), 2015.5.13 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪)

- 府・吹田市)
6. 間石奈湖, 樋田京子: 第 33 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, “腫瘍血管内皮のがん転移促進機構” (招待講演) 2015.1.30 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)
  7. Maishi N., Hida K.: The 17th HU-SNU JOINT SYMPOSIUM “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anti-angiogenic therapy”, (招待講演) (国際学会) 2014.11.28 北海道大学(北海道・札幌市)
  8. 大賀則孝, 近藤美也子, 秋山廣輔, 間石奈湖, 北川善政, 樋田泰浩, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍内低酸素環境と腫瘍血管内皮の異常性の関連, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014.9.25 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  9. Maishi N., Hida K.: 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anticancer drugs” (招待講演)(国際学会) 2014.5.26 (Istanbul, Turkey)
  10. Maishi N., Ohba Y., Ohga N., Akiyama K., Hamada J., Yamamoto Y., Kawamoto T., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells promote metastasis, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17 (国際学会) みやこめっせ(京都府・京都市)
  11. Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Omura H., Yamada Y., Torii C., Shindoh M., Ohba Y., Hida K., P-gp inhibitor enhances antiangiogenic activity in metronomic chemotherapy, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17(国際学会) みやこめっせ(京都府・京都市)
  12. 秋山廣輔, 大賀則孝, 樋田泰浩, 間石奈湖, Alam Mohammad Towfik, 川本泰輔, 大村 瞳, 山田健司, 鳥居ちさほ, 進藤正信, 大場雄介, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞を標的としたメトロノミックケモセラピーとP-gp阻害剤の併用療法の有効性の検討, 第 46 回北海道病理談話会, 2013.10.12 (北海道・札幌市)
  13. 秋山廣輔, 大賀則孝, 樋田泰浩, 間石奈湖, Alam Mohammad Towfik, 川本泰輔, 大村瞳, 山田健司, 鳥居ちさほ, 進藤正信, 大場雄介, 樋田京子: P-gp 阻害剤はメトロノミックケモセラピーの血管新生阻害効果を強める, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013.10.4 (神奈川県・横浜市)

〔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

鈴木 裕子 (SUZUKI, Yuko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・学術研究員

研究者番号: 90646118

### (2) 研究分担者

大賀 則孝 (OHGA, Noritaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 40548202

秋山 廣輔 (AKIYAMA, Kosuke)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号: 10609100

間石 奈湖 (MAISHI, Nako)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号: 00632423