

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861218

研究課題名(和文) 微小循環系の制御による消化管腫瘍の悪性化阻止への試み

研究課題名(英文) Modulation of the tumor microenvironment for gastrointestinal cancer treatment

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管新生を促進するVasohibin-2を制御することで、自然発症腫瘍の悪性化を制御し、腫瘍内微小環境を正常化できないか検証する事を目的とした。ApcMin+/Vash2-/-マウスでは、腫瘍の減少や、血管の正常化などが見られるため、マイクロアレイにて発現遺伝子の解析を行なった。コントロールに比べ、炎症や腫瘍発症に関係のあるIL-6ファミリーなどの発現が優位に下がっていることに加え、マクロファージの発現にも変化が見られた。このように、腫瘍内微小環境を制御することができれば、腫瘍発症に関連する慢性炎症も押さえられ、VASH2の臨床応用に大いに期待がもてると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Vasohibin-2 has been identified as an extrinsic and vascular endothelial growth factor independent angiogenic factor that is highly expressed in tumor cells. In the present study, we aimed to find whether pre-existing vascular changes can be used to predict tumor transformation as benign or malignant. We sought to characterize the microvascular changes and tumor development in the intestinal tract of ApcMin/+ mice and the ApcMin+/Vash2-/- mice. ApcMin+/Vash2-/- mice showed a significant decrease in the number of polyps in the intestine. In addition, functional tumor blood vessels were decreased, and pericyte coverage tumor vessels were increased. On the other hand, the expression of Epiregulin and IL-6 family was down-regulated in ApcMin+/Vash2-/- mice. And also, the M2 like Macrophage was decreased in tumors of ApcMin+/Vash2-/- mice. These results indicated that VASH2 regulates tumor onset in the gastrointestinal tract by changing tumor microenvironment.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍血管新生 腫瘍微小環境 消化器癌 VASH2 Apcマウス Normalization

### 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、様々な増殖因子群による複雑な分子経路を利用して血管やリンパ管の新生を行っている(Folkman ら 1992)。また、予後を決める重要な問題として、微小循環系を介したリンパ節転移や遠隔転移がある。したがって、その微小循環系の新生メカニズムの解明は、抗血管療法、抗リンパ管療法などの臨床治療への応用に不可欠である。しかし、腫瘍血管やリンパ管がどのような機序で、どのような形態的变化を伴って新生していくのか？また、どのような形態変化が起こって転移が成立するのか？という問題は移植腫瘍の研究はすすんでいるものの、臨床で最も重大な関心事である生体内の現場、つまり自然発症腫瘍において、未だ未解決のままである。

### 2. 研究の目的

本研究の目指す最終的ゴールは、上皮の悪性化に伴う腫瘍血管・リンパ管の変化を防ぎ、悪性転化自体を防ぐ画期的な抗脈管(血管、リンパ管)療法の開発のための基礎的理解を得る事である。申請者は、前回の科研費において用いてきた消化管に腫瘍を自然発症する *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスに、血管新生因子 Vasohibin-2 (VASH2) ノックアウトマウスを掛け合わせて、*Apc<sup>Min/+</sup>/Vash2<sup>-/-</sup>* マウスを作製し、*Vash2* 欠損下で自然発症する腫瘍の増殖および微小循環系(血管、リンパ管)の変化の過程を、その形態的、機能的に解析し、抗腫瘍血管療法をはじめとする治療への応用を目的として、3カ年の研究を行った。

### 3. 研究の方法

*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスに自然発症する腫瘍が VASH2 とどのように関わるのか？また、VASH2 の発現を抑制することにより、腫瘍内の微小環境がどのように変化するのかを形態的アプローチとして；

- (1) 多重免疫染色とレクチン灌流法と組み合わせた三次元イメージング法
- (2) 透過型電子顕微鏡による微細構造の解析
- (3) 組織を丸ごと観察するための全載伸展標本による三次元解析機能的アプローチとして；
- (4) レクチン染色による糖鎖の解析
- (5) RT-PCR 法やマイクロアレイ法などを主な研究手段として形態、機能の両側面から生命現象を解析した。

### 4. 研究成果

生後 12 週より消化管に腫瘍を多発する *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスでは、消化管上皮が腫瘍化していく段階で、異型を示す腫瘍細胞に VASH2 の発現が見られた。また、*Vash2<sup>-/-</sup>* マウスに腫瘍を移植したモデルにおいて、有意に腫瘍増殖

の抑制と腫瘍血管新生の抑制が見られた。

そこで、*Apc<sup>Min/+</sup>/Vash2<sup>-/-</sup>* マウスを作製し、その腫瘍血管の微細構造をみると、*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスの腫瘍血管は周皮細胞の被覆が不十分な未熟な形態であるのに比して、*Apc<sup>Min/+</sup>/Vash2<sup>-/-</sup>* マウスの腫瘍血管は周皮細胞で被覆された成熟化した血管の形態であった(図1)

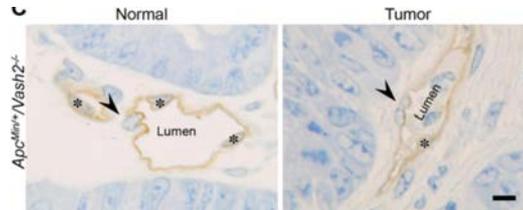


図1 *Apc<sup>Min/+</sup>/Vash2<sup>-/-</sup>* マウスの腫瘍内には血管周皮細胞が被覆した成熟化した腫瘍血管が確認できる。トルイジンブルー、CD31 染色。Bar : 25  $\mu$ m

さらに、*Apc<sup>Min/+</sup>/Vash2<sup>-/-</sup>* マウスに発症する腫瘍を観察してみると、消化管における腫瘍の発症率に有意な低下がみられた。また、マイクロアレイにて発現遺伝子を解析してみると、炎症や腫瘍発症に関係のある IL-6 ファミリーやエピレグリンなどの発現が優位に下がっていた。

このように、腫瘍血管を含む腫瘍内微小環境を制御することができれば、結果的に腫瘍発症に関連する慢性炎症も押さえられることが確認できた。今後、VASH2 を制御することは、血管新生のみならず、腫瘍増殖の抑制ができ、将来の臨床応用への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 7 件)

① Kitahara S, Matsui A, Yoshii A, Kuwahara Y, Nishio M, Saeki K, Ezaki T, Endothelial Cell Transplants in Tumors Restore Normal Vasculature, Reduce Tumor Hypoxia, and Suppress Tumor Outgrowth, *J Oral Bio Sci*, 査読有, Vol. 3, 2016, in press

② Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, Ng MR, Hato T, Huang Y, Ochiai H, Kitahara S, Unan EC, Reddy TP, Fan C, Huang P, Bardeesy N, Zhu AX, Jain RK, Duda DG, CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-PD-1 immunotherapy in sorafenib-treated HCC in mice, *Hepatology*, 査読有, Vol. 61, No. 5, 2015, pp.1591-602

③ Suenaga K, Kitahara S, Suzuki Y,

Kobayashi M, Horie S, Sugawara J, Yaegashi N, Sato Y. Role of the vasohibin family in the regulation of fetoplacental vascularization and syncytiotrophoblast formation, PLoS One, 査読有, Vol. 9, No. 9, e104728, 2014

④ Yoshii A, Kitahara S, Ueta H, Matsuno K, Ezaki T. Role of uterine contraction in regeneration of the murine postpartum endometrium, Biol Reprod, 査読有 Vol. 91, No. 2, 2014

⑤ Kitahara S, Suzuki Y, Morishima M, Yoshii A, Kikuta S, Shimizu K, Morikawa S, Sato Y, Ezaki T. Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis, Mol Cancer, 査読有, Vol. 13, No. 1, pp. 99, 2014

⑥ Kuwahara Y, Mori M, Kitahara S, Fukumoto M, Ezaki T, Mori S, Echigo C, Fukumoto M, Targeting of tumor endothelial cells combining 2 Gy/day of X-ray with Everolimus is the effective modality for overcoming clinically relevant radioresistant tumors, Cancer Med, 査読有, Vol. 3, No. 2, pp. 310-21, 2014

⑦ Momoki Y, Kitahara S\*, Kuwahara K, Sasaki R, Ando T: Establishment of a normalized revascularization mouse model using tumor transplantation, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, Vol. 26, No. 1, pp. 80-88, 2014. \*Corresponding author

[学会発表] (計 10 件)

① 血管新生抑制による消化管腫瘍内微小環境の変化の解析、第 121 回日本解剖学会総会、2016 年 3 月 30 日、ビッグパレット福島 (福島)

② Vasohibin-2 抑制による消化管腫瘍内微小環境の変化の解析、第 23 回日本血管生物医学学会、2015 年 12 月 10 日、神戸国際会議場 (兵庫)

③ Myometrial contraction accelerates the endometrial scarless healing in the postpartum uterus, FIGO2015、2015 年 10 月 7 日、バンクーバー (カナダ)

④ Vasohibin-2 modulates tumor onset by normalizing tumor angiogenesis (シンポジウム)、第 120 回日本解剖学会総会、2015 年 3 月 21 日、神戸国際会議場 (兵庫)

⑤ Vasohibin-2 regulates tumor onset in

the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis、国際血管生物学会、2014 年 4 月 15 日、京都国際会議場 (京都)

⑥ 腫瘍の増殖環境変化にともなう腫瘍血管系の形態学的、機能的変化、第 119 回日本解剖学会総会、2014 年 3 月 28 日、自治医大 (栃木)

⑦ Neoplastic transformation sequence in ApcMin/+ mice depends on prior microvascular changes and vasohibin-2 expression、5thAngiogenesis、2014 年 3 月 13 日、アムステルダム (オランダ)

⑧ Vasohibin-2 の抑制が消化管における自然発症腫瘍に影響を及ぼすか?、第 21 回日本血管生物医学学会、2013 年 9 月 26 日、千里阪急ホテル (大阪)

⑨ 腫瘍微小循環系の制御による腫瘍増殖抑制の試み (シンポジウム)、第 55 回歯科基礎医学学会、2013 年 9 月 20 日、岡山コンベンションセンター (岡山)

⑩ Transplanting normal endothelial cells into tumor mass retards the tumor growth by vascular reconstruction and vascular normalization、Experimental Biology、2013 年 4 月 21 日、ボストン (アメリカ)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

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

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：