

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861567

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮細胞の異常性と腫瘍の低酸素環境に関する研究

研究課題名(英文) Study on abnormality of tumor endothelial cells and hypoxic environment of tumor.

研究代表者

近藤 美弥子 (Kondoh, Miyako)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10631864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで低酸素環境が、正常血管内皮細胞に対して染色体の獲得を誘発する可能性と、その機序に活性酸素種(ROS)が重要な役割を果たしている可能性を見出してきた。低酸素状態における正常血管内皮細胞の挙動について検討した。低酸素条件で培養すると、正常血管内皮細胞に染色体異常をもたらす可能性が示唆された。また、その条件では腫瘍血管内皮細胞に見られる遺伝子発現変化と同様の挙動をしめした。さらに、低酸素で産生されるROSを制御することで特定の異常性の発現をすることが示唆された。さらに腫瘍組織内において、血管内皮細胞と低酸素部位の位置的関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We recently reported that NECs may also acquire chromosomal abnormalities by ROS accumulation due to hypoxia. I examined the behavior of the NECs in the hypoxia state. It was suggested that hypoxia brought chromosome abnormality to a NECs. We have demonstrated that hypoxia causes cytogenetic abnormalities in ECs through ROS accumulation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：活性酸素種 血管内皮細胞 低酸素環境

1. 研究開始当初の背景

(1)腫瘍組織は、低酸素(Hypoxia)に陥っており、低酸素はがんの悪性と関連している。

(2)低酸素環境では細胞は酸化ストレスに曝されている。低酸素環境において産生される活性酸素種(:ROS)は、過剰に蓄積すると細胞の遺伝子異常などを誘発することが知られている。

(3)腫瘍内では、腫瘍血管もまた低酸素に曝されていることがあることを見いだした。

(4)近年、腫瘍血管内皮細胞(TEC)と正常血管内皮細胞(NEC)の間に性質の違いがあることがわかってきた。申請者らのグループでも以下のことを報告した。

TECが、上皮増殖因子レセプター(EGFR)の他にシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、血管内皮増殖因子(VEGF)、プロスタグランジンE2(PGE2)などの血管新生因子の発現が亢進していること

特異遺伝子を発現していること

ある種の抗がん剤に対して薬剤抵抗性をもつこと

染色体異常があること

(5)TECの異常性獲得の機序に関しては未だ不明な点が多い。

(6)生体内において、低酸素になっている組織は腫瘍組織だけではない。

(7)しかし、非腫瘍性の低酸素環境における血管内皮細胞は閾値を越せば細胞死に至り、TECのような異常性を獲得しているとは考えにくい。

(8)TECの異常性の獲得には、低酸素並びに腫瘍組織中に放出されている液性因子とも密接な関わりが関与している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでTECを分離・培養し、TECがNECに比べ、さまざまな点で違いがあることを報告してきた。しかし、このようなTECの異常性獲得の機序に関しては未だ不明な点が多い。申請者らは低酸素プローブを用いて、免疫染色を行い、血管周囲ですら低酸素に曝されている部位があることを確認した。さらに、正常血管内皮細胞が低酸素環境下において染色体異常を誘発する可能性があることを見いだした。近年、血管新生阻害療法に対する薬剤耐性の獲得が報告されている。その原因として腫瘍側に生じる薬剤耐性と、腫瘍環境で腫瘍血管新生が阻害された結果、低酸素状態に陥った腫瘍細胞の浸潤能の獲得などが考えられている。

腫瘍細胞の低酸素応答機構は盛んに研究されてきたが、腫瘍血管内皮細胞の異常性が明らかになりつつある現在、腫瘍細胞だけではなく、腫瘍血管内皮細胞そのものの低酸素応答機構、薬剤耐性の獲得の可能性を考慮しなければならない。腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得を制御することが、血管新生阻害療法に対する薬剤抵抗性の回避に有効であると考

えられる。

そこで本研究では、正常血管内皮細胞を低酸素環境下で培養することにより腫瘍血管内皮細胞でみられるような形質を獲得するかを解析し、TECの異常性獲得の機序の一端を明らかにすることをめざす。

3. 研究の方法

正常血管内皮細胞を腫瘍組織環境に擬似化した低酸素培養条件において培養し、細胞増殖、遊走能、接着性、薬剤応答性、未分化能の獲得の有無を検証する。我々はすでに低酸素環境が正常血管内皮細胞に対して、染色体の異常性の獲得を誘発する可能性を見いだしている。また、その機序においてROSが重要な役割を果たしている可能性も示唆してきた。

以上を踏まえ、以下の検討を行った。

(1)低酸素培養条件における細胞の表現型の解析。血管内皮細胞の増殖能、遷移能、細胞の接着能、未分化能の維持、幹細胞性の獲得の有無、薬剤耐性の有無、染色体異常の獲得の有無などを解析する。

(2)表現型の変化に伴う遺伝子発現の変化の解析による腫瘍血管内皮マーカー候補分子の探索。低酸素環境による遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析によって確認し、腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現と比較検討する。

(3)低酸素環境と活性酸素の関連の検討
低酸素で産生されるROSを抑制することで異常性の誘発を妨げることが出来るか。細胞の表現型、それに伴う遺伝子発現の変化を解析する。

正常血管内皮細胞にROSを添加することでも異常性が誘発されるかを検討する
TECの異常性が、ROSを抑制することによって変化するのかを検討する

腫瘍組織内での血管内皮の異常性獲得とROSとの因果関係をin vivoにおいて検討する。

腫瘍組織内での血管内皮の異常性獲得とROSとの因果関係をin vivoにおいて検討する。

腫瘍組織内での血管内皮の異常性獲得とROSとの因果関係をin vivoにおいて検討する。

4. 研究成果

(1)低酸素培養条件における細胞の表現型の解析

NECの増殖能:低酸素状態、正常酸素状態において増殖能に有意差のない時期を見いだした

染色体異常性の獲得の有無について:fluorescent in situ hybridization(FISH)を行った結果、低酸素環境が正常血管内皮細胞に染色体異常をもたらず可能性を示唆した

(2)表現型の変化に伴う遺伝子発現の変化の解析による新たな腫瘍血管内皮細胞マーカー候補分子の探索。Real time PCR法を用いた解析により、幾つかの遺伝子では、主要血管内皮細胞の遺伝子発現と同様の挙動を示した。

(3)低酸素環境と活性酸素の関連の検討

低酸素環境で正常血管内皮細胞を培養するとROSが産生される。このROSを抑制する

ことで異常性の誘発を妨げるかを検討し、異常性の誘発をある程度妨げることが示唆された。

正常血管内皮細胞に ROS を添加することでも異常性が誘発されることを検討した。ROS の添加により正常血管内皮細胞でも染色体異常がおこる可能性があることが示唆された。

腫瘍組織内で、低酸素に陥っている血管があることを in vivo において確認した。

腫瘍組織内で低酸素にさらされている血管内皮細胞に染色体異常がみられることを in vivo において確認した。

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 3 件)

1. Hida K, Maishi N, Dorcas AM, Kondoh K, Hojo T, Habiba U, Ohga N, Ishikawa K, Sato M, Torii C, Yanagiya M, Morimoto M, Hida Y, Shindoh M.: Aneuploidy of a murine immortalized endothelial cell line, MS1, Journal of Oral Biosciences 59: 50-54, 2016. (査読あり)

2. 近藤美弥子, 中澤誠多朗, 岡田和隆, 阿部貴恵, 山崎裕. ロフラゼブ酸エチルが奏効した高齢者味覚障害の 2 例, 日歯心身 29:24-27, 2015. (査読あり)

3. 阿部貴恵, 近藤美弥子, 岡田和隆, 亀崎良介, 和田麻友美, 北川善政, 山崎裕. 口腔内セネストパチーの 1 例, 北海道歯学会雑誌 34(2):127-131, 2014.

[学会発表](計 6 件)

1. 近藤美弥子, 岡田和隆, 阿部貴恵, 中澤誠多朗, 山崎裕: 非定型的経過をたどった三叉神経痛の 1 例, 第 29 回日本歯科心身医学会, 2014.7.26-27 神奈川歯科大学横浜クリニック(神奈川・横浜市)

2. 近藤美弥子, 中澤誠多朗, 岡田和隆, 松下貴恵, 柏崎晴彦, 山崎裕: ロフラゼブ酸エチルが奏効した高齢者味覚障害の 2 例, 日本老年歯科学会, 2014.6.13-14 電気ビルみらいホール(福岡・福岡市)

3. 近藤美弥子, 中澤誠多朗, 阿部貴恵, 岡田和隆, 山崎裕: 行動療法により良好な経過をたどった高齢者味覚障害の 1 例, 第 30 回歯科心身医学会, 2015.7.18-19 東京医科歯科大学 M&D タワー(東京・文京区)

4. 近藤美弥子, 中澤誠多朗, 松下貴恵, 岡田和隆, 柏崎晴彦, 小林國彦, 山崎裕:

高齢者における口腔インプラントの予後調査 口腔内の有害事象に関して, 日本老年歯科学会, 2015.6.12-14 パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

5. 松下貴恵, 濱田浩美, 近藤美弥子, 岡田和隆, 柏崎晴彦, 小林國彦, 山崎裕: 高齢者の習慣性顎関節脱臼に対して OK-432 による硬化療法を施行した 5 例の臨床的検討, 日本老年歯科学会, 2015.6.12-14 パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

6. 三上 翔, 松下貴恵, 岡田和隆, 島田英知, 加藤展教, 近藤美弥子, 柏崎晴彦, 小林國彦, 山崎裕: 北大高齢者における学生臨床実習の取り組み, 日本老年歯科学会, 2015.6.12-14 パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

[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

北海道大学 血管生物学教室ホームページ
<http://www.den.hokudai.ac.jp/vascular-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤美弥子 (KONDOH MIYAKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 10631864

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：