

## 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：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861698

研究課題名(和文) 転移前土壌形成における腫瘍血管内皮由来因子の役割

研究課題名(英文) The role of tumor endothelial cell derived factors in the formation of premetastatic niche

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの転移における腫瘍血管内皮細胞の役割について検討した。腫瘍血管内皮細胞において発現が高く、遊走に関わる分子としてGene Xに着目し、腫瘍血管内皮における機能ならびにがん細胞との相互作用について解析した。腫瘍血管内皮の運動能、管腔形成能に関与し、さらにはがん細胞の遊走に関与することが明らかになった。臨床病理検体を用いた発現解析により、腎がん、大腸がん、肝がんなどの腫瘍血管においてもこの分子Xの発現が認められ、マウスのみならずヒトにおいても当てはまる可能性が示唆された。

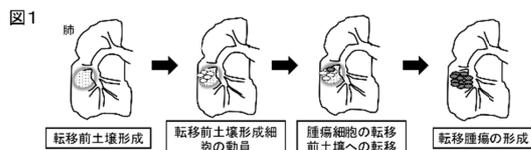
研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of tumor endothelial cells (TECs) in tumor metastasis. We focused on Gene X which is upregulated in TECs and is known to be involved in cell migration. We found that Gene X is involved in TEC migration and tube formation. In addition, TEC-derived molecule X was important for tumor cell migration. We examined the expression of molecular X in human clinical samples. Molecular X was expressed in tumor blood vessels of renal cancer, colon cancer and hepatocellular carcinoma. These data suggest that our finding in mouse tumor model may apply to human clinical cases.

研究分野：血管生物学

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 転移

### 1. 研究開始当初の背景

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、がんの転移は患者の予後を不良にする最大の要因である。がんの遠隔転移にはがん細胞の血管内侵入が必須であり、さらに転移巣の形成には血液中を循環するがん細胞が転移先臓器に漂着して増殖することが必要である。Kaplanらはがん細胞の転移に先立って、がんから分泌された液性因子が転移先臓器のファイブロネクチン (FN) 産生を亢進させ、FN 結合タンパクである VLA-4 ( $\alpha 4 \beta 1$  インテグリン) を発現する VEGFR-1 (Vascular endothelial growth factor receptor-1) 陽性細胞の集積を促して転移前土壌を形成し、そこにがん細胞が転移してくることを見出した (2005 Nature, 図1)。原発巣のみならず転移微小環境も標的とした治療が望まれている。



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である。研究代表者が所属する研究グループではこれまで、腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞 (TEC) の分離と培養に成功し、それらが正常血管内皮細胞 (NEC) と比較して遺伝子発現が異なること、growth factor や薬剤に対する感受性が異なることなど、様々な異常性を見出してきた (Hida K et al, *Cancer Res* 2004, 2005, 2006, *Cancer sci* 2008, 2009, *Am J Pathol* 2009, 2012, *Biochem Biophys Res Commun* 2010)。さらに、単に腫瘍血管内皮といっても転移能などのがんの性質の違いにより、血管内皮の性質も遊走能や増殖能、サイトカインの発現量などさまざまな違いがあることを最近見出した (Ohga N, Maishi N, Hida K et al, *Am J Pathol*, 2012)。

### 2. 研究の目的

これまで得てきた腫瘍血管内皮の特性に関する知見をふまえて、腫瘍血管内皮細胞の転移前土壌形成への関与の有無とそのメカニズムの解明を行い、腫瘍血管内皮由来因子阻害による転移制御の戦略につなぐこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管内皮細胞の分離培養:

ヌードマウスのヒト皮下移植腫瘍 (高転移性、低転移性腫瘍) から 2 種類の腫瘍血管内皮 (高転移性腫瘍由来血管内皮: HM-TEC, 低転移性腫瘍由来血管内皮: LM-TEC) を、コントロールとして正常マウスから正常皮膚由来血管内皮 (NEC) を分離培養する。分離には、CD31 抗体および CD45 抗体を用いて、

磁気細胞分離装置 MACS とセルソーター FACS Aria により、CD31+CD45 - の血管内皮分画を採取する。分離した血管内皮の特性解析を PCR 法とフローサイトメーターを用いて行い、分離後の血管内皮細胞が血管内皮マーカーを発現し、他細胞の混入がないことを確認する。

(2) HM-TEC において特異的に発現が亢進している遺伝子のノックダウン後の in vitro 機能解析:

すでいくつかピックアップしている HM-TEC において LM-TEC や NEC に比べて特異的に発現が亢進している遺伝子について、siRNA もしくは阻害剤を用いて発現・機能を抑制し、in vitro において血管内皮の機能解析 (増殖能、運動能、管腔形成能) およびがん細胞との相互作用解析 (がん細胞の血管内皮細胞に対する遊走能) を行い、がん転移に関与しうる HM-TEC 特異的マーカーを見つけ出す。

(3) HM-TEC 特異的マーカー抑制による in vivo 阻害効果:

in vitro でピックアップした HM-TEC 特異的マーカーの発現を siRNA 等を用いてノックダウンさせ、転移抑制効果の有無を検討する。

(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 HM-TEC 特異的マーカーの発現と患者のがん転移、予後との関連について病理学的な検索、トランスレーショナルリサーチを行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 血管内皮細胞の分離培養:

2 種類の腫瘍血管内皮細胞と正常皮膚由来血管内皮細胞を CD31+CD45 - 分画として分離した。培養後に PCR 法ならびにフローサイトメーターにより CD31, CD144, VEGFR2 などの血管内皮マーカー陽性でかつ、CD11b, CD45 などの血球マーカー陰性であることを確認した。分離した細胞が純度の高い血管内皮細胞であることが確認できた。

(2) HM-TEC において特異的に発現が亢進している遺伝子のノックダウン後の in vitro 機能解析:

HM-TEC において LM-TEC や NEC に比べて特異的に発現が亢進している遺伝子について、すでに DNA microarray により選出された遺伝子の中から HM-TEC において有意に発現が高く、かつ分泌タンパクである Gene X に着目した。siRNA を用いて発現を抑制し、in vitro において血管内皮の増殖能、運動能、管腔形成能をそれぞれ MTS assay, Boyden chamber migration assay, Matrigel tube formation assay により評価したところ、Gene

Xは血管内皮細胞の運動能，管腔形成能に関与することがわかった．さらに，がん細胞との相互作用解析を Transwell migration assay により行ったところ，がん細胞の遊走に関わることが明らかになった．

(3) HM-TEC 特異的マーカー抑制による in vivo 阻害効果：

in vitro でピックアップした HM-TEC 特異的マーカーの発現を siRNA を内包したリポソームを用いて DDS によりノックダウンを試みた．摘出した腫瘍組織から RNA を抽出し，逆転写反応により cDNA を合成後，目的遺伝子がノックダウンできているかどうか Real-time PCR により検討した．コントロール群に比べ 30% 程度のノックダウン効果が得られた．今後，抗腫瘍効果，転移抑制効果，血管新生阻害効果の検討を進める予定である．

(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 HM-TEC 特異的マーカーの発現を凍結切片を用いて行った．入手可能な腎がん，大腸がん，肝がんを用いて腫瘍血管における発現を解析したところ，腫瘍血管で分子 X の発現が一部認められた．今後，臨床病理学的因子や予後との関連についてさらなる解析を進める予定である．

#### 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5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

〔学会発表〕(計17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. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 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 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学学術交流会館 (北海道・札幌市)
  6. 間石奈湖: 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 24 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2015.7.23 シティプラザ大阪 (大阪府・大阪市)
  7. 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)
  8. 間石奈湖: Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors, 第1回日本血管生物医学会若手研究会, 2015.2.7 東京大学 (東京都・文京区)
  9. 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)
  10. Maishi N., Hida K.: The 17<sup>th</sup> 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)
  11. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 山本和幸, 川本泰輔, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移促進, 第 1 回六甲医学研究会, 2014.11.7 六甲山ホテル (兵庫県・神戸市)
  12. 間石奈湖, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞の相互作用, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014.9.26 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
  13. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 山本和幸, 川本泰輔, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移促進, 第110回北海道癌談話会例会, 2014.9.13 札幌医科大学(北海道・札幌市)
  14. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 山本和幸, 川本泰輔, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進, 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2014.6.19-20 北海道大学 (北海道・札幌市)
  15. Maishi N., Hida K.: 17<sup>th</sup> 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)
  16. 間石奈湖, 大場雄介, 大賀則孝, 秋山廣輔, 山本和幸, 浜田淳一, 川本泰輔, Alam Mohammad Towfik, 大村 瞳, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞のがん転移促進, 第103回日本病理学会総会, 2014.4.24 広島国際会議場(広島県・広島市)
  17. 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) Miyakomesse (Kyoto, Japan)
- 〔図書〕(計1件)  
 樋田京子, 大賀則孝, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田泰浩: 腫瘍血管内皮細胞の多様性, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患～慢性炎症とがん 5(1) 北隆館, 158-164, 2016 (分担執筆)
- 〔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・遺伝子病制御研究所・助教  
 研究者番号: 0 0 6 3 2 4 2 3