慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	血液-組織関門を形成する細胞群のヒト細胞株の樹立と低用量抗がん薬の作用機序解明
Sub Title	Establishment of human cell lines for blood-tissue barrier and application to elucidate mechanism of low-dose anti-cancer drugs
Author	中島, 恵美(Nakashima, Emi) 登美, 斉俊(Tomi, Masatoshi) 西村, 友宏(Nishimura, Tomohiro) 巨勢, 典子(Kose, Noriko) 崔, 吉道(Sai, Yoshimichi)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	血液—組織関門の形成には組織特異的な関門細胞と血管内皮細胞(EPC)の相互作用がある。その解析のために、組織特異的関門形成細胞株を用いた評価系が望まれる。骨髄由来血管内皮前駆細胞株、TR-BME、を用いた研究で、タキサン系抗癌剤は殺細胞効果を示す濃度よりも低濃度で、EPCの遊走能阻害を主因とした血管発生を阻害し、腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2009～2011 課題番号：21590175 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21590175seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年5月１５日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21590175
研究課題名（和文）　血液－組織関門を形成する細胞群のヒト細胞株の樹立と低用量抗がん薬の作用機序解明
研究課題名（英文）Establishment of human cell lines for blood-tissue barrier and application to elucidate mechanism of low-dose anti-cancer drugs
研究代表者
中島　恵美（NAKASHIMA EMI）
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：90115254

研究成果の概要（和文）：血液–組織関門の形成には組織特異的な関門細胞と血管内皮細胞(EPC)の相互作用がある。その解析のために、組織特異的関門形成細胞株を用いた評価系が望まれる。骨髄由来血管内皮前駆細胞株、TR-BME、を用いた研究で、タキサン系抗癌剤は殺細胞効果を示す濃度よりも低濃度で、EPC の遊走能阻害を主因とした血管発生を阻害し、腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： In formation process of a blood-tissue barrier, there is an interaction between specific tissue cells and bone marrow (BM)-derived endothelial progenitor cells (EPC). An assay system using the established cell lines from the specific tissue is desirable to obtain reproducible analysis. By using an established bone marrow-derived vascular endothelium precursor cell line, TR-BME, docetaxel and paclitaxel directly inhibited EPC-initiated vasculogenesis at low (non-cytotoxic) concentrations, causing suppression of tumor growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
キーワード：薬物動態・代謝学

１．研究開始当初の背景

血液–組織関門の形成には、組織特異的な関門細胞と血管内皮細胞(EPC)の相互作用があり、その過程は組織によって異なる。血液–組織関門の形成の解明は組織選択的治療薬の開発につながる。特に、腫瘍増殖には、癌細胞自身の増殖と、必要な栄養分を補給するための血管新生(neovascularization) が必要である。血管新生において、狭義の血管新生(angiogenesis) に加え、血管発生(vasculogenesis) が注目を集めるようになっていた。成体の vasculogenesis は、主に骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) の動員による新生血管形成であり、angiogenesis は既存血管の血管内皮細胞により生じる新生血管形成である。化学療法に用いられている抗

癌剤には殺細胞効果以外に、血管新生阻害効果も報告されている。また、血管新生阻害効果を期待した新たな戦略として metronomic chemotherapy が注目されている。これは、抗癌剤の規則的な低用量投与による腫瘍血管新生阻害効果を期待する治療方法であり、マウスを用いた前臨床モデルにおいてはドセタキセルの腫瘍縮小効果や転移消失などの治療効果が明らかとなっている。これらの血管新生阻害療法は、癌細胞への栄養供給の役目を担っている新生血管を阻害することで癌の増殖を阻止する。そのため、正常細胞への影響が少なく、副作用が軽減され、QOL の改善が期待できる。そして、原発巣だけでなく転移阻止効果もあるため、患者の延命期間延長も期待できる。更に、血管内皮細胞だけでなく、腫瘍などの虚血部位に対する EPC の集積、腫瘍血管新生への EPC の関与が明らかとなり、vasculogenesis が治療ターゲットとなる事が示されている。しかしながら、血管新生阻害療法では、angiogenesis をターゲットとしたものが多く、vasculogenesis 阻害効果については報告がない。

２．研究の目的

血液−組織関門生成過程の解析のために、細胞株を用いた研究は薬物療法の有用性を高めるために重要な手がかりとなる。Vasculogenesis 阻害効果の阻害効果の解明が遅れていることの一因として、vasculogenesis に対する評価系が無いことがあげられる。評価に必要な EPC の調製が困難であることから細胞株の樹立が必要である。また、metronomic chemotherapy における単剤・多剤併用などの研究報告が出されているが、最適な治療法や臨床での有効性は未だ確立されていない。まず、我々が樹立した EPC 株 TR-BME を用い、vasculogenesis に対する *in vitro* 評価系及び *in vivo* モデルを作成し、抗癌剤の効果を解明することを本研究の目的とした。

３．研究の方法

(1) Cell culture: ラット癌細胞株 Walker 256、 RMT-1、C6 glioma、ラット脳毛細血管内皮細胞株 TR-BBB、ラット骨髄由来 EPC 株 TR-BME を、37℃、5% CO2 下で培養した。
(2) MTT assay: 96 穴プレートに各細胞を 5 ×103/well 播種し、24 時間の前培養後、ドセタキセル (DTX) もしくはパクリタキセル (PTX) に 24 時間接触させ、生細胞数を測定した。
(3) Chemotaxis assay: コラーゲンコーティングした 24 穴用ケモタキセルを用いて、upper well に DTX もしくは PTX 含有培地にて調製した TR-BME 細胞懸濁液を、lower well に walker 256 培養後の上清 RPMI 1640 を用いた。2 時間処理後、ギムザ染色法により染色細胞をカウントした。
(4) Tube formation assay: マトリゲルコーティングした 24 穴プレートに TR-BME 細胞懸濁液を 4 x 104 cells/well 加え、DTX もしくは PTX 含有培地にて 37℃、5% CO2 下で培養した。18 時間後、画像解析ソフト ImageJ により管腔の全長を測定した。
(5) Tumor volume measurement: Walker256 を 5 週齢雌ラットに移植して担癌ラットを作成し、3 日後 DTX 及び PTX を腹腔内単回投与し、同時に PKH26 標識した TR-BME を尾静脈内投与した。7 日後、腫瘍と血液を採取した。腫瘍体積は[長径×短径×短径×1/2 式]により求めた。
(6) EPC の腫瘍内集積評価: PKH26 標識化 TR-BME を移植した担癌ラットの腫瘍をホモジナイズし、FACS にて解析した (Ex. 551 nm、Em. 567 nm)。
(7) Micro vessel density (MVD): 腫瘍切片作成後、CD31 染色法により MVD を測定した。
(8) サイトカインへの影響: MCP-1、SDF-1、VEGF の腫瘍内及び血中濃度を MCP-1 ELISA kit、Rat VEGF DuoSet ELISA Development System、Human SDF-1α ELISA kit を用いて測定した。

４．研究成果

(1) 抗癌剤の殺細胞効果

DTX 及び PTX は、乳癌の化学療法で単剤及び併用により使用されている抗癌剤であり、近年では再発・転移乳癌の第一選択薬として推奨されている。また、angiogenesis に対する阻害効果が示された抗癌剤でもある。他の抗癌剤と併用する事も多く、臨床の場における重要性が増している薬剤であるため、DTX 及び PTX を選択した。
DTX 及び PTX による殺細胞効果を MTT assay により検討したところ、IC50 は TR-BME> Walker256>TR-BBB≧C6-glioma>RMT-1 の順に小さな値を示した。このことから DTX 及び PTX の EPC への殺細胞効果は小さいことが示された。報告されている angiogenesis 阻害濃度は殺細胞効果を示す濃度よりも低濃度である。すなわち、殺細胞効果と血管新生阻害効果の効果発現濃度には差異があり、殺細胞効果を示す濃度よりも低濃度で vasculogenesis を阻害する可能性が考えられた。

(2) TR-BME の管腔形成能に対する影響

TR-BME を用いて vasculogenesis 阻害効果を検討した。Chemotaxis assay により細胞の目的部位への遊走能を、また、tube formation assay により目的部位へ到達した細胞の管腔形成能を評価した。その結果、DTX 及び PTX が TR-BME の vasculogenesis を阻害する IC50 は、殺細胞効果の IC50 (DTX: 0.20 μM、

PTX: 1.01 μM) よりも低値であった。また、chemotaxis における IC50 (DTX: 8.5 pM、PTX: 53.5 pM) が、tube formation での IC50 (DTX: 0.64 nM、PTX: 10.3 nM) よりも低値であったことから、DTX 及び PTX の示す vasculogenesis 阻害効果の主因は chemotaxis 阻害であることが示唆された。Vasculogenesis が生じるためには、EPC の骨髄内から血中への遊走が必要である。DTX 及び PTX は殺細胞効果を示す濃度よりも低濃度域で、vasculogenesis に必要な EPC の遊走を阻害し、遊走を阻害された EPC は目的部位での管腔形成を行うことが出来ないため、腫瘍血管形成を阻害すると考えられた。

(3) TR-BME の腫瘍集積への影響

In vivo において腫瘍増殖への TR-BME の寄与及び抗癌剤の影響を検討した。まず、TR-BME による vasculogenesis *in vivo* モデルを作成した。このモデルを用いて、抗癌剤の vasculogenesis 阻害効果は、腫瘍体積、FACS、MVD により評価した。まず腫瘍体積については、2 mg/kg DTX 及び 6 mg/kg PTX 投与群は非投与群と同程度の腫瘍成長が確認されたが、4, 8 mg/kg DTX 及び 12, 24 mg/kg PTX の高用量投与群では腫瘍増殖抑制効果が確認された。従って、以降の TR-BME を用いた vasculogenesis 阻害実験は 2 mg/kg DTX、6 mg/kg PTX を用いた。FACS 解析により腫瘍内への TR-BME の集積が確認でき、MVD 評価から血管密度が上昇していることが明らかとなった。以上により、TR-BME による腫瘍への vasculogenesis 亢進が示唆された。一方で、TR-BME と抗癌剤を投与した群に腫瘍増殖抑制効果が確認された。FACS 解析により腫瘍内へ TR-BME が集積していないこと、MVD 評価により顕著に血管密度が低いことから、*in vivo* においても DTX 及び PTX は EPC の遊走能を阻害することで vasculogenesis 阻害効果を示すことが示唆された。その作用機序として、サイトカインを介した遊走や、TR-BME 細胞自身の持つ遊走能を直接阻害している可能性が考えられた。そこで、血管新生に関する VEGF、遊走に関与する MCP-1 及び SDF-1 の血中及び腫瘍内濃度について検討したところ、control 群との有意差が認められなかった。このことから、抗癌剤のサイトカインへの影響は小さく、細胞に対する直接的な阻害効果であることが示唆された。

タキサン系抗癌剤は殺細胞効果を示す濃度よりも低濃度で、EPC の遊走能阻害を主因とした vasculogenesis を阻害し、単剤で腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。これは metronomic chemotherapy における低用量投与の有益性を支持する重要な結果であり、新規治療方法の開発や臨床試験に貢献できると考えられる。他の抗癌剤や血管新生阻害薬について同モデルを用いた検討を行うことで、新規用量設定への応用が可能になると考えられた。

(4)血液-組織関門を形成する細胞群

これまでの申請者らの研究で、骨髄由来血管内皮前駆細胞、TR-BME、が内皮のみならず血管を構成する壁細胞にも分化することが明らかとなった。さらに血管内皮前駆細胞は bFGF 刺激を受け、増殖を継続しながら新生血管腔を形成し、bFGF 刺激が消失することで SMA を発現する壁細胞へと分化する過程が示唆された。

また、血管新生は血液-組織関門である胎盤においても重要であり、胎児由来の胎盤に対して新生母体血管が侵入することで効率的な物質交換の場としての胎盤関門能を形成する。血液-胎盤関門の本体は合胞体栄養芽細胞である。我々が樹立した合胞体栄養芽細胞株、TR-TBT、を抗がん剤ミトキサントロンで処理したところ、排出輸送担体 ABCG2 が誘導された。これを糸口として、血液-胎盤関門の構築と変動要因を検討したところ、転写因子 ER が特異的に誘導されていることが分かった。また、ヒト白血病細胞では ER 発現が誘導されなかった。本知見は胎盤において、毒性薬物を胎児から母体へ排出する ABCG2 が組織特異的に発現誘導されることを示すものである。血液-組織関門における輸送担体を介した機能性関門の制御は、抗がん剤治療に重要な意味を持つ。以上により、新たな血管新生・発生および組織-関門研究の基盤をつくることができた。

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. Tomi M, Nishimura T, Nakashima E. Mother-to-fetus transfer of antiviral drugs and the involvement of transporters at the placental barrier. J Pharm Sci, 査読有,100, 3708-3718 (2011). DOI: 10.1002/jps.22642

②. Lee NY, Sai Y, Nakashima E, Ohtsuki S, Kang YS. 6-Mercaptopurine transport by equilibrative nucleoside transporters in conditionally immortalized rat syncytiotrophoblast cell lines TR-TBTs. J Pharm Sci , 査読有 ,100, 3773-3782 (2011) DOI: 10.1002/jps.22631

③. Nishimura T, Tanaka J, Tomi M, Seki Y, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Enhancement of zidovudine transfer to molt-4 cells, a human t-cell model, by dehydroepiandrosterone sulfate. J

Pharm Sci , 査読有,100, 3959-3967 (2011). DOI: 10.1002/jps.22624

④. Higuchi K, Iizasa H, Sai Y, Horieya S, Lee K-E, Wada M, Deguchi M, Nishimura T, Wakayama T, Tamura A, Tsukita S, Kose N, Kang Y-S, Nakashima E. Differential expression of ezrin and CLP36 in the two layers of syncytiotrophoblast in rats. Biol Pharm Bull, 査読有 ,33,1400-1406(2010) DOI: 10.1248/bpb.33.1400

⑤. Sai Y, Nishimura T, Ochi K, Tanaka N, Takagi A, Tomi M, Kose N, Kobayashi Y, Miyakoshi N, Kitagaki S, Mukai C, Nakashima E. Proton-coupled erythromycin antiport at rat blood-placenta barrier. Drug Metab Dispos., 査読有 , 38,1576-1581(2010) DOI:10.1124/dmd.110.033266.

⑥. Nishimura T, Sai Y, Fujii J, Muta M, Iizasa H, Tomi M, Deureh M, Kose N, Nakashima E. Roles of TauT and system A in cytoprotection of rat syncytiotrophoblast cell line exposed to hypertonic stress. Placenta, 査読有 , 31, 1003-1009(2010) http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2010.08.003

⑦. Muta M, Yanagawa T, Sai Y, Saji S, Suzuki E, Aruga T, Kuroi K, Matsumoto G, Toi M, Nakashima E. Effect of low-dose paclitaxel and docetaxel on endothelial progenitor cells.査読有, Oncology,77, 182-191 (2009) DOI: 10.1159/000236016

〔学会発表〕(計6件)

①. Asada T, Takanohashi T, Nishimura T, Tomi M, Nakashima E. In vivo techniques for the evaluation of passages from Matamal and Fetal sides across the placental bar. (Abstract p140, Poster) Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011 (2011.12.8-12, Kuala Lumpur Malaysia)

②. 西村友宏、田中 純、登美斉俊、巨勢典子、中島恵美. CD4陽性Tリンパ球モデル Molt-4 細胞への抗ウイルス薬ジドブジン取り込み機構と標的化. (講演要旨集 p140, 口演) 日本薬剤学会第26年会(2011.5.29-31, 東京)

③. 小田憲司、西村友宏、巨勢典子、登美斉俊、中島恵美. ラット胎盤関門細胞株における Mitoxantrone による Estrogen Receptor を介した ABCG2 発現誘導. (講演要旨集 p53, ポスター) 日本薬剤学会第26年会 (2011.5.29-31, 東京)

④. 樋口 慧、西村友宏、登美斉俊、若山友彦、田村 淳、月田早智子、曽我朋義、崔 吉道、中島 恵美. Ezrin欠損マウス胎盤・胎児で減少する hypotaurine の胎盤におけるトランスポーター同定. (講演要旨集 p116, 口演) 日本薬剤学会第25年会 (2010.5.12-14, 徳島)

⑤. 樋口 慧、西村友宏、登美斉俊、巨勢典子、崔 吉道、中島恵美. 胎盤 hypotaurine 取り込みにおける GABA トランスポーター(Slc6a13)の関与. (抄録集 p68, ポスター)第5回トランスポーター研究会年会 (2010.7.10-11, 東京)

⑥. 崔 吉道、西村友宏、越智香織、田中紀章、高木彰紀、登美斉俊、巨勢典子、中島恵美. ラット胎盤関門におけるエリスロマイシンのプロトン共役排出輸送. (抄録集 p68, ポスター) 第5回トランスポーター研究会年会 (2010.7.10-11, 東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者
中島 恵美 (NAKASHIMA EMI)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号:90115254

(2)研究分担者
登美 斉俊 (TOMI MASATOSHI)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号:3034717

(3)研究分担者
西村 友宏 (NISHIMURA TOMOHIRO)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号:40453518

(4)研究分担者
巨勢 典子 (KOSE NORIKO)
慶應義塾大学・薬学部・研究員
研究者番号:60348612

(5)連携研究者
崔 吉道 (SAI YOSHIMICHI)
金沢大学・大学病院・准教授
研究者番号:40262589