

様式 3

平成 29 年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

平成 30 年 2 月 15 日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関 : 北海道大学

部局・職名 : 遺伝子病制御研究所・

特任准教授

氏 名 : 樋田 京子

1. 研究課題

がん細胞と腫瘍血管(TEC)の時空間相互作用解析と TEC 由来がん転移促進因子を標的とした薬剤治療効果アッセイ系の確立

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 樋田 京子	北海道大学 遺伝子病制御研究所	特任准教授	研究計画の立案ならびに TEC マーカーのがん細胞への作用解析
研究分担者 間石 奈湖	北海道大学 遺伝子病制御研究所	助教	腫瘍血管内皮細胞とがん細胞への相互作用の解析ならびにエクソソームの血管内皮細胞における作用解析
飯村 忠浩	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	教授	TEC マーカー発現陽性血管とがん細胞との相互作用の時空間的解析ならびにエクソソームの内皮への取り込み解析

3. 研究成果

別紙のとおり

3. 研究成果

研究目的：

腫瘍血管は、がんへの栄養や酸素の供給など、がんの進展に重要な役割を果たしている。申請者らはこれまで、腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) の分離・培養に成功し、正常血管内皮細胞との違いを報告してきた (Cancer Res 2004, Adv. Drug. Deliv. Rev. 2016)。TEC に特異的に高く発現する TEC マーカーをいくつか見出しており、その一つである分泌タンパク Biglycan は血管内皮細胞の血管新生能に重要であるばかりではなく、がん細胞の TLR2, TLR4 に結合し NF- κ B, ERK1/2 の活性化を介して血管内浸潤を誘導して転移を促進させることを最近報告した (Maishi et al., Sci Rep 2016)。しかし、このような TEC 由来 Biglycan によるがん転移促進プロセスにおける、がん細胞と TEC マーカー発現腫瘍血管の相互調節時空間動態については未知な点が多い。そこで、本研究では PROS・バイオイメージング部門との共同研究により、*in vivo* 腫瘍組織を用いて TEC マーカーの時空間的な発現解析と転移するがん細胞との相互作用を明らかにする。さらに、Biglycan を標的とした化学物質スクリーニングを進め、治療効果アッセイ系としてのイメージング手法の確立を目指す。

研究成果：

①血管内皮による腫瘍由来エクソソーム取り込みの観察

研究代表者らは、腫瘍由来のエクソソームが血管内皮に取り込まれること、さらにはこの腫瘍由来エクソソームが血管内皮の機能を変え、腫瘍細胞の浸潤・転移に好環境を構築することを明らかにしている。したがって、腫瘍由来エクソソームを介した腫瘍-血管・相互作用の時空間動態を把握するため、超解像顕微鏡をはじめとしたマルチモーダルな蛍光イメージングによる観察系を構築することとした。

今年度は、*in vitro* 観察系において、血管内皮による腫瘍由来エクソソーム取り込みの観察系を構築した。具体的には、RFP (赤色蛍光タンパク質) を恒常的に発現する腫瘍細胞からは、RFP 陽性エクソソームが産生され、可視化に有効であることを明らかにした。また、ヒト特異的抗 CD63 抗体を用いて、腫瘍由来エクソソームをマウス血管内皮細胞で検出可能であることを明らかにした。

②Biglycan 阻害物質スクリーニング系の構築

研究代表者らは、TEC 特異的に発現する Biglycan が、がん治療のための新たな分子標的となることを明らかにしてきた。したがって、本共同研究では、PROS の誇るタンパク質工学技術を応用して、Biglycan を標的とした化学物質スクリーニング系の構築を目指すことにした。具体的には、Biglycan とその受容体である TLR の結合を Alpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) を用いて検出するシステムを構築する。予備データとして、Biglycan のコアタンパク質が主要な機能ドメイン、すなわち受容体結合に重要であることを突き止めた。

成果発表：

(招待講演)

1. 樋田京子：第25回血管生物医学会学術集会 AAVBM2017 シンポジウム “Tumor Angiogenesis and Lymphangiogenesis, “Chemotherapy-induced drug resistance in tumor endothelial cells”, 2017.12.10 (大阪)
2. 樋田京子：第40回日本分子生物学会年会ワークショップ「生老病死における血管・リンパ管の生命科学的意義」, “腫瘍血管内皮細胞の形質変化とがんの悪性化”, 2017.12.7 (神戸)
3. 間石奈湖：第40回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞外小胞顆粒は我々に何を語るか?～細胞間コミュニケーションが織りなす生命現象の解明へ～」, “高転移性腫瘍miRによる血管内皮における薬剤耐性誘導”, 2017.12.7 (神戸)
4. 樋田京子：第62回日本口腔外科学会総会・学術大会特別プログラム「日台姉妹締結10周年記念シンポジウム Translational Research」, “腫瘍血管に関する基礎研究から新たながん治療戦略の構築を目指して”, 2017.10.21 (京都)
5. 間石奈湖：第116回北海道癌談話会奨励賞受賞記念講演, “Tumor endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan”, 2017.10.21 (札幌)
6. 樋田京子：第76回日本癌学会学術総会International Sessions「がん転移におけるエクソソーム研究の最前線」, “高転移性腫瘍エクソソームによる血管内皮における薬剤耐性誘導”, 2017.9.28 (横浜)
7. 樋田京子：第26回日本がん転移学会学術集会・総会シンポジウム2「がん幹細胞に対する新たな知見」, “腫瘍血管内皮細胞のがん幹細胞への関与”, 2017.7.28 (大阪)
8. 樋田京子：第20回癌と骨病変研究会 ミニシンポジウム「癌と骨病変」 “腫瘍血管の異常とがんの悪性化”, 2017.7.29 (福岡)
9. 樋田京子：愛媛大学プロテオサイエンスセンター PROSセミナー&大学院特別講義 “腫瘍血管内皮細胞の特性とがんの悪性化”, 2017.6.12 (愛媛)

(学会発表)

1. Maishi N., Hida K.：Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via biglycan, Protein Island Matsuyama 2017 International Symposium (PIM 2017), 2017.9.13, Matsuyama, Japan
2. 間石奈湖, 菊地 央, 森本浩史, 土屋邦彦, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子：第76回日本癌学会学術総会, 2017.9.29 (横浜)
3. 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 森本真弘, 秋山廣輔, 吉岡祐亮, Alam Mohammad Towfik, 南 敬, 落谷孝広, 樋田泰浩, 樋田京子：高転移性腫瘍miRによる血管内皮における薬剤耐性誘導, 第26回日本がん転移学会学術集会, 2017.7.28 (大阪)

(論文)* corresponding author

1. *Hida K.[§], Maishi N.[§], Akiyama K., Ohmura-Kakutani H., Torii C., Ohga N., Osawa T., Kikuchi H., Morimoto H., Morimoto M., Shindoh M., Shinohara N. and Hida Y.: Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show drug resistance, *Cancer Sci*, 108(11), 2195-2203, 2017
[§]equally contributed
2. *Hida K.[§], Kawamoto T.[§], Maishi N., Morimoto M., Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Shinohara N., Hida Y.: miR-145 Promoted Anoikis Resistance in Tumor Endothelial Cells, *J Biochem*, 162(2), 81-84, 2017
3. Hojo T.[§], Maishi N.[§], Towfik AM, Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Hida Y., Minowa K., Fujisawa T., *Hida K.: ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells, *Oncotarget*, 8(28):45484-45495, 2017 [§]equally contributed
4. Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma, *Anticancer Res*, 37(3), 1219-1225, 2017
5. *Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K., Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M.: Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1, *J Oral Biosci*, 59 (2017), 50-54, 2017
6. Habiba U., *Hida K., Kitamura T., Yanagawa Matsuda A., Higashino F., Ito M Y., Ohiro Y., Totsuka Y., Shindoh M.: ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia, *Oncol Lett*, 13(1), 321-328, 2017

(総説・著書)

1. 樋田京子, 間石奈湖, 森本真弘: 落谷孝広監修, パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線, “がんエクソソーム”, エヌ・ティー・エス, 127-136, 2017 (分担執筆)
2. *Hida K., Maishi N.: Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression, *Oral Sci Int*, 15(1), 1-6, 2018
3. Maishi N., *Hida K.: Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis, *Cancer Sci*, 108(10), 1921-1926, 2017
4. *Hida K., Kikuchi H., Maishi N., Hida Y.: ATP-binding cassette transporters in tumor endothelial cells and resistance to metronomic chemotherapy, *Cancer Lett*, 400, 305-310, 2017

(研究費獲得)

1. 文科省科研基盤研究(C) 2017-2019 間石奈湖 (分担者)「腫瘍血管トランスポーター阻害による尿路上皮癌薬剤耐性の克服」
2. 文科省科研基盤研究(C) 2017-2019 間石奈湖 (分担者)「腫瘍血管内皮サイトカイ

ンレセプターの口腔癌の予後予測診断法への応用」

3. 文科省科研若手研究 (B) 2016-2017 間石奈湖 (代表) 300 万円「循環腫瘍血管内皮細胞による前転移ニッチ形成」
4. 日本医療研究開発機構 (AMED) (革新的がん医療実用化研究事業)2015-2017 間石奈湖 (代表) 500 万円「腫瘍血管ダイナミクスの解明と個別化医療を目指した革新的医療の開発」

(特許出願)

樋田京子, 樋田泰浩, 間石奈湖, 菊地 央, 大場雄介: 不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞の樹立方法及び不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞, 特願 2017-052042, 2017. 3. 17

(取材・報道)

1. 樋田京子: 2017 年 10 月 11 日 テルモ生命科学財団 生命科学 DOKIDOKI 研究室ウェブサイト「中高生と“いのちの不思議”を考えるー生命科学 DOKIDOKI 研究室」に「第 49 回 この人に聞く“生命に関わる仕事っておもしろいですか?”」の記事掲載
2. 樋田京子: 2017 年 7 月 21 日 北海道医療新聞に「第 22 回 (2017 年度) 日本女性科学者の会 奨励賞」受賞記事
3. 樋田京子: 2017 年 7 月 12 日 朝日新聞に「第 22 回 (2017 年度) 日本女性科学者の会 奨励賞」受賞記事

今後の課題:

①血管内皮による腫瘍由来エクソソーム取り込みの観察

今年度に構築された血管内皮による腫瘍由来エクソソーム取り込みの観察系は、いずれも *in vitro*での解析系であり、今後は担がんヌードマウスを用いた *in vivo*での観察系を構築する。

②Biglycan 阻害物質スクリーニング系の構築

Biglycan のコアタンパク質が主要な機能ドメインであることを突き止めているが、糖鎖の重要性も排除しないため、コムギ無細胞タンパク質合成技術のみならず、真核細胞タンパク発現系でのリコンビナント Biglycan 合成を視野に入れた予備実験を始める。また、受容体についても、無細胞タンパク質合成のみならず細胞発現系でのシステム構築を考える。