

平成30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31年2月28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：大学院歯学研究院・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・大学院歯学研究院	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・大学院歯学研究院	特任助教	腫瘍血管内皮細胞とがん細胞への相互作用の解析
森本 真弘	北海道大学・大学院歯学研究院	博士課程4年	TECマーカー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マーカー阻害物質スクリーニング系の構築
李 智媛	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター	助教	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
竹田 浩之	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター	准教授	TECマーカーBiglycanの阻害物質探索を目指したAlpha(Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay)によるシステムの構築

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) に特異的に高く発現する TEC マーカーをいくつか見出し (Cancer Res 2004, Adv. Drug. Deliv. Rev. 2016)、その一つである分泌タンパク Biglycan が、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、がんの転移を促進させることを明らかにした (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 マーカー陽性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、貴センターバイオイメーjing部門飯村教授との共同で、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 を標的としたがん転移阻害薬を同定するための化学物質スクリーニング系を確立するため、貴センター竹田浩之准教授によるご協力のもと、タンパク質とタンパク質間相互作用解析技術 Alpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) を用いて、Biglycan とその受容体である TLR の結合および結合阻害を検出するシステムを構築する。

研究成果：

① 腫瘍と血管内皮の相互作用についての解析

ヒト肺がん 100 症例を用いて TEC マーカーのひとつ Biglycan の腫瘍血管における発現とがんの悪性度との関連について組織学的に解析を進めた。肺がんの悪性度と腫瘍血管の発現は正に相関すること、さらにがん患者と健常者の血漿の Biglycan レベルを比較するとがん患者に有意に高いレベルで biglycan が検出されることが見出された。さらに、Biglycan ノックアウトマウスを用いた腫瘍微小環境の変化を組織学的に検索したところ、Biglycan が腫瘍血管の周囲の炎症性細胞浸潤や間質の線維化などを介してがんの悪性化、進展に関与していることを示唆する所見を得た。

② Biglycan 阻害物質スクリーニング系の構築

研究代表者らは、TEC 特異的に発現する分子 TEC マーカーのひとつ、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。前年度までに、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見出した。今年度は、AlphaScreen による化合物スクリーニングシステムの基盤となるコンストラクト (BGN-AGIA-biotin-His) をマウス、ヒトともに作成、また、TLR2/4 -GST-FLAG の作成も

終えることができ、来年度の Biglycan -TLR の結合の検出による化合物の探索への道筋をつけることができた。

成果発表：
(招待講演)

1. 樋田京子：腎癌の血管と免疫を見つめる会，“腫瘍血管新生の多様性と腎癌の悪性化”，2019.2.1（札幌）
2. 樋田京子：AIR in Sapporo—Angiogenesis & Immunology Research—，“血管新生阻害と微小環境の変化”，2018.11.3（札幌）
3. 樋田京子：これからのキャリアを語る医師と学生の会 2018 講演会「『がんと遺伝子』～私たちの研究が、患者さんの未来を変える」，“腫瘍血管の特性を活かした新しいがん治療法の開発を目指して”，2018.10.20（札幌）
4. 樋田京子：第 77 回日本癌学会学術総会シンポジウム，“腫瘍血管内皮細胞によるがんの転移促進”，2018.9.27（大阪）
5. 樋田京子：第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会シンポジウム「消化器癌に対する血管新生阻害薬の意義」，“血管新生阻害療法の展開”，2018.7.20（神戸）
6. 樋田京子：第 107 回日本病理学会総会 特別企画シンポジウム「腫瘍微小環境の病理学」，“治療抵抗性における腫瘍血管の役割”，2018.6.23（札幌）

(学会発表)

1. Morimoto M., Maishi N., Matsuda A., Kitamura T., Higashino F., Yokoyama A., Kitagawa Y., Hida K., : Promotion of metastasis via alteration of vascular endothelium by tumor exosome miRNA, The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2018.11.17, Sapporo, Japan
2. Hida K., Kikuchi H., Maishi N., Abe T., Maruyama S., Harabayashi T., Ameda K., Matsuno Y., Hida Y., Shinohara N. : MDR1/ABCB1 upregulation in tumor blood vessels by chemotherapy-induced IL-8, 20th International Vascular Biology Meeting, 2018.6.3-7, Helsinki, Finland
3. 森本真弘, 間石奈湖, 樋田泰浩, 北川善政, 樋田京子：高転移性腫瘍エクソソームによる血管内皮の形質変化によってがんの転移が促進される, 第 26 回日本血管生物医学会学術集会, 2018.12.7（東京）
4. 森本真弘, 間石奈湖, 樋田泰浩, 北川善政, 樋田京子：高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化と転移促進メカニズムの解明, 第 51 回北海道病理談話会, 2018.10.13（札幌）
5. 森本真弘, 間石奈湖, 樋田泰浩, 樋田京子：高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化による転移促進メカニズムの解明, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018.9.28（大阪）
6. 森本真弘, 間石奈湖, 樋田京子：高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化と転移促進メカニズムの解明, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018.9.5（福岡）
7. 森本真弘, 間石奈湖, 北川善政, 樋田京子：高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化と転移促進メカニズムの解明, 第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2018.7.20（横浜）
8. Maishi N., Kikuchi H., Abe T., Maruyama S., Harabayashi T., Ameda K., Matsuno Y., Hida Y., Shinohara N., Hida K. : MDR1/ABCB1 upregulation in tumor blood vessels by chemotherapy-induced IL-8, 第 107 回日本病理学会総会, 2018.6.22（札幌）
9. 森本真弘, 間石奈湖, 菊地 央, 北川善政, 樋田京子：高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化と転移促進, 第 107 回日本病理学会総会, 2018.6.22（札幌）
10. 森本真弘, 間石奈湖, 北川善政, 樋田京子：高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化と転移促進メカニズムの解明, 第 72 回日本口腔科学会学術集会, 2018.5.13（名古屋）

(論文・総説・著書)* corresponding author

1. 樋田京子：がん創薬フロンティア, Part V, 第 19 章 “血管新生阻害剤”, 化学同人編集部, 2018 (分担執筆)
2. 樋田京子：日本臨床腫瘍学会編集, 新臨床腫瘍学 (改訂第 5 版) —がん薬物療法専門医のために—, “血管新生”, 南江堂, 48-51, 2018 (分担執筆)
3. 樋田京子：腫瘍血管内皮細胞の特異性, *Journal of the Society of Japanese Women Scientists*, 18, 12-17, 2018
4. *Hida K., Maishi N., Dorcas A. Annan, Hida Y. : Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression, *Int J Mol Sci*, 19(5), 1272, 2018 (IF=3.878)
5. *Hida K., Maishi N. : Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression, *Oral Sci Int*, 15(1), 1-6, 2018

(研究費獲得)

1. 文科省科研基盤研究 (B) 2018-2020 樋田京子 (代表) 「口腔がんエクソソームによるがんの転移促進機構の解明と転移制御への応用」
2. 文科省新学術領域研究 2018-2019 樋田京子 (代表) 「細胞社会をつなぐ血管内皮細胞のダイバシティ獲得機構の解明」
3. 文科省科研基盤研究 (B) 2018-2020 樋田京子 (分担), 間石奈湖 (分担) 「正常血管に作用しない悪性腫瘍特異的血管新生阻害剤のハイスループットスクリーニング」
4. 文科省科研基盤研究 (C) 2018-2020 間石奈湖 (代表) 「腫瘍血管内皮による転移促進機構解明のための基盤的研究」
5. 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」
6. 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」
7. 中外製薬株式会社 研究活動支援 2018 年度, 樋田京子 (代表) 20 万円 「がん免疫における腫瘍血管内皮細胞の役割」
8. 日本医療研究開発機構 (AMED) 2018 革新的がん医療実用化研究事業—がんネットワークの臨床的意義の理解に基づく医療シーズの開発研究 樋田京子 (代表) 2,990 万円 「腫瘍血管・がん微小環境のネットワークの解明と新規血管新生阻害療法の開発」
9. 第 11 回資生堂女性研究者サイエンスグラント, 樋田京子 (代表) 100 万円 「腫瘍血管制御による新しい薬剤耐性克服戦略の構築」
10. 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) 2015-2018 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」
11. 公益財団法人 武田科学振興財団 2018 年度研究助成 (がん領域・基礎) 間石奈湖 (代表) 200 万円 「がんエクソソームの血管異常化を介した転移促進機構の解明とその制御」
12. 日本医療研究開発機構 (AMED) 2018 (革新的がん医療実用化研究事業) 間石奈湖 (代表) 410 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, PCT/JP2018?10735 2018/3/19

(取材・報道)

1. 2018 年 7 月 7 日 北海道新聞に「第 11 回資生堂女性研究者サイエンスグラント」受賞の記事掲載 樋田京子
2. 2018 年 3 月 20 日 北海道大学研究シーズ集 Vol.15 に記事掲載. 樋田京子 「腫瘍血管新生阻害剤スクリーニングシステム—腫瘍血管新生阻害剤開発のための cell based screening assay システム—」

(受賞)

1. 樋田京子：第 11 回資生堂女性研究者サイエンスグラント 2018. 5. 30
2. 森本真弘：第 66 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 GC Young Investigator Award 2018 2018.11.17
3. 森本真弘：第 60 回歯科基礎医学会学術大会 モリタ優秀発表賞「病理学」部門 2018.9.6
4. 森本真弘：第 10 回日本 RNAi 研究会・第 5 回日本細胞外小胞学会 優秀ポスター賞, 2018. 8. 31
5. 森本真弘：第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会 ベストポスター賞, 2018. 7. 19
6. 森本真弘：第 72 回日本口腔科学会学術集会学会賞・優秀ポスター賞「高転移性腫瘍由来エクソソーム miRNA による血管内皮の形質変化と転移促進メカニズムの解明」2018. 5. 13

今後の課題：

① Biglycan の腫瘍免疫細胞への作用についての解析

今年度に見出された TEC マーカー Biglycan が腫瘍細胞のみならず腫瘍免疫担当細胞にどのように関与しているのかについても解析を進める。

② Biglycan 阻害物質スクリーニング

AlphaScreen を用いた化合物スクリーニングを開始する。

③ Biglycan 中和抗体の作成にむけた基盤形成

現在、Biglycan に対する中和抗体は存在しない。Biglycan ノックアウトマウスの形質から Biglycan の阻害による治療効果は十分期待できる。化合物スクリーニングと平行し、native な糖鎖修飾されたヒト Biglycan タンパクを用いて PROS が誇るサメによる抗体作成の技術により Biglycan の中和抗体の作成を目指す。

(1) 用紙サイズはA4判とし、37字×30行(MSゴシック、11ポイント)で作成してください。

(2) 枚数は、図、表等を含めて5枚以内にしてください。

(3) 研究課題名、研究者所属・職・氏名、研究目的、研究内容、研究成果、成果発表、今後の課題の順で簡潔かつ具体的に書いてください。