

令和2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

令和3年3月1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

腫瘍血管内皮由来因子を標的とした抗体作成と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	助教	腫瘍血管内皮細胞とがん細胞への相互作用の解析
飯村 忠浩	北海道大学・大学院歯学研究院	教授	TEC マーカー阻害物質スクリーニング系の構築
樋田 泰浩	北海道大学 大学病院循環器外科 呼吸器外科	准教授	肺癌患者臨床病理，血液検体の採取
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，サメによる Biglycan 抗体の作成

### 3. 研究成果

目的：

血管新生阻害療法はがん治療において重要な戦略のひとつである。申請者らはこれまで副作用の少ない治療薬の開発を目指して、腫瘍血管内皮細胞に特異的に高く発現するマーカーをいくつか見出してきた。その一つである分泌タンパク Biglycan についてはがん細胞の転移を促進させ、新たな抗がん剤の標的としての可能性を報告した (Maishi et al., Sci Rep 2016)。また、最近われわれは Biglycan が癌の線維化促進や癌免疫の抑制作用を持つことを示唆する知見を得た。しかし、Biglycan の阻害剤は報告されているものが存在しない。そこで本研究では、Biglycan を標的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ことによる化合物スクリーニング系を構築する。さらに、Fukabody により Biglycan に対する抗体医薬の開発を目指す。

成果：

#### ① Biglycan の微小環境における役割の解析

ノックアウトマウスの解析により Biglycan が血管の炎症や血管新生を促進することに加え、癌の線維化促進や癌免疫の抑制作用を持つことも見出した (論文 revise 中)。また、現在血管内皮特異 Biglycan ノックアウトマウス (Bgn CK0) の解析を進め、腫瘍血管の Biglycan ノックダウンによる腫瘍増殖抑制される知見を得た。以上より、Biglycan 阻害剤は新規の血管新生阻害剤として、あるいはがん微小環境の正常化をもたらす治療薬として有望である。

#### 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。今年度は Biglycan の詳細な受容機構については、Biglycan がコアタンパク質依存的に CD14 に結合し、ついで TLR2/4 に受容されシグナル伝達経路を活性化することが報告されている (Roedig et al. 2019) という報告に基づき、Biglycan と可溶性 CD14 の結合を特異的に阻害する薬剤の HTS アッセイ系として AlphaScreen を用いて構築した。AlphaScreen を用いて、Biglycan と CD14 の結合を検出するアッセイ系を構築した。今後は代表者らが樹立した不死化腫瘍血管内皮細胞 (特願済) を用いて、東大の創薬機構の化合物ライブラリのスクリーニングを予定している。

#### ③ Fukabody により Biglycan に対する抗体医薬の開発

現在の市販の ELISA では本分子の認識エピトープは不明である。これまで我々は新たに biglycan の 4 箇所部位に対するポリクローナル抗体を作成し細胞培養上清や精製 biglycan 蛋白の検出には好成績を示す ELISA を作成することができた。しかし、臨床検体の biglycan の検出には成功しておらず、血液中では抗体結合部位がマスクされている可能性が示された。本年度、ヒトおよびマウス biglycan に対するサメ VNAR 抗

体ヒトおよびマウス Biglycan をサメ 8 頭に免疫し, 5 頭で抗体価の上昇が観察された。免疫サメから抗体遺伝子を抽出し, フェージライブラリを構築した。今後作製できた抗体とこれまでの作製した抗体の組み合わせによるサンドイッチ ELISA 構築する。

#### 成果発表:

(論文・総説・著書)\* corresponding author

1. 樋田京子, 間石奈湖: 血管内皮増殖因子, 「産科と婦人科 特集 分子標的薬を極める—基礎から臨床まで—」, 診断と治療社, 87(10), 1145-1149, 2020  
間石奈湖, Annan DA, 樋田京子: 「がん治療標的としての腫瘍血管内皮細胞の特異性」, 『炎症と免疫』, 先端医学社, 28(5), 35-40, 2020
2. 樋田京子: 腫瘍血管の多様性と臨床応用への展望, 医学のあゆみ “血管新生—基礎と臨床”, 270(1), 107-110, 2020
3. Annan DA, Kikuchi H, Maishi N, Hida Y and Hida K\*: Tumor Endothelial Cell—A Biological Tool for Translational Cancer Research, *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 3238, 2020 (IF=4.653) doi: 10.3390/ijms21093238
4. Hiradate R, Khalil IA, Matsuda A, Sasaki M, Hida K, Harashima H: A novel dual-targeted rosiglitazone-loaded nanoparticle for the prevention of diet-induced obesity via the browning of white adipose tissue, *J Controlled Release*, in press (IF=4.801)
5. Kikuchi H, Maishi N, Annan DA, Alam MT, Dawood RIH, Sato M, Morimoto M, Takeda R, Ishizuka K, Matsumoto R, Akino T, Tsuchiya K, Abe T, Osawa T, Miyajima N, Maruyama S, Harabayashi T, Azuma M, Yamashiro K, Ameda K, Kashiwagi A, Matsuno Y, Hida Y, Shinohara N and Hida K\*: Chemotherapy-induced IL-8 upregulates MDR1/ABCB1 in tumor blood vessels and results in unfavorable outcome, *Cancer Res*, 80(14), 2996-3008, 2020 (IF=9.883)
6. Yoshimatsu Y, Wakabayashi I, Kimuro, S, Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi, M, Maishi N, Inoue K, Hida K, Miyazono K, Watabe T: TNF- $\alpha$  enhances TGF- $\beta$ -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- $\beta$  signal augmentation, *Cancer Sci*, 111(7), 2385-2399. (IF=4.801)

#### (招待講演)

1. 樋田京子: 令和 2 年度 弘前大学第 1 回生体応答科学研究セミナー, “腫瘍血管内皮細胞の異常性とがんの悪性化”, 2020.11.25 (WEB 開催)
2. 樋田京子: Breast Cancer Investigator’s Meeting in Sapporo, “腫瘍血管と免疫小環境”, 2020.11.18 (札幌)
3. 間石奈湖, 菊地 央, 樋田 泰浩, 篠原信雄, 樋田京子: 抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管トランスポーター発現亢進とその機序, 依頼講演, 第 6 回北海道大学部局横断シンポジウム “若手研究者による生命と物質の融合を目指して!”, 2020.10.19 (WEB 開催)
4. 樋田京子: 第 24 回日本がん免疫学会総会シンポジウム 2 「腫瘍微小環境とその制御」, “腫瘍血管内皮細胞の特性とがん免疫”, 2020.10.9 (札幌)
5. Hida K: The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Symposium, Real world of tumor microenvironment, “The role of tumor endothelial cells in the immune environment”, 2020.10.2, Hiroshima, Japan
6. 樋田京子: 第 79 回日本癌学会学術総会特別シンポジウム 「がん研究における女性研究者 (WSCR) Women scientists in cancer research」, “治療標的としての腫瘍血管内皮細胞の異常性”, 2020.10.1 (広島)
7. Hida K: New Insights Into Drug-Resistance: Abnormality in Tumor Endothelial Cells, The 21th International Vascular Biology Meeting, 2020.9.11, Seoul, Korea
8. 樋田京子: 第 109 回日本病理学会総会シンポジウム 「口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—がん形質と微小環境」 “腫瘍血管内皮細胞の特性解析とがん治療への応用” 2020.4.18 (福岡)

#### (学会発表)

1. Maishi N, Sakurai Y, Hatakeyama H, Li C, Alam MT, Kikuchi H, Morimoto H, Morimoto M, Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Harashima H, Hida K: Novel Antiangiogenic Therapy Targeting Biglycan in Tumor Endothelial Cell Using Liposomal-siRNA Delivery System, E-poster, The 21st International Vascular Biology Meeting (IVBM 2020), 2020.9.9-12, Seoul, Korea

2. Annan DA, Maishi N, Soga T, Dawood RIH, Li C, Kikuchi H, Hojo T, Morimoto M, Kitamura T, Alam MT, Minowa K, Shinohara N, Nam JM, Hida Y, Hida K: Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis in the tumor microenvironment E-poster, The 21st International Vascular Biology Meeting (IVBM 2020), 2020.9.19-12 Seoul, Korea
3. Li C, Maishi N, Annan DA, Hida Y, Hida K: Biglycan deficiency normalizes tumor blood vessels and potentiates tumor immune responses, E-poster, The 21st International Vascular Biology Meeting (IVBM 2020), 2020.9.9-12, Seoul, Korea
4. Tsumita T, Annan DA, Maishi N, Hida Y, Hida K: The role of LOX-1 in tumor endothelial cells on tumor metastasis, E-poster, The 21st International Vascular Biology Meeting (IVBM 2020), 2020.9.9-12, Seoul, Korea
5. Kikuchi H, Nako Maishi, Dorcas A. Annan, Alam TM, Matsumoto R, Osawa T, Abe T, Hida Y, Harabayashi T, Ameda K, Kashiwagi A, Matsuno Y, Shinohara N, Hida K: Increased ABCB1 expression in tumor blood vessels of urothelial carcinoma after chemotherapy and chemoresistance, E-poster, The 21st International Vascular Biology Meeting (IVBM 2020), 2020.9.9-12, Seoul, Korea
6. 間石奈湖, 樋田京子: 腫瘍血管によるがん悪性化促進機構の解明とその制御, 第6回血管生物医学会若手研究会, 2020.11.21 (WEB開催)
7. 積田卓也, 間石奈湖, 樋田泰浩, 樋田京子: 酸化LDL受容体LOX-1の腫瘍血管における機能解析, 第6回血管生物医学会若手研究会, 2020.11.20 (WEB開催)
8. 積田卓也, 森本真弘, 間石奈湖, 吉岡祐亮, 樋田泰浩, 松田彩, 東野史裕, 落谷孝広, 樋田京子: がん細胞エクソソームmicroRNA-1246は血管内皮細胞においてインターフェロン応答を活性化する, 口頭, 第7回日本細胞外小胞学会学術集会, 2020.10.27 (WEB開催)
9. 積田卓也, 森本真弘, 間石奈湖, 吉岡祐亮, 樋田泰浩, 松田彩, 東野史裕, 落谷孝広, 樋田京子: がん細胞エクソソームmicroRNA-1246は血管内皮細胞においてインターフェロン応答を活性化する, ポスター, 第7回日本細胞外小胞学会学術集会, 2020.10.27 (WEB開催)
10. Li C, Maishi N, Annan DA, Hida Y, Hida K: Stroma Biglycan deficiency normalizes tumor blood vessels and potentiates tumor immune responses, Oral, The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2020.10.1-3, Hiroshima, Web Conference
11. Annan DA, Maishi N, Soga T, Hojo T, Hida Y, Hida K: Glutamine metabolism facilitates tumor endothelial cell proliferation via redox homeostasis, Oral, The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2020.10.1-3, Hiroshima, Web Conference
12. 佐藤峰嘉, Li C, 間石奈湖, Annan DA, 樋田泰浩, 樋田京子: 肺癌マウスモデルにおけるBiglycanの腫瘍微小環境に及ぼす影響, 口演, 第79回日本癌学会学術総会, 2020.10.1-3 (広島, WEB開催)
13. 積田卓也, Annan DA, 間石奈湖, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞が発現するLOX-1のがん転移における役割, 口演, 第79回日本癌学会学術総会, 2020.10.1-3 (広島, WEB開催)
14. 間石奈湖, 櫻井遊, 畠山浩人, Li C, Alam MT, 菊地央, 森本浩史, 森本真弘, 樋田泰浩, 原島秀吉, 樋田京子: リポソームsiRNAデリバリーシステムを用いた腫瘍血管biglycanを標的とした新規血管新生阻害療法, 口演, 第79回日本癌学会学術総会, 2020.10.1-3 (広島, WEB開催)
15. 古御堂純, 間石奈湖, Annan DA, 篠原信雄, 樋田京子: 悪性度の異なる前立腺がんのがん微小環境の違い, ポスター, 第79回日本癌学会学術総会, 2020.10.1-3 (広島, WEB開催)
16. 田中宏典, 間石奈湖, 森本浩史, Annan DA, 中村透, 樋田泰浩, 平野聡, 樋田京子: 肺癌の腫瘍血管内皮細胞におけるbiglycan発現の臨床的意義の検討, ポスター, 第79回日本癌学会学術総会, 2020.10.1-3 (広島, WEB開催)
17. 新山宗, 間石奈湖, 松田彩, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における高内皮細静脈と臨床的因子との関連, ポスター, 第79回日本癌学会学術総会, 2020.10.1-3 (広島, WEB開催)

(研究費獲得)

1. 文科省科研基盤研究(C) 2020-2022 佐藤千晴(代表) 間石奈湖, Annan DA(分担) 「がん幹細胞血管ニッチを標的とした口腔がん治療への応用」

2. 文科省科研基盤研究(C) 2020-2022 松田 彩(代表) 330万円「腫瘍血管由来因子を標的とした腫瘍溶解ウイルスの開発」, 樋田京子, 東野史裕, 間石奈湖(分担者)
3. 文科省科研若手研究 2019-2020 Annan DA(代表)「Elucidation of glutamine metabolism in tumor endothelial cells to develop novel anti-cancer drugs」
4. 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」
5. 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」
6. 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ブットスクリーニング」
7. 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」
8. 上原記念生命科学財団 2020年度研究奨励金(健康科学・医学・薬学) 間石奈湖(代表) 200万円「腫瘍血管の役割解明による新規診断・治療法の開発」

(受賞)

1. 2020.10.19 間石奈湖, 第6回北海道大学部局横断シンポジウムベストプレゼンテーション賞「抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管トランスポーター発現亢進とその機序」
2. 2
3. 2020.10.6 間石奈湖, 第31回日本臨床口腔病理学会学術大会優秀発表賞「抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管 ABCB1 発現亢進とそのメカニズム解明」
4. 2020.8.20 Dorcas A. Annan, 第9回北海道癌談話会奨励賞 “Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis in the tumor microenvironment”
5. 2020.8.6 間石奈湖, 日本臨床口腔病理学会奨励賞 “Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan.”
6. 2020.7.2 間石奈湖, 第74回日本口腔科学会学術集会(インターネット学術集会) Web学会賞「抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管 ABCB1 発現亢進とその機序」
7. 2020.4.15 間石奈湖, 第74回日本口腔科学会 学会賞優秀ポスター賞「抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管 ABCB1 発現亢進とその機序」

今後の課題:

- ① Biglycan の治療前後の変動解析: TEC マーカー Biglycan が治療経過に伴いどのように変動しているのか解析を進める.
- ② Biglycan 阻害物質スクリーニング: 東京大学創薬機構から Advanced Core Library および Validated Compound Library の提供を受け, 一次スクリーニングを実施する.
- ③ Biglycan 中和抗体の作成にむけた基盤形成  
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.

Biglycan サンドイッチ ELISA 構築に向けた抗体の探索

今年度の検証により, Biglycan は患者血清中で様々な蛋白と結合していることが示唆されている. 免疫生物研究所に委託して作成したペプチド抗体4種すべてがリコンビナント Biglycan, 培養上清の蛋白を検出できたにもかかわらず, 血中 biglycan の検出は不可能であった. そこで, サメ抗体 VNMR のうち血液中の Biglycan に結合可能なものを探索し, これらの抗体を用いてサンドイッチ ELISA を構築し, より腫瘍血管内皮に特異的な診断薬の開発を目指す.