

令和元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2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	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
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：

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ている。その一つである分泌タンパク Biglycan についてはがん細胞の TLR2, TLR4 に結合しがんの転移を促進させ、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)。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 を標的とした抗腫瘍薬の開発を目的に貴センターバイオイメージング部門竹田浩之准教授との共同で、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 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、さらに肺がん患者 46 例を用いて健常者の血漿の 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。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。今年度は 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構築を目指し、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、ヒトともに作成した。また、TLR2/4 -GST-FLAG の作成も終わることができ、来年度には Biglycan -TLR の結合の検出による化合物探索を開始する予定である。

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

ヒト biglycan 発現用プラスミドを構築しサメに免疫を行った。精製された抗体バリデーションを腫瘍血管内皮細胞を用いて、あるいは上記の AlphaScreen を用いて行う展望が開けた。

#### 成果発表：

(論文・総説・著書)\* corresponding author

1. Hida K., Maishi N., Hida Y. (2019) Tumor Blood Vessels as Targets for Cancer Therapy. In: Matsumura Y., Tarin D. (eds) Cancer Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment. Springer, Tokyo, 2019
2. 樋田京子, 間石奈湖:高倉伸幸企画, がん免疫の効果を左右する腫瘍血管と免疫環境, “腫瘍血管内皮細胞の異常性と腫瘍免疫”, 実験医学 37(19), 羊土社, 3201-3205, 2019 (分担執筆)
3. 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, 2019
4. 樋田京子:血管新生阻害療法の展望, 北海道歯学雑誌, 39(2), 2019
5. Nako Maishi, Dorcas A. Annan, Hiroshi Kikuchi, Yasuhiro Hida and Kyoko Hida\* : Tumor endothelial heterogeneity in cancer progression, *Cancers*, 2019, 11, 1511 (IF=6.162)
6. Dorcas Akuba Muhyia Annan, Nako Maishi, Tomoyoshi Soga, Randa Dawood, Cong Li, Hiroshi Kikuchi, Takayuki Hojo, Masahiro Morimoto, Tetsuya Kitamura, Mohammad Towfik Alam, Kazuyuki Minowa, Nobuo Shinohara, Jin-Min Nam, Yasuhiro Hida, Kyoko Hida: Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis in the tumor microenvironment, *Cell Communication and Signaling*, 17, 169 (IF=4.603)
7. Nako Maishi.<sup>s</sup>, Hiroshi Kikuchi.<sup>s</sup>, Masumi Sato, Hiroko Nagao-Kitamoto,

- Dorcias A. Annan, Shogo Baba, Takayuki Hojo, Misa Yanagiya, Yusuke Ohba, Genichiro Ishii, Kenkichi Masutomi, Nobuo Shinohara, Yasuhiro Hida, Kyoko Hida \* : Development of immortalized human tumor endothelial cells from renal cancer, *Int J Mol Sci*, **equally contributed**, 20, 4595, 2019 (IF=4.331)
8. Toshihiro Kushibiki, Toru Nakamura, Masumi Tsuda, Takahiro Tsuchikawa, Koji Hontani, Kazuho Inoko, Mizuna Takahashi, Toshimichi Asano, Keisuke Okamura, Soichi Murakami, Yo Kurashima, Yuma Ebihara, Takehiro Noji, Yoshitsugu Nakanishi, Kimitaka Tanaka, Nako Maishi, Katsunori Sasaki, Woong-Ryeon Park, Toshiaki Shichinohe, Kyoko Hida, Shinya Tanaka, and Satoshi Hirano : Role of dimerized C16orf74 in aggressive pancreatic cancer: A novel therapeutic target, *Mol Cancer Ther*, 19(1):187-198, 2019 (IF=5.373)
  9. Ahmed Y AlBaloul, Yusuke Sato, Nako Maishi, Kyoko Hida, Hideyoshi Harashima : Two modes of toxicity of lipid nanoparticles containing a pH-sensitive cationic lipid on human A375 and A375-SM melanoma cell lines, *BPB Reports*, 2, 48-55, 2019
  10. Sakurai Y., Kato A., Hida Y., Hamada J., Maishi N., Hida K., Harashima H. : Synergistic enhancement of cellular uptake with CD44-expressing malignant pleural mesothelioma by combining cationic liposome and hyaluronic acid-lipid conjugate, *J Pharm Sci*, 108, 3218-3224, 2019 (IF=3.369)
  11. Yuichi Akatsu, Naoya Takahashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Shiori Kimuro, Tomoki Muramatsu, Akihiro Katsura1, Nako Maishi, Hiroshi I. Suzuki, Johji Inazawa, Kyoko Hida, Kohei Miyazono, and Tetsuro Watabe : Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor- $\beta$ -induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1, *Molecular Oncology*, 13(8), 1706-1724, 2019 (IF=5.497)

(招待講演)

1. 樋田京子 : 日本薬物動態学会第 34 回年会シンポジウム 4 「血管を標的とした DDS の潮流」, “腫瘍血管の多様性”, 2019.12.10 (つくば)
2. 樋田京子 : 第 57 回日本癌治療学会スポンサーDシンポジウム 4 「がんの増悪・浸潤・転移に関わる腫瘍微小環境の重要性」, “がん微小環境に対する創薬の幕開け”, 2019.10.25 (福岡)
3. 間石奈湖, 樋田京子 : 腫瘍血管内皮細胞による Biglycan の分泌を介したがんの転移促進, 第 61 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム, 2019.10.12 (東京)
4. 樋田京子 : 第 60 回日本脈管学会総会学術委員会シンポジウム 2 「がん治療～脈管を攻める、脈管を守る」, “治療標的としての腫瘍血管の特性”, 2019.10.10 (東京)
5. 樋田京子 : 高知大学 DC セミナー「歯科口腔外科学」, 2019.10.4 (高知)
6. 樋田京子 : 第 30 回日本臨床口腔病理学会合同シンポジウム「口腔に症状が現れる全身疾患へのアプローチ」, “血管新生とがんの悪性化”, 2019.9.23 (東京)
7. Hida K. : Roles of tumor endothelial cells in tumor progression, the 2019 AVBS SCIENTIFIC MEETING-JOINT VASCULAR BIOLOGY MEETING, 2019.9.20, Sydney, Australia
8. 樋田京子 : 文部科学省新学術領域研究 細胞社会ダイバースシテの統合的解明と制御\_第 92 回日本生化学会共催シンポジウム「臓器の構築と制御の統合的理解を目指した細胞ダイバースシティー研究」, “腫瘍組織の多様性と相互作用”, 2019.9.19 (東京)
9. 樋田京子 : 令和元年北海道大学歯学部口腔外科同門会学術大会, “腫瘍血管研究と今後の展望～Bench to Bedの実現にむけて～”, 2019.9.14 (札幌)
10. Maishi N. Hida K. : International Symposium between National Yang-Ming University and Hokkaido University, “Contribution of Tumor Endothelial Cells to Tumor Metastasis”, 2019.8.11
11. 間石奈湖, 樋田京子 : 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会 研究奨励賞講演 “腫瘍血管内皮細胞による Biglycan の分泌を介したがんの転移促進”, 2019.7.26 (鹿児島)
12. Hida K. : Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression, The 38<sup>th</sup> Sapporo International Cancer Symposium, 2019.7.12
13. 樋田京子 : 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「細胞社会ダイバースシテの統合的解明と制御」第四回公開シンポジウム, “腫瘍血管の多様性とその制御”, 2019.6.27 (神戸)
14. 樋田京子 : 第 119 回北海道癌談話会春季シンポジウム「がん免疫療法: 基礎と臨床のコラボレーション」, “腫瘍免疫における血管の役割”, 2019.6.22 (札幌)
15. 樋田京子 : 第 57 回日本小児歯科学会大会 将来計画検討委員会・女性歯科医委員

- 会合同企画シンポジウム“継続は力なり～双子連れ留学, 研究室開設の経験から”, 2019. 6. 10 (札幌)
16. 樋田京子: Lung Cancer Expert Meeting in Sapporo, “VEGF 阻害による腫瘍微小環境の制御”, 2019. 5. 17 (札幌)
  17. 樋田京子: 第 108 回日本病理学会総会 特別シンポジウム 1「がんゲノム医療と病理」, “腫瘍血管内皮の遺伝子異常”, 2019. 5. 9 (東京)
  18. 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)

(学会発表)

1. Dorcas A. Annan, Nako Maishi, Tomoyoshi Soga, Randa Dawood, Li Cong, Hiroshi Kikuchi, Takayuki Hojo, Masahiro Morimoto, Tetsuya Kitamura, Mohammad Towfik Alam, Kazuyuki Minowa, Nobuo Shinohara, Jin-Min Nam Yasuhiro Hida<sup>5</sup>, Kyoko Hida\*: Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis, Meeting Global Health Challenges: 40 Years of Innovative Research at NMIMR, Accra, Ghana, 2019. 11. 29
2. Maishi N., Kikuchi H., Abe T., Matsuno Y., Hida Y., Shinohara N., Hida K.: Increased ABCB1 expression in tumor blood vessels of urothelial carcinoma after chemotherapy, The 38<sup>th</sup> Sapporo International Cancer Symposium, 2019. 7. 12
3. D. A. Annan, Maishi N., Soga T. R. Dawood, Li Cong, Kikuchi H., Hojo T., Morimoto M., Kitamura T., Mohammad T. Alam, Minowa K., Shinohara N., Hida Y., Hida K.: Carbonic anhydrase 2 (CA II) is essential for tumor endothelial cell proliferation under various metabolic conditions, The 38<sup>th</sup> Sapporo International Cancer Symposium, 2019. 7. 12
4. Morimoto M., Maishi N., Matsuda A. Kitamura T., Higashino F., Kitagawa Y., Hida Y., Hida K.: Promotion of metastasis via alteration of vascular endothelium by tumor exosome miRNA, Annual Meeting ISEV2019, 2019. 4. 26, Kyoto, Japan
5. 積田卓也, 間石奈湖, 樋田泰浩, 樋田京子: 酸化 LDL 受容体 LOX-1 の腫瘍病態における発言と病態生理学的意義の検討, 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 第 3 回若手ワークショップ, 2020. 2. 12-13 (熱海)
6. 間石奈湖, 樋田京子: がんの転移における腫瘍血管内皮細胞の役割解明, 第 1 回日本癌学会若手の会, 2020. 2. 2. 12 (熱海)
7. 菊地 央, 間石奈湖, Dorcas A. Annan, Mohammad Towfik Alam, Randa Ibrahim Hassan Dawood, 森本真弘, 松本隆児, 大澤崇宏, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 松野吉弘, 篠原信雄, 樋田京子: 尿路上皮癌における抗癌剤治療後の腫瘍血管 ABCB1 発現亢進と薬剤耐性, 第 1 回日本癌学会若手の会, 2020. 2. 2. 11-13 (熱海)
8. 間石奈湖, 菊地 央, 樋田京子: 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 第 5 回公開シンポジウム「多面的 1 細胞解析技術が解き明かす細胞社会ダイバーシティ」, “抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管 ABCB1 発現亢進とその機序”, 2020. 1. 29 (東京)
9. 積田卓也, Li Cong, 間石奈湖, 樋田泰浩, 松田彩, 東野史裕, 樋田京子: 細胞外マトリックス Bvlglycan による腫瘍血管新生亢進ならびに血管未成熟性がもたらす転移促進, 第 27 回日本血管生物医学学会学術集会, 2019. 12. 15 (神戸)
10. Li Cong, Nako Maishi, Dorcas A. Annan, Marian F. Young, Yasuhiro Hida, Kyoko Hida: Biglycan promotes tumor angiogenesis, desmoplasia and potentiates tumor immune responses, 第 5 回北海道大学部局横断シンポジウム, 2019. 11. 5 (札幌)
11. 積田卓也, 森本真弘, 間石奈湖, 吉岡祐亮, 樋田泰浩, 小坂展慶, 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 による血管内皮の形質変化と転移促進, 第 6 回日本細胞外小胞学会学術集会, 2019. 10. 25 (東京)
12. Li Cong, Maishi N., Dorcas A. Annan, Hida Y., Hida K.: Stromal biglycan promotes tumor angiogenesis and potentiates tumor immune responses, 第 79 回日本癌学会学術総会, 2019. 9. 27 (京都)
13. Maishi N., Dorcas A. Annan, Soga T., Dawood Randa, Li Cong, Kikuchi H., Hojo T., Morimoto M., Kitamura T., Mohammad Towfik Alam, Shinohara N., Hida Y., Hida K.: Carbonic anhydrase 2 (CA II) is essential for tumor endothelial cell proliferation, 第 79 回日本癌学会学術総会, 2019. 9. 27 (京都)
14. Dorcas A. Annan, Maishi N., Soga T., Randa Dawood, Li Cong, Kikuchi H., Hojo T., Morimoto M., Kitamura T., Mohammad Towfik Alam, Minowa K., Shinohara N., Jin-Min Nam, Hida Y., Hida K.: Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor endothelial cell survival in lactic acidosis, 第 28 回日本がん転移学会学術

- 集会・総会, 2019. 7. 25 (鹿児島)
15. Annan Dorcas A., Maishi N., Soga T., Dawood Randa, Li Cong, Kikuchi H., Hojo T., Morimoto M., Kitamura T., Mohammad Towfik Alam, Minowa K., Shinohara N., Hida Y., Hida K.: Carbonic anhydrase 2 (CAII) is essential for tumor endothelial cell proliferation, 第 108 回日本病理学会総会, 2019. 5. 11 (東京)

(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. サノフィ株式会社 研究・教育支援 2019 年度, 樋田京子 (代表) 200 万円 「腫瘍血管内皮細胞標的化による薬剤耐性克服戦略の構築」
8. 中外製薬株式会社 研究活動支援 2019 年度, 樋田京子 (代表) 30 万円 「がん免疫における腫瘍血管内皮細胞の役割」
9. 日本医療研究開発機構 (AMED) 2019 革新的がん医療実用化研究事業ー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」

(受賞)

1. 2019. 11. 16 間石奈湖, 第 4 回 Skeletal Science Retreat 優秀ディスカッション賞
2. 2019. 10. 27 篠原早紀, 第 64 日本口腔外科学会総会・学術大会 優秀口演発表賞
3. 2019. 10. 25 積田卓也, 第 6 回日本細胞外小胞学会奨励賞「がん細胞エクソソーム microRNA-1246 による血管内皮の形質変化と転移促進」
4. 2019. 7. 26 間石奈湖, 日本がん転移学会研究奨励賞

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による, Biglycan 阻害化合物の同定。
- 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。  
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, サメ抗体のうち血液中の Biglycan に結合可能なものを探索する。