

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02891

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) high-throughput screening for tumor endothelial cell specific inhibitors

研究代表者

樋田 泰浩 (Hida, Yasuhiro)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：30399919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臨床腫瘍から腫瘍血管内皮細胞と非癌部分から正常血管内皮細胞を分離して培養した。FACS解析とRT-PCRで高純度の初代培養細胞樹立を確認した。hTERT遺伝子をこれらの初代培養細胞に導入し50代以上の継代が可能となった。遺伝子導入細胞は血管内皮細胞の表現型が保たれていた。また、初代培養細胞で認められていた遺伝子発現の特徴的な相違も保持されており、cell-based high through-put assayに用いる条件を満たすことが確認された。Screeningで見出した阻害剤のvalidationを行い、前臨床モデルで効果を検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生阻害剤はさまざまな固形癌の治療に使用されているが、分子標的であるVEGFやVEGF受容体は正常血管内皮細胞の保持に必須な分子であるために、高血圧、出血、創傷治癒遅延などの副作用が不可避である点が課題として残っている。本研究では正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞の違いを利用してhigh-through put screeningで腫瘍血管内皮細胞特異的な阻害剤を探索する手法を確立出来た。今後理想的な次世代腫瘍血管新生阻害の開発に寄与することが期待している。

研究成果の概要(英文)：Tumor endothelial cells from human clinical tumors and normal endothelial cells from non-cancerous portions were isolated and cultured. FACS analysis and RT-PCR confirmed the establishment of highly pure primary cultured cells. The hTERT gene was transfected into these primary cultured cells, and more than 50 generations of passages were possible. The transgenic cells maintained an endothelial cell phenotype. The transgenic cells retained the phenotype of endothelial cells and the characteristic differences in gene expression observed in primary cultured cells were also retained, and it was confirmed that the cells met the conditions for use in cell-based high through-put assays. We are validating the inhibitors found by screening and verifying in the preclinical models.

研究分野：悪性腫瘍

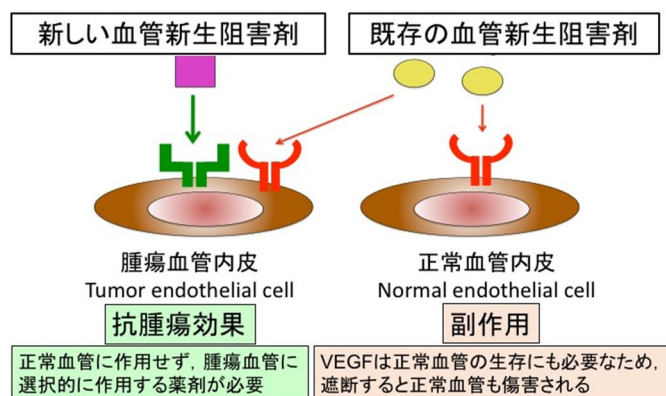
キーワード：血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

### 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

血管新生阻害剤は 2004 年に初めて bevacuzumab(アバスタチン®)がアメリカ合衆国 FDA で承認されて以来、主に抗がん剤との併用で多くの悪性腫瘍に適応を得ることに成功した。一方で、引き続き開発された血管新生阻害剤も研究開発当時の期待に反して単剤による副作用の無い腫瘍の完全な制御は達成していない。これは従来の血管新生阻害剤が正常血管内皮細胞の生理的な生存シグナル伝達経路をリガンドや受容体の活性中心に作用する物質の設計に基づいて開発されたことが原因であると考えられる。正常血管内皮細胞に対する副作用とシグナル阻害に伴うネガティブフィードバックの誘導が

腫瘍血管に特異性の高い血管新生阻害剤  
避けられない。本研究では正常血管内皮細胞とは異なる特異的な性質を持つ腫瘍血管内皮細胞を用いて cell-based ハイスループットスクリーニングを行うことで、正常血管内皮細胞に作用せず、ネガティブフィードバックを惹起しない理想的かつ強力な腫瘍特異的血管新生阻害剤の開発を行う。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は腫瘍血管内皮細胞特異的マーカーを利用して、正常血管内皮細胞に影響を及ぼさない、腫瘍血管新生を特異的に阻害する治療薬とコンパニオン診断薬を開発する基盤を築くことである。そのために下記3項目を小目標とした。1) 肺癌切除検体における腫瘍血管内皮細胞マーカー発現の解析：肺癌組織中の腫瘍血管内皮細胞における biglycan の発現と臨床病理学的因子の相関を検討して、肺癌進展への寄与を検証する。2) 腫瘍血管内皮細胞マーカー、biglycan の血清診断：血清中 biglycan を計測し、臨床病理学的因子、血管新生の指標との相関を検討する。3) 腫瘍血管内皮細胞阻害物質同定のためのスクリーニング系の樹立：ヒト腫瘍血管内皮細胞とコントロールとして正常 EC を不死化して細胞株化し、化合物ライブラリーなど阻害剤のスクリーニングを行えるようにする。

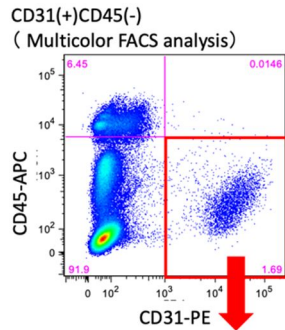
## 3. 研究の方法

ヒト臨床腫瘍から樹立した腫瘍血管内皮細胞とコントロールの正常腎血管内皮細胞にテロメラーゼ遺伝子の導入を行う。遺伝子導入後に本来の血管内皮細胞としての性質、腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の差異が失われる可能性があるため、表現形の変化を確認する。具体的には

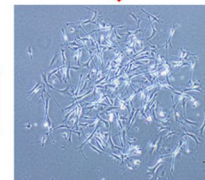
血管内皮細胞マーカー (CD31, VEGFR2 等), 腫瘍血管内皮細胞マーカー (Biglycan など) の発現を RT-PCR や FACS, ウェスタンブロットリングなどで確認する. Tube formation や wound assay で血管内皮細胞の性質の保持を確認する. また遺伝子導入によって 50 代以上の長期継代可能性の獲得を目標とする. 樹立した遺伝子導入内皮細胞株が既存の血管新生阻害剤に予想される効果を示すことを確認し, cell-based assay の認容性試験とする.

Cell-based assay ハイスループットスクリーニングを行い, 腫瘍血管内皮細胞特異的な阻害剤を探索する. コントロールの正常血管内皮細胞の増殖と遊走を阻害しないものを選択することで腫瘍血管内皮細胞特異性を担保する.

ヒットした候補物質を複数の腫瘍血管内皮細胞でバリデーションするとともに, マウス腫瘍モデルで増殖抑制を検証する.

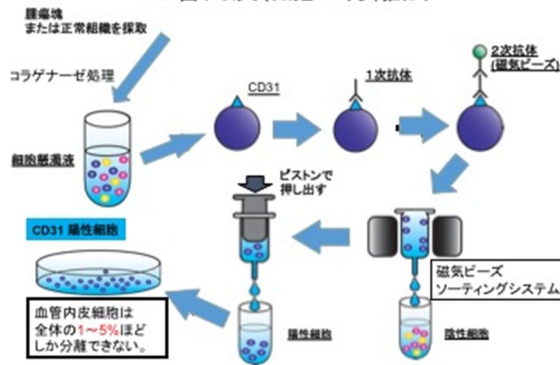


腫瘍血管内皮はわずか1~5%程度



培養へ

### 血管内皮細胞の分離法



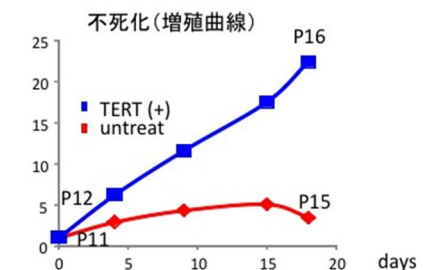
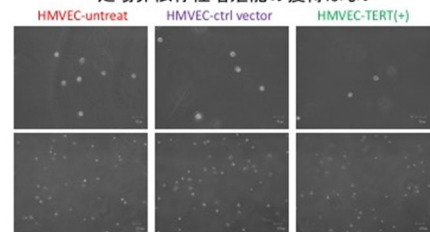
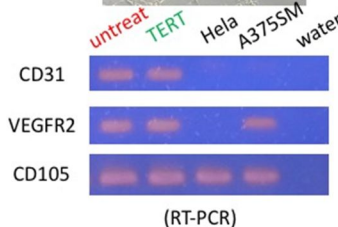
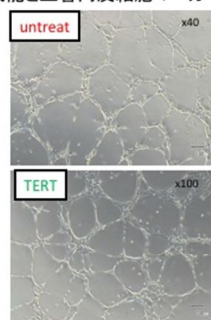
## 4. 研究成果

ヒト臨床腫瘍から腫瘍血管内皮細胞と非癌部分から正常血管内皮細胞を分離して培養した.

FACS 解析と RT-PCR で高純度の初代培養細胞樹立を確認した.

hTERT 遺伝子をこれらの初代培養細胞に導入し 50 代以上の継代が可能となった. 遺伝子導入細胞は血管内皮細胞の表現型が保たれていた. また, 初代培養細胞で認められていた遺伝子発現の特徴的な相違も保持されており, cell-based high through-put assay に用いる条件を満たすことが確認された. Screening で見出した阻害剤の validation を行い, 前臨床モデルで効果を検証している.

テロメラーゼ遺伝子TERT導入後の血管内皮細胞の不死化と性質の確認  
管腔形成能と血管内皮細胞マーカーの発現は保たれる Soft agar assay (2weeks)  
足場非依存性増殖能の獲得はない



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morimoto Hirofumi, Hida Yasuhiro, Maishi Nako, Nishihara Hiroshi, Hatanaka Yutaka, Li Cong, Matsuno Yoshihiro, Nakamura Toru, Hirano Satoshi, Hida Kyoko	4. 巻 0
2. 論文標題 Biglycan, tumor endothelial cell secreting proteoglycan, as possible biomarker for lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.13907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi H, Maishi N, Annan DA., Mohammad TA, Dawood R, 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, Hida K	4. 巻 80 (14)
2. 論文標題 Chemotherapy-induced IL-8 upregulates MDR1/ABC1 in tumor blood vessels and results in unfavorable outcome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2996-3008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-3791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Annan Dorcas Akuba-Muhyia, Kikuchi Hiroshi, Maishi Nako, Hida Yasuhiro, Hida Kyoko	4. 巻 21
2. 論文標題 Tumor Endothelial Cell - A Biological Tool for Translational Cancer Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3238 ~ 3238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21093238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菊地 奈湖 (間石奈湖)  (Maishi Nako)  (00632423)	北海道大学・歯学研究院・助教    (10101)	
研究分担者	樋田 京子  (Hida Kyoko)  (40399952)	北海道大学・歯学研究院・教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関