

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06208

研究課題名(和文) 肥満細胞トリプターゼ・PAR-2経路による血管新生促進機構の解明と癌治療への応用

研究課題名(英文) The role of mast cell tryptase/ PAR-2 pathway in tumor angiogenesis

研究代表者

前田 真吾 (Maeda, Shingo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：80755546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：Protease-activated receptor-2 (PAR-2)は、特定の蛋白分解酵素によって活性化する受容体であるが、腫瘍微小環境における役割はわかっていなかった。本研究では、腫瘍組織内の血管内皮細胞に発現するPAR-2の活性化が血管新生を誘導し、腫瘍の増殖を促進することを細胞株およびマウスモデルを用いて明らかにした。さらに、PAR-2を活性化するリガンドとして、腫瘍組織内に存在する肥満細胞が産生するトリプターゼが重要である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学・獣医学領域においてがん患者数は年々増加しており、その多くが致命的な転機を辿ることから大きな問題となっている。がんの増殖には大量の栄養素や酸素を消費するため、それを供給する血管を新しく作る必要がある。本研究は、PAR-2と呼ばれる分子ががんに新たな血管を作る働きを持つことを明らかにした。この研究成果は、PAR-2の働きをおさえる新しい抗がん剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is a receptor that activated by several proteases such as trypsin and tryptase. However, the role of PAR-2 in tumor microenvironment is unclear. In the present project, we have revealed that endothelial PAR-2 activation induces angiogenesis and tumor growth using murine models. In addition, we showed the importance of mast cell-derived tryptase as a ligand of PAR-2 in the tumor tissue.

研究分野：獣医学

キーワード：がん 血管新生 プロテアーゼ 肥満細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 医学・獣医学領域において腫瘍性疾患は年々増加しており、その多くが致死的な転機を辿ることから大きな問題となっている。この不治の病を克服するためにこれまでに様々な研究が行われ、多様な抗がん剤が開発されてきたが、現在においてもその克服には至っていない。

(2) 腫瘍細胞の活発な増殖には大量の酸素や栄養が必要である。そのため、腫瘍組織内では血管新生が盛んに行われており、酸素や栄養が供給されている。

(3) 肥満細胞はアレルギー性疾患の発症に重要な免疫細胞であるが、近年様々な腫瘍組織内に浸潤し、血管新生を促進することで腫瘍の進行に関与することが分かってきた。肥満細胞が産生する血管新生促進因子のうち、血管内皮増殖因子(VEGF)やTNF- $\alpha$ に焦点を当てた研究がこれまで盛んに行われてきたが、肥満細胞が最も多く産生する蛋白質であるトリプターゼに着目した研究は限られていた。

#### 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では「トリプターゼにより活性化される受容体であるProtease-activated receptor-2(PAR-2)が腫瘍における血管新生を促進する新しい分子である」という仮説を立て、その証明と癌治療に応用する基盤技術の創出を目的とした。

#### 3. 研究の方法

(1) 担癌モデルマウスの作製には、C57BL/6背景の野生型マウスおよびPAR-2遺伝子欠損マウスを用いた。癌細胞として、マウス悪性黒色腫細胞株であるB16細胞を皮下に注射した。皮下に形成された腫瘍サイズを経時的に測定し、腫瘍体積を評価した。

(2) 野生型マウスを用いて担癌モデルを作製し、PAR-2阻害剤または溶媒を腹腔内投与した。

(3) 皮下に形成された腫瘍組織を摘出後、薄切切片を作製し、一般染色、特殊染色、免疫染色を行った。

(4) 血管に結合する蛍光色素を担癌マウスに静脈内投与し、in vivo イメージングにより腫瘍内の血管新生を評価した。

(5) ヒト臍帯血静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、PAR-2作動薬が内皮細胞の管腔形成に与える影響を評価した。

(6) イヌの様々な腫瘍組織(悪性黒色腫、乳腺癌、移行上皮癌、前立腺癌、肺腺癌、肝細胞癌)における肥満細胞浸潤、血管新生およびPAR-2発現を免疫染色により評価した。さらにこれらパラメータと症例の予後との相関を解析した。

(7) イヌ乳腺癌細胞株(CIPp)を用いて、PAR-2作動薬が癌細胞の遊走、浸潤、アクチン重合化および上皮間葉転換に与える影響を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス悪性黒色腫の担癌モデルにおいて、PAR-2欠損により腫瘍の増殖が抑制された。また、PAR-2阻害剤の投与によっても腫瘍の増殖が抑制された。

(2) 担癌モデルから摘出された腫瘍組織の血管周囲には、肥満細胞が多数観察された。野生型マウスと比較してPAR-2遺伝子欠損マウスでは、腫瘍組織における血管面積の狭小化および壊死巣の拡大が認められた。PAR-2阻害剤の投与によっても同様の所見が得られた。

(3) In vivo イメージングにより腫瘍血管を評価したところ、PAR-2欠損により腫瘍内の血管新生が減少していることが観察された。同様に、PAR-2阻害剤の投与でも腫瘍内の血管新生が減少していた。

(4) 野生型マウスから摘出した腫瘍組織におけるPAR-2の局在を検討したところ、腫瘍内の血管内皮細胞にPAR-2が強く発現していた。B16癌細胞にはPAR-2は発現していなかった。

(5) In vitro の実験により、内皮細胞が発現するPAR-2の活性化が管腔形成および血管新生を誘導することがわかった。

(6) イヌの様々な腫瘍組織のうち、悪性黒色腫、乳腺癌、移行上皮癌、前立腺癌、肺腺癌で肥満細胞の浸潤およびPAR-2発現が認められた。特に乳腺癌では腫瘍細胞および血管内皮細胞にPAR-2の強い発現が観察された。

(7) イヌ乳腺癌細胞株を用いた解析により、PAR-2 の活性化が乳腺癌細胞の遊走および浸潤能を増強させることを明らかにした。さらに、PAR-2 の活性化により乳癌細胞の上皮間葉転換およびアクチン重合化が促進することがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

Maeda S\*, Murakami K, Inoue A, Yonezawa T, Matsuki N. CCR4 Blockade Depletes Regulatory T cells and Prolongs Survival in a Canine Model of Bladder Cancer. *Cancer Immunology Research*. 査読有, 2019; in press

Uchida M, Uchida K, Maeda S, Yonezawa T\*. Expression of apoptosis inhibitor of macrophages in tissue macrophages, leukocytes and vascular endothelial cells of dogs. *Tissue and cell*. 査読有, 2019; in press

Tsuboi M, Sakai K, Maeda S\*, Chambers JK, Yonezawa T, Matsuki N, Uchida K, Nakayama H. Assessment of HER2 Expression in Canine Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. *Veterinary Pathology*. 査読有, 2019; 56(3):369-376

Sakai K, Maeda S\*, Saeki K, Nakagawa T, Murakami M, Endo Y, Yonezawa T, Kadosawa T, Mori T, Nishimura R, Matsuki N. Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. *Veterinary and Comparative Oncology*. 査読有, 2018; 16(4):642-649

Inagaki S, Maeda S, Narita M, Nakamura T, Shimosawa T, Murata T\*, Ohya Y\*. Urinary PGDM, a prostaglandin D2 metabolite, is a novel biomarker for objectively detecting allergic reactions of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 査読有, 2018;142(5):1634-1636.e10

Maeda S\*, Tomiyasu H, Tsuboi M, Inoue A, Ishihara G, Uchikai T, Chambers JK, Uchida K, Yonezawa T, Matsuki N. Comprehensive gene expression analysis of canine invasive urothelial bladder carcinoma by RNA-Seq. *BMC Cancer*. 査読有, 2018; 18(1):472

Sugimoto S, Maeda S\*, Tsuboi M, Saeki K, Chambers JK, Yonezawa T, Fukushima K, Fujiwara R, Uchida K, Tsujimoto H, Matsuki N, Ohno K. Multiple acquired portosystemic shunts secondary to primary hypoplasia of the portal vein in a cat. *Journal of Veterinary Medical Science*. 査読有, 2018; 80(6):874-877

Hamabata T, Nakamura T, Masuko S, Maeda S, Murata T\*. Production of lipid mediators across different disease stages of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Journal of Lipid Research*. 査読有, 2018; jlr.M079095

Sakai K, Maeda S\*, Yamada Y, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Yonezawa T, Matsuki N. Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 査読有, 2018; 16: 330-336

Sakai K, Maeda S\*, Yonezawa T, Matsuki N. Decreased plasma amino acid concentrations in cats with chronic gastrointestinal diseases and their possible contribution in the inflammatory response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 査読有, 2018; 195:1-6

Maeda S, Nakamura T, Harada H, Tachibana Y, Aritake K, Shimosawa T, Yatomi Y, Murata T\*. Prostaglandin D2 metabolite in urine is an index of food allergy. *Scientific Reports*. 査読有, 2017; 15;7(1):17687

Maeda S\*, Tsuboi M, Sakai K, Ohno K, Fukushima K, Kanemoto H, Hiyoshi-Kanemoto S, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Yonezawa T, Uchida K, Matsuki N. Endoscopic Cytology for the Diagnosis of Chronic Enteritis and Intestinal Lymphoma in Dogs. 査読有, *Veterinary Pathology*. 2017; 54(4):595-604

Nakamura T, Fujiwara Y, Yamada R, Fujii W, Hamabata T, Lee MY, Maeda S, Aritake K, Roers A, Sessa WC, Nakamura M, Urade Y, Murata T\*. Mast cell-derived prostaglandin D2 attenuates anaphylactic reactions in mice. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 査読有, 2017; 140(2):630-632.e9

Inoue A, Maeda S\*, Kinoshita R, Tsuboi M, Yonezawa T, Matsuki N. Density of tumor-infiltrating granzyme B-positive cells predicts favorable prognosis in dogs with transitional cell carcinoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 査読有, 2017; 190: 53-56

Omori M, Maeda S\*, Igarashi H, Ohno K, Sakai K, Yonezawa T, Horigome A, Odamaki T, Matsuki N. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*. 査読有, 2017; 17;79(11): 1840-1847

Kobayashi K, Horikami D, Omori K, Nakamura T, Yamazaki A, Maeda S, Murata T\*.

Thromboxane A2 exacerbates acute lung injury via promoting edema formation. Scientific Reports. 査読有, 2016; 6:32109  
Murakami K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N\*. CC chemokine ligand 2 and CXC chemokine ligand 8 as neutrophil chemoattractant factors in canine idiopathic polyarthritis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 査読有, 2016;182: 52-58  
Uchida M, Saeki K, Maeda S, Tamahara S, Yonezawa T\*, Matsuki N. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) reduces cell number in canine histiocytic sarcoma cell lines. Journal of Veterinary Medical Science. 査読有, 2016;78(9): 1515-1520  
Murakami K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N\*. Synovial fluid matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in dogs suffering from joint disorders. Journal of Veterinary Medical Science. 査読有, 2016; 78(6): 1051-1054  
Maeda S, Ohno K\*, Fujiwara-Igarashi A, Uchida K, Tsujimoto H. Changes in Foxp3-positive Treg number in the intestine of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. 査読有, Veterinary Pathology. 2016; 53(1): 102-112

[学会発表](計 23 件)

前田真吾、犬の移行上皮癌に対する免疫療法 ~制御性 T 細胞を制御する~, 第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2019) 2019 年  
酒居幸生、前田真吾、米澤智洋、犬の移行上皮癌に対するラパチニブの臨床試験、第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2019) 2019 年  
梶健二郎、前田真吾、米澤智洋、松木直章、第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2019) 2019 年  
酒居幸生、前田真吾、佐伯亘平、吉竹涼平、中川貴之、西村亮平、米澤智洋、デジタル PCR を用いた犬の移行上皮癌における HER2 遺伝子増幅検出法の確立、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年  
梶健二郎、前田真吾、米澤智洋、松木直章、Protease-Activated Receptor-2 は血管新生を促進することで腫瘍を増大させる、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年  
酒居幸生、前田真吾、米澤智洋、移行上皮癌の犬に対する抗 HER2 療法のパイロットスタディ、第 11 回日本獣医腎泌尿器学会学術集会・総会、2018 年  
Sakai K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N, LAPATINIB HAS THERAPEUTIC POTENTIAL FOR CANINE TRANSITIONAL CELL CARCINOMA、International Society For Animal Clinical Pathology ISACP 2018、2018 年  
Kaji K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N, PAR-2 SIGNALING ACCELERATE TUMOR GROWTH VIA PROMOTING TUMOR ANGIOGENESIS、International Society For Animal Clinical Pathology ISACP 2018、2018 年  
Uchida M, Matsumiya Y, Bonkobara M, Maeda S, Yonezawa T, EXPRESSION OF APOPTOSIS INHIBITOR OF MACROPHAGE IN CANINE HISTIOCYTIC SARCOMA AND ITS RELATION TO TUMOR MALIGNANCY、International Society For Animal Clinical Pathology ISACP 2018、2018 年  
Sakai K, Maeda S, Tsuboi M, Yonezawa T, Matsuki N, Antitumor Effect of Lapatinib in Canine Transitional Cell Carcinoma Cell Lines、ACVIM 2018、2018 年  
前田真吾、膀胱腫瘍の最前線 ~内科療法の現状と未来~, 第 14 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2018) 2018 年  
酒居幸生、前田真吾、坪井誠也、米澤智洋、村上麻美、森 崇、松木直章、犬の膀胱移行上皮癌における HER2 発現解析および HER2 阻害剤の抗腫瘍効果の検討、第 14 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2018) 2018 年  
前田真吾、中村達朗、稲垣真一郎、成田雅美、原田広顕、下澤達雄、矢富裕、大矢幸弘、村田幸久、PGD<sub>2</sub> 尿中代謝産物は食物アレルギーの新規バイオマーカーである、第 59 回日本脂質生化学会、2017 年  
井上亜希子、前田真吾、富安博隆、米澤智洋、松木直章、犬の膀胱移行上皮癌におけるトランスクリプトーム解析、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年  
酒居幸生、前田真吾、米澤智洋、松木直章、イヌの悪性腫瘍における制御性 T 細胞浸潤と予後との関連、日本獣医臨床病理学会 2017 年大会、2017 年  
梶健二郎、前田真吾、米澤智洋、松木直章、腫瘍における Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) を介した血管新生促進機構の解明、日本獣医臨床病理学会 2017 年大会、2017 年  
Sakai K, Maeda S, Tsuboi M, Yonezawa T, Matsuki N, Association of Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells With Adverse Outcome in Dogs With Solid Tumors、ACVIM 2017、2017 年  
Nakamura T, Maeda S, Harada H, Aritake K, Shimosawa T, Urade Y, Yatomi Y, Murata T, Urinary Prostaglandin D2 Metabolite is a Novel Biomarker of Food Allergy、2017 AAAAI Annual Meeting、2017 年  
前田真吾、犬の悪性腫瘍組織への制御性 T 細胞浸潤機構、第 13 回日本獣医内科学アカデ

ミー学術大会 (JCVIM 2017)、2017 年

前田真吾、内視鏡における細胞診、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2017)、2017 年

- ⑳ 井上亜希子、前田真吾、米澤智洋、松木直章、犬の膀胱移行上皮癌における腫瘍浸潤リンパ球の免疫組織化学的検討、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2017)、2017 年
- ㉑ 酒居幸生、前田真吾、米澤智洋、松木直章、慢性消化器疾患の猫における血漿中アミノ酸プロファイル解析、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2017)、2017 年
- ㉒ 前田真吾、犬の腫瘍組織への制御性 T 細胞浸潤機構の解明、日本獣医臨床病理学会 2016 年大会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：食肉目動物の癌検出方法

発明者：前田真吾、酒居幸生

権利者：東京大学

種類：特願

番号：2018-009612

出願年：2018 年 1 月 24 日

国内外の別：国内

名称：CCR4 阻害による制御性 T 細胞浸潤抑制法およびイヌの腫瘍性疾患の治療法

発明者：前田真吾

権利者：日本全薬工業株式会社、前田真吾

種類：PCT

番号：JP2018/016920

出願年：2018 年 4 月 26 日

国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.maedalab.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。