

令和元年5月31日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07272

研究課題名(和文) DAMPsによる血管新生機序解明および新規がん治療薬の創薬研究

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism underlying angiogenesis by DAMPs and drug discovery research of novel angiogenesis inhibitor.

研究代表者

山崎 由衣 (YAMAZAKI, Yui)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：50761970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：がんなどの様々な病態において、血管新生の異常が生じ、その病態の悪化に繋がることが知られている。我々は、糖尿病や加齢によって増加し、あらゆる疾患との関連が報告されている advanced glycation end products (AGEs) が血管新生を制御していると考え検討を行った。その結果、複数の膜抗原が協力して AGEs をエンドサイトーシスによって血管内皮細胞内へ取り込ませ、過剰な血管新生を誘導していることが明らかとなった。また、この AGEs による過剰な血管新生を抑制する食物由来成分を見出した。これらの研究は、今後の新規血管新生阻害薬の創薬研究に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんや糖尿病性網膜症、慢性炎症性疾患では、過剰な血管新生が誘導されその後の病態が増悪する。よって、新規血管新生抑制薬の開発が望まれている。本研究課題で我々は、上記のような疾患との関連が報告されている AGEs に着目し、AGEs が過剰な血管新生を誘導し、脆弱な血管が形成されることを見出し、その血管新生促進機序の一部を明らかとした。さらに、この血管新生を抑制する食物由来成分を明らかとしており、これが新規血管新生阻害薬の候補分子となる可能性が考えられる。よって、本研究は今後の創薬研究に大きな影響を与える成果が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Excessive angiogenesis in cancer exacerbates clinical condition. We focused on advanced glycation end products (AGEs) that increases with advancing age and hyper glucemic condition. We hypothesized that AGEs induces excessive angiogenesis. Therefore, we studied effect of AGEs on angiogenesis. In results, AGEs were upteked by endocytosis using multiple membrane antigens into endothelial cells. Then, ingested AGEs induced abnormal angiogenesis. Moreover, we discovered the food-derived inhibitor of excessive angiogenesis by AGEs. These data may contribute greatly to the drug discovery research of novel angiogenesis inhibitor.

研究分野：薬理学

キーワード：AGEs 血管新生 エンドサイトーシス

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

1. 研究開始当初の背景

がんが原発巣に限局する場合の治療率は改善した一方で、転移した場合の予後は極めて不良である。がん細胞の増殖・転移には血管新生が必須の現象とされており、実際に、細胞障害性の抗がん剤と血管新生阻害剤の併用は一定の延命効果をもたらす。よって、がんの転移・再発に有効な新たな血管新生阻害薬の開発が注目されている。本研究で着目している advanced glycation end products (AGEs) は、内因性の自然免疫活性化因子である damaged associated molecular patterns (DAMPs) のひとつで、がん増悪/改善および血管新生の促進/抑制の両方向性に作用することが知られている。しかしながら、その詳細な機序は不明なままであった。そこで本研究では、AGEs による血管新生促進機序を解明および新規血管新生阻害薬の探索を行った。

2. 研究の目的

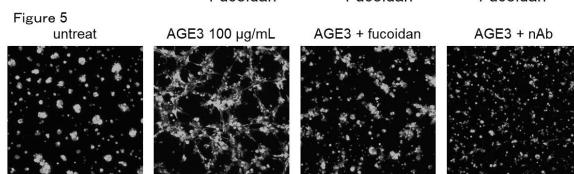
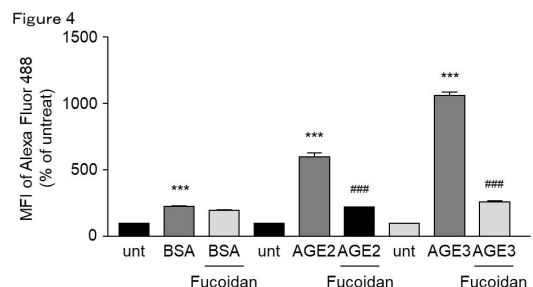
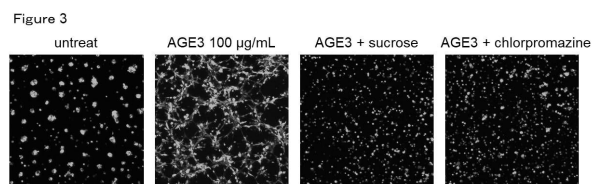
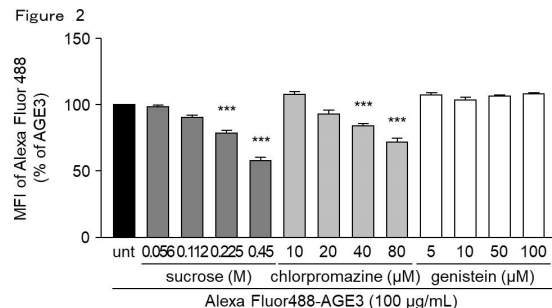
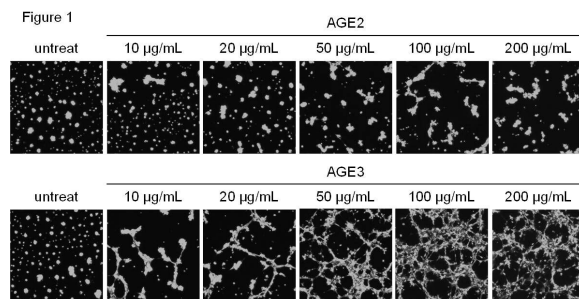
本研究課題では、「新規血管新生阻害薬の創薬の基礎研究」を目的とし、DAMPs による血管新生機序解明および血管新生抑制薬の標的分子の探索を行う。

3. 研究の方法

実験にはマウス由来血管内皮細胞である b.End5 細胞を用いた。マトリゲルコーティングした 96 well plate に b.End5 細胞を播種し、16 時間後の管腔形成の様子を血管新生の指標とした。膜抗原発現および各種タンパク質発現は、フローサイトメトリーならびに western blot 法、免疫組織染色によって解析した。b.End5 細胞による AGEs の細胞内取り込み活性はフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用いて解析した。細胞生存率は WST-8 試験を用いて測定した。

4. 研究成果

AGEs の中でも特に毒性が高いとされている AGE2 および AGE3 を用いて検討を行った。その結果、b.End5 細胞による血管管腔形成は AGE2 および AGE3 処置によって濃度依存的かつ有意に促進された (Figure 1)。また、AGE2 あるいは AGE3 処置によって、b.End5 細胞表面に発現する TLR-2、CD204、CD163、LOX-1 の発現は有意に増加した。b.End5 細胞による AGE2 および AGE3 の細胞内取り込みは、濃度・時間依存的かつ有意に増加した。また、AGE2 および AGE3 は細胞室の小胞内へ取り込まれている様子が観察されたことから、エンドサイトーシスによって取り込まれている可能性が考えられた。したがって、エンドサイトーシス阻害剤を用いた検討を行った。その結果、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤である sucrose および chlorpromazine によって、AGE3 の取り込み活性が抑制され (Figure 2)、さらに、AGE3 による血管管腔形成促進効果も抑制できることが示された (Figure 3)。次に、AGEs が何を介してエンドサイトーシスされているかを確認するために、膜抗原の非選択的阻害剤である fucoidan を用いた。Fucoidan は、海藻由来の硫酸多糖類であり、現在、がんなどの様々な疾患を改善し得る物質として注目されている。Fucoidan は AGE2 および AGE3 の細胞内取り込みを有意に抑制し (Figure 4)、AGEs による管腔形成促進作用も有意に抑制した。さらに、AGEs のエンドサイトーシスに参与する受容体や膜抗原を特定するために、各種受容体および中和抗体を用いた検討を行った。その結果、CD36/CD163/LOX-1 の 3 種の中和抗体を同時に処置した時のみ、AGE3 による血管新生促進作用は抑制された (Figure 5)。以上の結果から、b.End5 細胞は CD36/CD163/LOX-1 を介したエンドサイトーシスによって AGEs を細胞内へ取り込み、血管新生を誘導してい



る可能性が示された。次に、AGEs の取り込みや血管新生に与与することが知られている NF B および PI3K がこれらの細胞内シグナルとして関与する可能性を考え、検討を行った。その結果、NF B 阻害剤によって、AGE3 の取り込みおよび AGE3 による血管新生の促進は有意に抑制されたが、PI3K 阻害剤は血管新生のみを抑制した (Figure 6, 7)。また、AGE3 処置 15 分後に、NF B の活性化が認められた。このことから、NF B が活性化することで、AGEs は血管内皮細胞内へ取り込まれ、その後、PI3K 経路が活性化することで、血管新生を促進している可能性が示された。

以上の結果から、DAPMs のひとつである AGEs による過剰な血管新生誘導機序の一部が明らかとなった。また、これを抑制する物質として Fucoidan の可能性を見出した。Fucoidan は、食物由来成分で安全性が高いことから、今後の新規血管新生阻害薬の候補物質となることが強く期待できる。この研究は、加齢や糖尿病などで生体内濃度が上昇する事が知られている AGEs による異常な血管新生機序の一部を明らかとし、さらに、新たな機序の血管新生抑制薬の可能性を示すものであり、十分な研究成果が得られたと考えられる。

Figure 6

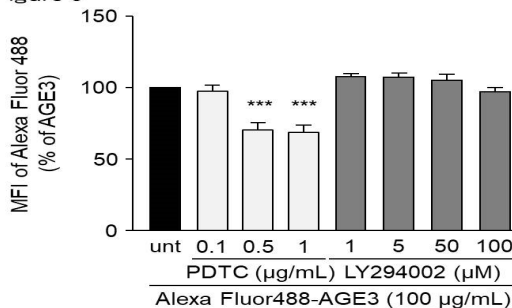
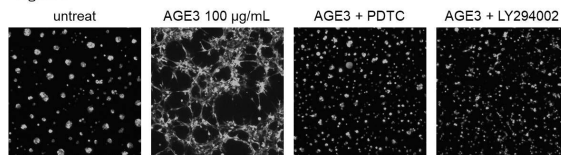


Figure 7



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 山崎 由衣、「The involvement of advanced glycation end products in angiogenesis」, 日本薬理学会第 92 年会、2019 年
- 2) 山崎 由衣、「Advanced glycation end products による血管新生促進機序の解明」, 第 134 回日本薬理学会近畿部会、2018 年
- 3) 山崎 由衣、「Interleukin-18 amplifies M2 polarization of macrophage which leads excessive angiogenesis.」, 日本薬理学会第 91 年会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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。