

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07169

研究課題名(和文) NDRG1がVEGF誘導腫瘍血管新生へ関与する機構の解明と新規がん治療の創出研究

研究課題名(英文) Novel anti-tumor angiogenesis therapeutic strategy by targeting VEGF signaling pathway through N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)

研究代表者

渡 公佑 (Watari, Kosuke)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：90596834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管新生はがんの増大や浸潤や転移などの悪性進展に深く関与している。本研究では、N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)シグナル特異的な制御メカニズムを明らかにし、NDRG1とその関連シグナルを標的とした新規腫瘍血管新生阻害薬の創出研究を目指し研究を行った。その結果、血管内皮細胞におけるNDRG1がVEGF/VEGFR2シグナルの下流因子であるPLCの活性を特異的に制御することで、VEGF誘導の血管新生を促進することを明らかにした。本研究の成果により、NDRG1が抗腫瘍血管新生の新しい治療標的となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)現在臨床応用されている腫瘍血管新生阻害剤はVEGF及びVEGFR2を標的とした抗体薬やマルチキナーゼ阻害剤である。本研究ではNDRG1に着目することで、有用な治療標的であるVEGF特異的なシグナル制御メカニズムを明らかにできる点に大きな特色がある。

(2)病的な血管新生の誘導は、がんのみならず糖尿病性網膜症や関節リウマチなど他の疾病の悪性化にも深く関連している。そのため、本研究で新規VEGFシグナル制御因子としてNDRG1を提示することは、がんを含む様々な疾病の発症や悪性化を予測するバイオマーカーや治療薬の創出にも大きく貢献できると確信している。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key regulator of tumor angiogenesis that is essential for tumor growth and progression. The unraveling of the precise mechanisms behind VEGF-induced tumor angiogenic process will further contribute to development of novel and potent anti-cancer therapeutics. We previously reported that N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) expression levels in cancer cells are closely correlated with tumor angiogenesis and growth, and also that NDRG1 promotes tumor angiogenesis through enhanced VEGF production by tumor-associated macrophages. However, it remains unclear whether NDRG1 expression in vascular endothelial cells (ECs) plays any crucial role in VEGF-A-induced tumor angiogenesis. In our present study, we further ask whether and how NDRG1 in ECs could specifically regulate tumor angiogenesis. We also present our finding of intrinsic importance that NDRG1 functions as an essential factor for VEGF-induced angiogenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：NDRG1 VEGF VEGFR2 PLC 血管新生 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) がん微小環境で誘導される血管新生はがん細胞の生存・増殖、浸潤・転移などの悪性進展に深く関与している。そのため腫瘍血管新生を標的とした治療薬の開発が国内外で活発に進められ、代表的な血管新生促進因子 VEGF やその受容体 VEGFR2 を標的とした抗体薬ベバシズマブやラムシルマブ及びマルチキナーゼ阻害剤レンバチニブなどが既に臨床で使用され、がん治療の向上へ貢献している。しかし、これらは全生存期間を延長できないなど満足のものではない。
- (2) N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) は 4 つの NDRG ファミリー遺伝子の 1 つであり、オンコジーン N-Myc や c-Myc により下方制御され、Ca²⁺関連タンパク (Cap43) としても知られる 43kDa の蛋白質である。NDRG1 はストレス応答や細胞の増殖や分化に関与し、がん細胞での NDRG1 発現は転移や分化とも相関している。我々の研究室では NDRG1 は腫瘍内マクロファージで高発現していることや膵癌、胃癌、肺癌、脳腫瘍、骨肉腫の患者でのがん細胞の NDRG1 発現は血管新生やがんの悪性進展へ関与することを報告してきた。しかし、がん微小環境での NDRG1 の血管新生への関与についてはほとんど明らかにされていない。
- (3) 我々はがん微小環境での NDRG1 の腫瘍血管新生への関与を明らかにする目的で、NDRG1 ノックアウト (KO) マウスを駆使した解析を進め、これまで腫瘍関連マクロファージにおける NDRG1 の血管新生への関与について以下のことを報告した。
NDRG1 KO マウス皮下移植腫瘍では、腫瘍内マクロファージ数が減少した。腫瘍内マクロファージでの VEGF 発現が減少した。新生血管密度及び腫瘍体積が減少した。さらに、NDRG1 が骨転移に重要な役割を担っている破骨細胞への分化を制御していることも明らかにした。
- (4) さらに最近、NDRG1 KO マウスを用いた血管新生モデル系では、代表的な血管新生促進因子の 1 つ FGF-2 刺激による血管新生は野生型マウスと同様に誘導されたが、VEGF 刺激による血管新生は誘導されないことをマウス角膜法や大動脈リングアッセイで観察している。さらに、NDRG1 KO マウスの肺組織より単離した血管内皮細胞では、FGF-2 刺激により下流シグナル因子 ERK の活性化が誘導されるが、VEGF 刺激では ERK の活性化は誘導されないことを観察している。以上の結果より、血管内皮細胞における NDRG1 は VEGF シグナル経路の特異的な制御因子であると考えられる。
- (5) 腫瘍血管新生は、がん微小環境を構成するがん細胞と非がん細胞との相互作用により複雑に制御されている。特に腫瘍関連マクロファージが VEGF を含む血管新生促進因子の産生を担っており、腫瘍血管新生の誘導に重要な役割を担っていることが我々を含む国内外の研究室からも報告されている。これまで我々は、腫瘍血管新生における腫瘍関連マクロファージの役割を明らかにし、血管新生阻害薬の標的としての有効性に関する研究を進めてきた。その結果マクロファージ標的薬が、腫瘍血管新生や転移を著明に抑制することを報告した。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、まず NDRG1 が血管内皮細胞において如何に VEGF シグナル経路を特異的に制御しているかその詳細な分子メカニズムを明らかにする。その結果、NDRG1 やその関連シグナルを標的とすることで VEGF 活性シグナルに加え、がん微小環境での腫瘍関連マクロファージによる VEGF 産生を阻害する新規腫瘍血管新生阻害薬の創出が期待できる。
- (2) さらに NDRG1 は破骨細胞への分化にも関与することから骨転移を含む転移阻害薬の創薬研究も進める。

3. 研究の方法

- (1) マウス角膜法
ヒト VEGF-A (200 ng) 及び FGF-2 (100 ng) をそれぞれ 0.3 µl のハイドロンペレットに封入し、野生型及び NDRG1 KO マウスの角膜に移植した。7 日目に Viewfinder 3.0 を用いて角膜の血管を撮影し定量化した。マウス角膜における血管新生の定量化分析には Image J を用いた。
- (2) 大動脈リングアッセイ
野生型及び NDRG1 KO マウスの大動脈を 1 mm 幅に切り取り、growth factor reduced マトリゲルに封入し、VEGF-A (25ng/ml) 及び FGF-2 (50 ng/mL) を含有した RPMI-1640 培地で 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養した。7 日後に大動脈リングを撮影し、大動脈の切断面から形成した毛細血管の長さと同分岐点数を測定し定量化分析を行った。

- (3) マウス背部皮下法
ミリポアリングの両面をミリポアフィルター(ポアサイズ 0.45 μm)で覆ったチャンバーを用意し、マウス腎癌細胞(RENCA)を 2×10^6 cells/150 μl になるように PBS に懸濁し、チャンバー内に封入した。チャンバーをマウス背部皮下に移植して 5 日後にチャンバーを移植していた皮膚側のリング内を顕微鏡で観察し、長さが 3 mm を超える蛇行彎曲している血管を新生血管としてその数を測定した。
- (4) マウス肺組織からの血管内皮細胞の単離・培養
野生型及び NDRG1 KO マウスより肺を摘出しフェザーを用い細かく切り刻んだ。その後 0.5% collagenase L、20unit/ml Dnase 含有の PBS 中で 37、60 分間湯浴で混和した。1600rpm で 10 分間遠心した。上清を破棄し、ペレットを 5%FBS 含有の Endothelial Growth Media-2 Microvascular (EGM-2MV) 培地で懸濁し 型コラーゲンでコートしたディッシュに播種した。4 から 6 日間培養後、0.05%トリプシン/EDTA を添加し、細胞を剥離した。1000rpm で 5 分間遠心し、上清を破棄し、磁気標識抗 CD31 抗体を 10 μl 添加し 4 で 15 分間浸した後に、MACS バッファー 5ml を加え 1000rpm で 5 分間遠心した。上清を破棄し、ペレットを MACS バッファーで懸濁し 25LS カラムにて単離を行った。単離した細胞を 15%FBS 含有 EGM-2MV 培地で 4 から 6 日間培養した。再び磁気ビーズを用いて CD31 陽性細胞の単離を同様に行い、単離した細胞を 15%FBS 含有の EGM-2MV 培地で培養し血管内皮細胞として用いた。

4. 研究成果

我々はこれまでに N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) ノックアウト (KO) マウスではがん細胞皮下移植実験で、腫瘍関連マクロファージの浸潤数と VEGF 発現量の低下と共に、腫瘍内での新生血管密度と腫瘍体積が減少することを観察している。これらは、がん微小環境での NDRG1 発現が、がん血管新生と密接に関与していることを示唆している。そこで本研究では、がん微小環境における NDRG1 のがん血管新生への詳細な関与とメカニズムを明らかにし、新規がん血管新生阻害治療を提示することを目的に以下の研究を進めた。

(1) NDRG1 は VEGF 誘導の血管新生を特異的に促進する。

まず我々は、NDRG1 KO マウスを用い宿主 NDRG1 が代表的な血管新生促進因子である VEGF 及び FGF-2 誘導の血管新生に関与するかどうかについて検討を行った。その結果、野生型マウスと比較して NDRG1 KO マウスでは、

マウス角膜法における VEGF 誘導の血管新生が有意に減少した。一方、FGF-2 刺激による血管新生は野生型マウスと同等に誘導された。

マウス背部の大動脈を採取し、大動脈切断面からの VEGF 及び FGF-2 誘導の血管新生能を比較検討したところ、VEGF 誘導の血管新生能は有意に低下していたが、FGF-2 誘導の血管新生能は野生型と同等であった。

VEGF 高産生がん細胞を用い、マウス背部皮下法によりがん細胞誘導の血管新生能を比較検討したところ、NDRG1 KO マウスではがん細胞誘導の血管新生能が有意に低下していた。

以上の結果より、宿主 NDRG1 は VEGF 誘導の血管新生を特異的に制御していることが明らかとなった。

(2) 血管内皮細胞における NDRG1 は、VEGF / VEGFR2 シグナルの活性化を促進する。

NDRG1 が VEGF 誘導の血管新生に特異的に関連していたため、我々は血管内皮細胞における NDRG1 の VEGF 刺激時の血管新生亢進シグナルへの関与について、野生型及び NDRG1 KO マウスの肺組織より血管内皮細胞マーカー CD31 抗体磁気ビーズを用いて採取した血管内皮細胞を用いて検討を行った。

その結果、NDRG1 KO マウス由来の血管内皮細胞では、

VEGF 刺激時に、VEGF / VEGFR2 の下流シグナル因子である ERK のリン酸化が有意に低下していた。

VEGFR2 の発現量及び活性化(リン酸化、細胞内移行等)に差は見られなかった。

VEGF 刺激時に誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が有意に低下していた。

VEGF / VEGFR2 シグナルを細胞内へと伝達するのに重要な因子である PLC γ のリン酸化が有意に低下していた。

以上の結果より、血管内皮細胞における NDRG1 は VEGF 刺激による VEGFR2 下流シグナルの活性化に重要な促進因子であることが示唆された。上記の結果はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた NDRG1 発現抑制系でも同様の結果が得られた。

(3) 血管内皮細胞における NDRG1 は PLC γ と結合し、PLC γ の活性化を介して VEGF 誘導の血管新生を促進する。

PLC γ は VEGF 刺激により細胞内へと移行した活性型 VEGFR2 と結合し、リン酸化される。リン酸化された PLC γ は細胞膜上に存在するホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP $_2$) をジアシルグリセロール (DAG) 及びイノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (IP $_3$) へと分解し、産生された DAG や IP $_3$ は細胞内 Ca $^{2+}$ の上昇や ERK シグナルの活性化を誘導するため、PLC γ は VEGF 刺激を細胞内シグナルへと伝達する重要な因子となる。そこで次に NDRG1 が PLC γ を介して VEGF/VEGFR2 シグナルを制御しているか否かを明らかにするため、HUVEC を用いた siRNA による NDRG1 発現抑制系を用いて検討を行った。その結果、

VEGF 刺激による HUVEC での細胞膜、細胞質、核での NDRG1 及び PLC γ の発現量の変化を検討したところ、NDRG1 及び PLC γ 共に VEGF 刺激によりリン酸化 PLC γ が局在する細胞膜での発現量が増加していた。

血管内皮細胞内での NDRG1 と PLC γ が結合しているか否かを、それぞれを特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降法により検討を行ったところ、NDRG1 と PLC γ の結合が観察された。

NDRG1 と PLC γ の結合部位を明らかにするため、NDRG1 の欠失変異体を用いた Pull down アッセイを行ったところ、NDRG1 の C 末端のリン酸化部位の欠失変異体は PLC γ とは結合しなかった。

HUVEC 内で NDRG1 と PLC γ の複合体が、VEGF 刺激により細胞膜へと移行するか否かを検討するため近接ライゲーションアッセイ (PLA) を行った。その結果、NDRG1 と PLC γ 複合体は、VEGF 刺激により細胞膜へと移行した。

NDRG1 による PLC γ の活性亢進が VEGF 誘導の血管新生に必須であるか否かを検討するため、マウス角膜法を用いて VEGF 刺激による血管新生誘導時の PLC γ 阻害剤の効果を検討した。その結果、PLC γ 阻害剤投与群では、NDRG1 KO マウスと同様に VEGF 誘導の血管新生が有意に抑制された。

以上の結果より、NDRG1 は血管内皮細胞内で PLC γ と複合体を形成しており、VEGF 誘導の PLC γ の活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、NDRG1 により制御されている PLC γ の活性化は VEGF 誘導の血管新生に必須であることも明らかとなった。

(4) がん患者腫瘍内において、NDRG1 は血管内皮細胞で高発現していた。

最後に、ヒト腫瘍内で、NDRG1 がどのような細胞で発現しているかを検討するため、乳癌患者 5 名のサンプルを用い検討を行った。NDRG1 と血管内皮細胞マーカーである CD34 との共染色を行った結果、NDRG1 は腫瘍内の血管内皮細胞で高発現していることが観察された。

以上の結果より、NDRG1 はヒト腫瘍内の血管内皮細胞で高発現しており、PLC γ を介して VEGF/VEGFR2 シグナルの活性化を亢進し、VEGF 誘導のがん血管新生に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Hiroshi, Watari Kosuke, Shibata Tomohiro, Miyamoto Tomofumi, Murakami Yuichi, Nakahara Yukiko, Izumi Hiroto, Wakimoto Hiroaki, Kuwano Michihiko, Abe Tatsuya, Ono Mayumi	4. 巻 80
2. 論文標題 Bidirectional Regulation between NDRG1 and GSK3 Controls Tumor Growth and Is Targeted by Differentiation Inducing Factor-1 in Glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-0438	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 該当する

1. 著者名 Watari Kosuke, Shibata Tomohiro, Fujita Hideaki, Shinoda Ai, Murakami Yuichi, Abe Hideyuki, Kawahara Akihiko, Ito Hiroshi, Akiba Jun, Yoshida Shigeo, Kuwano Michihiko, Ono Mayumi	4. 巻 3
2. 論文標題 NDRG1 activates VEGF-A-induced angiogenesis through PLC 1/ERK signaling in mouse vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s42003-020-0829-0	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kosuke Watari, Tomohiro Shibata, Ai Shinoda, Hideyuki Abe, Akihiko Kawahara, Yuichi Murakami, Eiji Oki, Jun Akiba, Yoshihiko Maehara, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono
2. 発表標題 N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is indispensable for VEGF-A-induced tumor angiogenesis through PLC /ERK signaling activation in vascular endothelial cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、河原明彦、村上雄一、桑野信彦、小野眞弓
2. 発表標題 血管内皮細胞のNDRG1はPLC 1活性を介してVEGF誘導の血管新生を特異的に制御し、がん血管新生抑制治療の新しい標的となる
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるNDRG1はVEGFR2/PLC 1シグナルを制御し、がん血管新生と転移を亢進する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、篠田あい、藤田英明、河原明彦、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 血管内皮細胞のNDRG1はPLC 1を介してVEGFR2/ERKシグナルを特異的に活性化し、VEGF誘導の血管新生を促進する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Watari, Tomohiro Shibata, Hiroshi Nabeshima, Akihiko Kawahara, Yuichi Murakami, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono
2. 発表標題 NDRG1 is indispensable for VEGF-A-induced tumor angiogenesis by PLC /ERK signal activation in vascular endothelial cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、河原明彦、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 血管内皮細胞のNDRG1はPLC 1活性を介してVEGF誘導の血管新生を特異的に制御し、がん血管新生抑制治療の新しい標的となる
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるNDRG1はVEGFR2/PLC 1シグナルを制御し、がん血管新生と転移を亢進する
3. 学会等名 第27回 日本がん転移学会 学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、鍋島弘嗣、河原明彦、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるNDRG1はVEGF-A誘導のPLC /ERKシグナルを活性化し、がん血管新生を促進する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、河原明彦、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 NDRG1による血管内皮VEGF/VEGFR2シグナルの特異的制御 - がん血管新生標的治療の創出を目指して
3. 学会等名 第21回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 NDRG1はがん血管新生と転移を亢進する 血管内皮細胞VEGF/VEGFR2シグナル活性の新しい制御
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡公佑、柴田智博、鍋島弘嗣、河原明彦、村上雄一、桑野信彦、小野真弓
2. 発表標題 NDRG1は血管内皮細胞におけるVEGF/VEGFR2シグナルを特異的に活性化しがん血管新生と転移を促進する
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----