

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15236

研究課題名(和文) In vitro/in vivoスクリーニングによるVEGFA転写抑制分子の探索

研究課題名(英文) Exploring the transcriptional repressors of VEGFA by in vitro/in vivo high throughput screening

研究代表者

村松 智輝 (Muramatsu, Tomoki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：90732553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：400種類の化合物を搭載したライブラリーを用いて、VEGFAの発現を抑制する候補化合物を複数同定した。候補化合物のほとんどは同一のシグナルを抑制する機能を持ち、現在までにVEGFAの転写を抑制する報告はほとんどない。候補化合物は、VEGFAの発現を減少させ、血管内皮細胞の管腔形成を抑制した。さらに、ニワトリ胚を用いた血管新生アッセイにおいても候補化合物処理により、血管新生を阻害した。さらに、遺伝子発現アレイ解析により、候補化合物の作用点の同定を行った。現在、詳細な分子メカニズムの解析を行っているが、同定した候補化合物は、がん治療における新規血管新生阻害剤の可能性を持つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における血管新生阻害治療は、既に臨床応用されており、着実に成果を上げているが、薬剤耐性の獲得、副作用、患者の層別化など多くの課題が残っている。上記課題を克服するためには、血管新生阻害剤の種類を増やすこと、詳細な血管新生機構を理解することが重要である。本研究では、血管新生に重要な遺伝子であるVEGFAの転写発現を抑制する新規血管新生阻害剤の同定を行った。本研究の成果は、新規VEGFA転写抑制化合物を見出し、血管新生阻害効果を明らかにしたことである。今後、化合物処理による分子メカニズムを明らかにすることで、血管新生における新規知見の発見、最終的には治療薬開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis in cancer contributes to transferring cancer cells to the other organs via new blood vessels. In the present study, we used chemical compound libraries containing 400 compounds for identification of novel transcriptional inhibitors of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), a major regulator of angiogenesis. We first evaluated the expression of VEGFA using qRT-PCR after treatment with each compound and extracted some candidate compounds as VEGFA transcriptional inhibitors. Interestingly, almost all of these compounds can inhibit the same signaling pathway. We next confirmed that these compounds could inhibit the tube formation of endothelial cells and angiogenesis in chicken embryo. Moreover, we performed gene expression array with several samples treated with each candidate compound for identification of target genes. Our findings suggest that these compounds might have the potential of anti-angiogenic therapy for cancer.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：VEGFA 血管新生 がん転移 ニワトリ胚

1. 研究開始当初の背景

がんは、本邦において2人に1人が罹患し、3人に1人はがんを起因として亡くなる。特に、がん転移は、がん悪性化の最たる要因であり、そのメカニズムの解析ならびに抑制することは喫緊の課題である。現在までに、様々な研究によってがん転移のメカニズムは明らかになってきているが、依然不明な点は多く残されている。一般的にがん転移は、原発巣での増殖から始まり、間質への浸潤、血管内漏出、標的臓器近傍における血管外漏出、転移巣での再増殖という一連の流れによって生じると考えられている。しかし、近年、申請者の所属していた The Scripps Research Institute の Dr. Quigley 研究室では、ニワトリ胚とマウスを用いてがん転移の初期におけるイベントには、腫瘍周囲の間質へのがん細胞の浸潤と同時に、腫瘍内部の血管新生およびその未熟な血管内へのがん細胞の浸潤が転移を促進させることを明らかにした。つまり、腫瘍内部の新生血管は、細胞間接着が弱くがん細胞が浸潤し易いという特徴を持っている。このがん転移における新たなメカニズムは、がん細胞の浸潤能を抑制しただけでは、転移を防ぐことは難しく、血管新生をも抑制しなくてはならないことを示唆している。現在までの研究では、どのように腫瘍内部のがん細胞が、血管内皮細胞をリクルートし、浸潤していくのか不明な点が多い。しかし、血管新生とがん転移には密接な関係があり、この事象を解析することはがん治療にとって有益なことは明白である。そこで、申請者は血管新生に深く関与している Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) の生物学的機能に着目して解析を行う。VEGFA は、血管内皮細胞の VEGF 受容体 1, 2 に結合することによって、血管新生を促進させる働きを持つ。現在、VEGFA 阻害剤の代表的なものとしてベバシズマブが大腸がんなどを対象に臨床応用されており、一定の成果を挙げている。また、ソラフェニブ、スニチニブ等のマルチキナーゼ阻害剤も臨床応用されており、血管新生阻害による治療効果は実証されている。しかし、ある一定の確率で上記薬剤は、副作用が出てしまうことやがん細胞が耐性を獲得してしまうことがあるため、薬剤の選択肢を増やすためおよびパーソナルメディシンに対応するためにも新規の血管新生阻害分子の同定が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、化合物ライブラリーを用いて血管新生に重要な因子である VEGFA の転写活性を抑制する化合物を同定することを目的とする。また、上記スクリーニングから抽出した化合物を用いてニワトリ胚を用いた血管新生阻害評価を行い、確度の高い二次スクリーニングを行う。最終的に、同定した化合物による細胞内シグナル変化を網羅的遺伝子発現アレイ解析から見出す。

3. 研究の方法

I. VEGFA 転写抑制化合物の探索

400 種類の化合物を搭載した化合物ライブラリーと口腔扁平上皮がん細胞株 (HOC313-LM) を用いて、VEGFA の発現解析を行う。HOC313-LM は、親株である HOC313 から *in vivo* selection によって樹立した高転移性を有する細胞株である。発現解析は、各薬剤を処理した後、RNA サンプルを回収し、定量 RT-PCR で解析を行う。上記絞り込みの後、VEGFA の転写を抑制する可能性がある化合物を抽出し、低酸素条件下においても VEGFA の発現を抑制するかどうかの検討を行う。

II. 候補化合物の二次スクリーニングとがん細胞の浸潤能および血管新生阻害の検討

抽出した候補化合物の血管新生阻害活性を検討するため、血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、管腔形成アッセイを施行する。その後、血管新生阻害活性を認めた化合物を用いて、ニワトリ胚を用いた移植実験を行いがん細胞の浸潤、血管新生の阻害効果を評価する。

III. 抽出した化合物添加によるの細胞内シグナル解析

抽出した化合物の細胞内シグナルを網羅的に探索するため遺伝子発現アレイ解析を施行し、標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

申請者は、*VEGFA* の転写制御に着目して解析を行ってきた。高転移性口腔扁平上皮がん細胞株 (HOC313-LM) と 400 種類の化合物ライブラリーを用いて、*VEGFA* の転写を抑制する化合物を探索した (図 1A)。その結果、*VEGFA* の転写を 40% 以上抑制する化合物を 6 種類抽出した (未発表データのため化合物名は伏せる)。興味深いことに、これら 6 種類の化合物は、全て同一の細胞内シグナルを標的とした阻害剤であった。

スクリーニングの結果を踏まえ、6 種類の候補化合物が、低酸素条件下においても *VEGFA* の転写を抑制するかを検討したところ、低酸素条件下においてもコントロールと比較し、*VEGFA* の転写を抑制していた (図 1B)。さらに、*VEGFA* のタンパク質の量も ELISA 法によって検討したところ、候補化合物の添加により培養液中の *VEGFA* の量も減少することが明らかとなった (図 1B)。次に、血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、候補化合物が管腔形成を阻害するかを検討したところ、全ての化合物で管腔形成が阻害された (図 2)。さらに、ニワトリ胚を用いた血管新生アッセイを施行し、*in vivo* における候補化合物の血管新生阻害効果を検討した。現時点において、Compound E のみの結果となるが、血管新生を阻害することが明らかとなった (図 3)。現在、他の候補化合物においてもアッセイの準備を行っている。また、血管新生阻害効果を認めた化合物から順次、担癌マウスを用いたがん治療実験を施行する予定である。

一方で、上記の通り、候補化合物は同一のシグナル経路を阻害することがわかっているが、*VEGFA* の転写に関

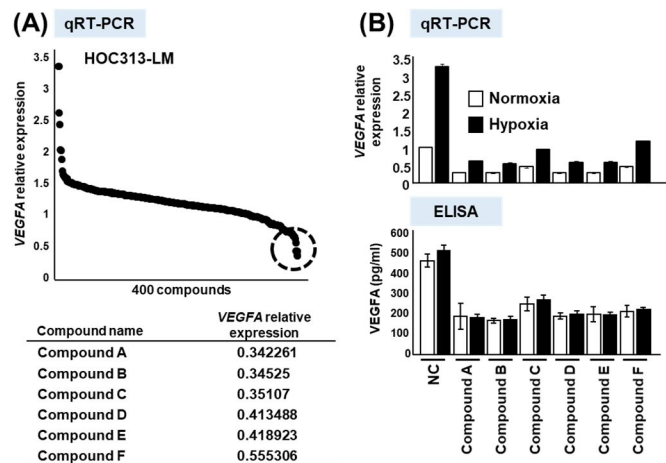


図1: これまでの研究結果: (A) 化合物ライブラリー (400種類) から *VEGFA* の転写を抑制する化合物の探索 (B) 候補化合物による *VEGFA* の発現抑制

Tube formation assay

HOC313-LM

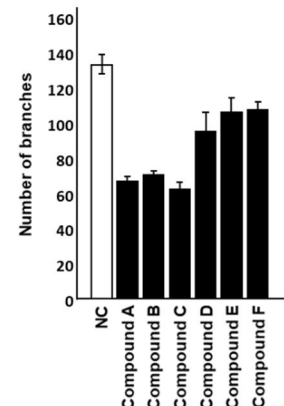
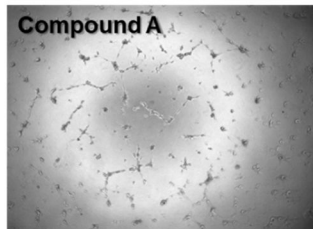
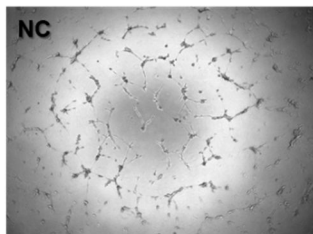


図2: 血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた管腔形成アッセイ
左図: Compound A を添加した際の管腔形成アッセイの写真
右図: 管腔のブランチを定量化

与する明確な標的遺伝子は不明である。候補化合物が標的とするドメインを持つ遺伝子はヒトにおいて 50 弱同定されており、その中でもがん細胞で発現があるものに絞り込み、siRNA によるスクリーニングを施行した。その結果、*VEGFA* の転写に関する可能性のある遺伝子 (*Gene A*) の絞り込みに成功した (図 4) (未発表データのため遺伝子名は伏せる)。

Gene A は、ヒストンの修飾に関する

遺伝子であった。さらに、候補化合物処理による、網羅的な細胞内シグナル経路を明らかにするべく、遺伝子発現アレイを施行した (図 5)。解析に用いたサンプルは、化合物を処理した後、通常酸素下および低酸素下で培養したものを使用した。その結果、*VEGFA*をはじめ、低酸素下で発現誘導されることが知られている *ANGPTL4*, *CXCR4*, *CA9* などの発現も候補化合物の添加により、発現が抑制されることがわかった。したがって、本研究で抽出した *VEGFA* 転写抑制候補化合物は、*VEGFA* だけではなく、低酸素で誘導される遺伝子に関する転写抑制効果があることが示唆される。現在、siRNA スクリーニングによって同定した *Gene A* の機能解析を施行しており、*Gene A* のノックダウンにより、*ANGPTL4* などの発現が低酸素下で抑制されることがわかってきている。今後、候補化合物を用いたマウス治療実験において血管新生の抑制に伴う腫瘍増殖抑制効果の検討を行うとともに、*Gene A* の詳細な解析を施行することにより、*Gene A* を標的とした新たながん治療法の確立を目指していく。

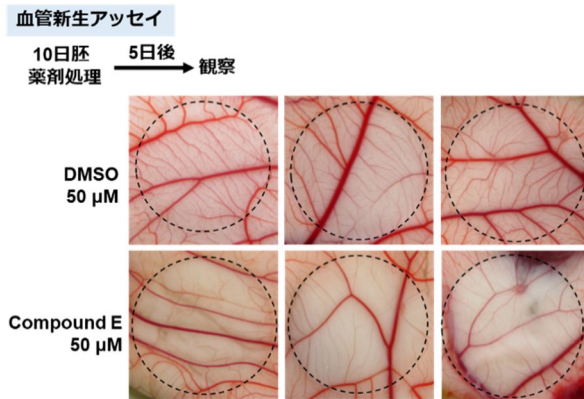


図3: ニワトリ胚を用いた血管新生アッセイ
点線は、ガラスを置いた領域を示す

qRT-PCR

HOC313-LM
72 h after treatment with each siRNA

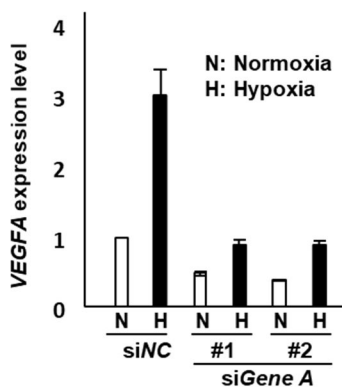


図4: siGene Aによる*VEGFA*の発現レベル

遺伝子発現アレイ解析

HOC313-LM
Treatment with each compound (1 μM) for 24 hours
Hypoxia for 8 hours

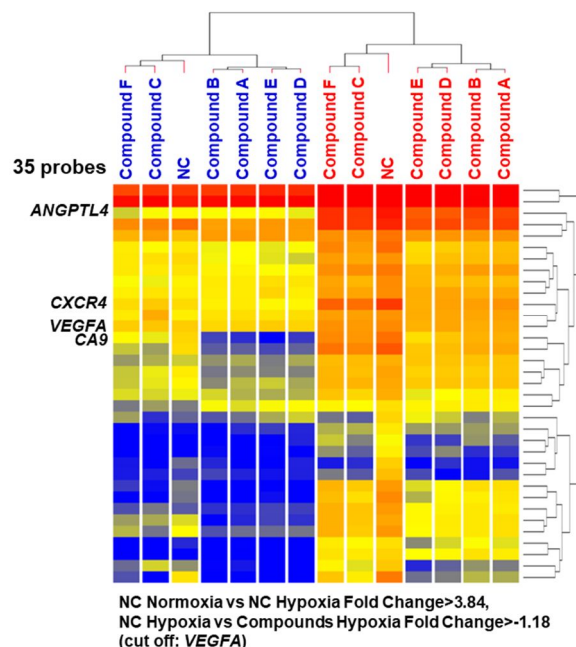


図5: 網羅的遺伝子発現アレイ解析の結果
青文字は通常酸素下、赤字は低酸素下での培養サンプルを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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