

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590399

研究課題名 (和文)

血管内皮細胞表面分子の内在化誘導による阻害

研究課題名 (英文)

Inhibition of an endothelial cell surface molecule by its internalization.

研究代表者

榑崎 雅司 (NARAZAKI MASASHI)

大阪大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00467573

研究成果の概要 (和文)：

Neuropilin-1 (NRP1)は細胞表面の VEGF、Sema3A 受容体である。スカベンジャー受容体のリガンドである、硫酸デキストラン、フコイダンや、poly G、oligo G などの分子が、NRP1 を細胞表面から内在化させ、VEGF、Sema3A の結合や機能を阻害することを示した。しかし、polysaccharide や poly、oligo A、T、G には作用はなかった。こうした分子を「くり込み薬」と呼び、新しい阻害剤として開発する。

研究成果の概要 (英文)：

Neuropilin-1 (NRP1) is the cell surface receptor shared by Sema3A and VEGF₁₆₅. We showed that certain scavenger receptor ligands, sulfated polysaccharides including dextran sulfate, fucoidan, poly(G) and oligo G, induced internalization of endothelial cell-surface of NRP1 and blocked the binding and in vitro function of Sema3A and VEGF₁₆₅. Polysaccharides, poly or oligo (A), (T), (C) did not share this property. Administration of fucoidan or oligo G to mice reduced VEGF₁₆₅-induced angiogenesis in vivo. These results identify certain sulfated polysaccharides and oligo G as inducers of internalization and functional inhibition of NRPI, and provide poof-of-principle that engineered receptor internalization is an effective strategy for reducing levels and function of cell-surface receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：血管新生、受容体、発現制御、血管内皮細胞、Neuropilin、内在化、薬理学

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の1位は癌である。癌の増大には必ず血管の新生を伴い酸素と栄養の

供給を受け、個体が致死となるまで増大していく。多様な組織から由来する癌細胞は様々な遺伝子変異を有し多様性に富むが、それを

栄養していく新生血管は健常血管内皮細胞から生じている。そこで、腫瘍内血管新生を抑制する治療戦略は種々多様な癌の増大に対し共通して有効 (Folkman J.: J Natl Cancer Inst 1990;82:4, Narazaki M, Tosato G: J Natl Cancer Inst. 2006;98:294) と考えられ、この分野の研究進展は大きな意義を持つだろう。

血管新生は癌の増大に寄与する以外に、加齢黄斑変性症や慢性炎症の病態にも重要な役割を果たしている。血管新生因子の一つ VEGF に対する阻害抗体 (bevacizumab) が臨床の現場に登場し、「VEGF の発見と抗 VEGF 抗体による加齢黄斑変性症の治療」に対して Dr. N. Ferrara 博士が 2010 年度の米国ラスカー賞を受賞している。また、bevacizumab による血管新生の抑制は「兵糧攻め」として大腸癌、非小細胞肺癌、乳癌に対して、化学療法との併用下で治療薬として認可されており、血管新生抑制薬は血管新生を伴う様々な疾患において治療戦略の一つとして活発な研究がなされている。

しかし、残念ながら bevacizumab 単独による治療では抗癌効果が弱いのが現状である。VEGF 以外の血管新生因子の関与や、モデル動物を用いた癌の異所性移植による癌と、実際のヒトでの癌は腫瘍環境等が異なるとも言われており、新しい抗血管新生薬の開発が待たれている。

2. 研究の目的

一般に細胞表面の受容体に結合したサイトカインなどのリガンドは、受容体を介して信号を細胞内に伝達すると同時に受容体を内在化させ細胞表面から消失させる。受容体の細胞内内在化はリガンドからの信号を負に制御する生理的反応と考えられている。研究代表者はこの内在化現象を人工的に起こすことにより細胞表面から受容体を消失させる薬を、「表面分子をつぎつぎに入らせる薬」という意味で「くり込み薬」(internalization inducer) と名付けて開発を進めている。血管内皮細胞表面から血管新生に重要な分子が消え去ることによって、血管新生を阻害するという戦略である。その結果、血管新生を伴う癌の増大や、網膜疾患、慢性炎症疾患に伴う病的血管新生を抑えられないかを検討する。

3. 研究の方法

血管内皮細胞表面に存在する受容体は可溶性リガンドによって刺激を受け取ることにより、調和のとれた血管新生を担っている。血管内皮細胞に作用する典型的な可溶性血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) と、血管内皮細胞制御分子 Semaphorin 3A (Sema3A) は Neuropilin1 (NRP1) を共通の受容体として利用する (Klagsbrun M.: Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:535)。信号伝達鎖はそれぞれ VEGF receptor、Plexin と別々の分子を用いるため、たとえ受容体を共用していても異なった信号が細胞内に伝えられる。これまで研究代表者は、異なった作用を持つ二つのリガンド (VEGF, Sema3A) に対する共通受容体 (NRP1) の使用優先権の決定機構を解析してきた。その結果、先に共通受容体 NRP1 に結合したリガンドが NRP1 を内在化させ、その結果細胞表面から NRP1 が消失することによって、他方のリガンドが共通受容体を利用できなくなり、その信号が伝わらなくなることを明らかにした (Narazaki M, Tosato G. Blood 2006;15:3892)。

これらの研究を通して、細胞表面の受容体を内在化させリガンドに対して門戸を閉じるという血管内皮細胞が元来持っている生理的機構を人工的に誘導してやることであれば、血管内皮細胞上の受容体を抑制的に制御できるであろうという独創的なアイデアを研究代表者は持った。

4. 研究成果

平成 20 年は、NRP1 は硫酸多糖類の一つであるヘパリンを結合させる受容体であることが知られている。研究代表者はヘパリンに類似した硫酸多糖類構造物の NRP1 に対する作用をスクリーニングする過程で、ある種の硫酸多糖類は細胞表面に発現する NRP1 と相互作用し、NRP1 分子を細胞表面から細胞内 lysosome 分画へと局在変化させることを見いだした。この際、硫酸多糖類は血管内皮細胞上の NRP1 とスカベンジャー受容体を架橋し、スカベンジャー受容体に引き連れられて内在化が生じるという機構を提唱している。スカベンジャー受容体を持たない細胞では NRP1 の内在化は生じず、NRP1 とスカベンジャー受容体両方を同時に発現している血管内皮細胞に比較的選択的

に作用することを明らかにした。実際、内在化によって表面からNRP1が消失した結果、そのリガンドであるVEGFやSema3Aの血管内皮細胞表面への結合が減少していた。さらにin vivo での実験として硫酸多糖類投与下ではVEGFによって誘導される新生血管が阻害されることをマトリゲルアッセイを用いて示した。また、MOPC315細胞株をBALB/cマウスに移植して、硫酸多糖類を腹腔内投与すると、コントロール多糖類投与群と比べて腫瘍内部のCD31陽性血管内皮細胞の減少と、腫瘍径、腫瘍重量の減少を認め、in vivo腫瘍モデルでも硫酸多糖類が抗血管新生作用を示し、さらに抗腫瘍作用を有することを証明した。

平成 21、22 年度には、様々な分子を検討し、ある配列の核酸が「くり込み薬」として作用することを見いだした。poly G や oligo G などのグアニン繰り返し配列を持つ人工合成核酸が NRP1 の細胞外領域と Kd=1.3nM で結合し、細胞表面の NRP1 分子を内在化させ、内在化した NRP1 が oligo G と共存していることを共焦点顕微鏡にて確認した。コントロールで用いた Poly A、poly C、oligo A、oligo C、oligo T などにはこうした作用は見られず、guanine 重合体に特異的な作用だった。oligo G 存在下では 37 度 1 時間後には細胞表面の NRP1 レベルは 90%消失し、本来の ligand である VEGF や Sema3A の血管内皮細胞表面への結合が阻害されることを binding assay にて示した。しかし、NRP2、gp130、CD31 等の表面分子のレベルには影響は与えず、ある標的特異性を持っていることが分かった。さらに、血管内皮細胞を oligo G で処理した後では、VEGF 刺激による VEGF 受容体のチロシンリン酸化、VEGF による血管内皮細胞の遊走刺激、細胞増殖なども阻害されることを確認した。また、レーザー照射にて障害を与えた後の網膜新生血管領域を観察する系にて、oligo G を投与した眼球では網膜の新生血管が阻害されることを示した。阻害の程度は陽性コントロールとして使用した抗 VEGF 抗体とほぼ同等であった。oligo G に対するコントロールで用いた oligo A は網膜新生血管には影響しなかった。

細胞表面分子を人工的に内在化させる例を呈示し、「くり込み薬」と名付け、新しい阻害剤として今後も進展させて行きたい。また、本研究にて抗血管新生作用を確認した

oligo G は容易に大量に人工合成でき、in vitro で確認した範囲では細胞毒性も比較的 low、今後抗血管新生作用薬としての展開が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Narazaki M, Segarra M, Hou X, Tanaka T, Li X, Tosato G. Oligo-guanosine nucleotide induces neuropilin-1 internalization in endothelial cells and inhibits angiogenesis. (査読あり) Blood. 2010 116(16):3099-107

(2) Narazaki M, Segarra M, Tosato G. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF165 and semaphorin3A. (査読あり) Blood. 2008 111(8):4126-36.

(3) Narazaki M, Segarra M, Tosato G. Neuropilin-2: a new molecular target for antiangiogenic and antitumor strategies. (査読なし) J Natl Cancer Inst. 2008 100(2):81-3

[学会発表] (計 1 件)

(1) Narazaki M, Segarra M, Tanaka T, Tosato G. Ligands for scavenger receptor identified as inducers of Neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF165 and Sema3A. Keystone Symposia Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer 2009年1月8日 Big Sky Resort, Montana, USA

[その他]

ホームページ等

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab_2/page6/kurikomi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑崎 雅司 (NARAZAKI MASASHI)
大阪大学大学院医学系研究科 助教
研究者番号：00467573

(2) 研究分担者

田中 敏郎 (TANAKA TOSHIO)
大阪大学大学院医学系研究科 准教授
研究者番号：40273651
緒方 篤 (OGATA ATSUSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90309451

(4) 研究協力者

GIOVANNA TOSATO
NATIONAL CANCER INSTITUTE / NATIONAL
INSTITUTE OF HEALTH, USA.
PRINCIPAL INVESTIGATOR

MARTA SEGARRA
NATIONAL CANCER INSTITUTE / NATIONAL
INSTITUTE OF HEALTH, USA.
FELLOW

XU HOU
NATIONAL EYE INSTITUTE / NATIONAL
INSTITUTE OF HEALTH, USA.
FELLOW

XURI LI
NATIONAL EYE INSTITUTE / NATIONAL
INSTITUTE OF HEALTH, USA.
PRINCIPAL INVESTIGATOR