

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08675

研究課題名(和文) endoglinを標的とした血管肉腫に対する新規治療法

研究課題名(英文) Endoglin as therapeutic target in angiosarcoma.

研究代表者

梶原 一亨 (Kajihara, Ikko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90433036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1)血管肉腫患者組織および培養細胞株ではendoglinが過剰発現していたこと、2)血管肉腫はTGF- $\beta$ 刺激により誘導される過剰なendoglin発現により進展すること、3)Endoglin阻害により細胞数の減少及びアポトーシスの増加、遊走能・浸潤能低下、管腔形成能及びWarburg効果の抑制を認めること、4)血管肉腫におけるendoglinの阻害は、Smad非依存性TGF- $\beta$ シグナル伝達の調節を通じて抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。endoglinは、血管肉腫の新規治療標的になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管肉腫は、標準治療が確立されておらず、難治性の肉腫である。進行例では、化学療法が主体となるが、未だ有効な治療法が確立されていない。そのために、血管肉腫に対する新規治療の開発は急務である。今回、endoglin阻害による血管肉腫の抗腫瘍効果およびその分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Endoglin acts as a coreceptor for TGF- $\beta$  signaling and is overexpressed in tumor-associated endothelial cells and enhances tumor angiogenesis. Here, we investigated the role of endoglin in the pathogenesis of angiosarcoma and whether endoglin inhibition results in antitumor activity. Endoglin was overexpressed in angiosarcoma, and its inhibition was effective in promoting apoptosis and the suppression of migration, invasion, tube formation, and Warburg effect in angiosarcoma cells. Knockdown of endoglin activated caspase 3/7 that is essential for apoptosis, reduced survivin levels, and decreased paxillin and vascular endothelial cadherin phosphorylation and matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 activities in angiosarcoma cells. Although endoglin is a coreceptor that regulates TGF- $\beta$  signaling, the antitumor effect of endoglin in angiosarcoma was not based on Smad signaling regulation but on non-Smad TGF- $\beta$  signaling.

研究分野：Dermatology

キーワード：angiosarcoma endoglin TGF-beta

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血管肉腫は、年間発生率が100万人あたり1.4人と非常に希少であり、5年生存率は約20%と極めて予後不良な悪性腫瘍である。高齢者に多いため毒性の強い抗癌剤が選択し難く、希少な悪性腫瘍であり大規模臨床試験が困難なため、新規治療開発が進まない。公的研究機関がこのような 'forgotten disease' に対する病態解明および新規治療開発の研究基盤の確立に積極的に関与していく必要がある。

TGF- $\beta$  シグナル伝達経路は細胞増殖・分化などを制御する上で重要な役割を担い、悪性腫瘍の進展にも寄与する。大腸癌や膵臓癌では、TGF- $\beta$  受容体やシグナル分子の発現異常や遺伝子変異が癌化の要因とされる。また、癌細胞が産生する TGF- $\beta$  が腫瘍微小環境に作用し、細胞外マトリックスの蓄積、血管新生、免疫抑制や上皮間葉移行などを誘導する。TGF- $\beta$  シグナル経路による血管新生は血管内皮細胞上に存在する2種類の TGF- $\beta$  I型受容体(ALK1, ALK5)により主に調節される。TGF- $\beta$  /ALK1/Smad1/5 経路は血管内皮細胞の増殖・遊走を促進する血管新生促進因子として、TGF- $\beta$  /ALK5/Smad2/3 経路は血管新生抑制因子として機能する。さらに近年、TGF-

による血管内皮細胞の間葉系細胞への移行(内皮間葉移行(EndoMT endothelial-to-mesenchymal transition))が注目されており、細胞間接着に必要な VE-cadherin などの減少/間葉系マーカーの発現増加に基づく遊走能亢進、MMP-2 発現上昇などに基づく浸潤能亢進が誘導される。

TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の中でも、T RIII のひとつである endoglin は血管内皮細胞特異的に発現し、血管新生亢進時に強発現する。また endoglin は TGF- $\beta$  /ALK1/Smad1/5 経路を亢進・TGF- $\beta$  /ALK5/Smad2/3 経路を抑制することで、血管新生を制御している。

多数の悪性腫瘍にて in vitro/in vivo での endoglin 阻害による抗腫瘍効果が報告されており、また抗 endoglin 抗体の臨床試験が、腎臓癌をはじめとする悪性腫瘍において進行中である。現在のところ、重篤な有害事象のために治験中止となった報告はなく、安全性に関しては担保されている。多くの悪性腫瘍と TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関する報告がある一方、血管肉腫における役割は解明されていないため、本研究により病態解明および新規治療に結びつけることが出来る。

### 2. 研究の目的

血管肉腫における endoglin を中心とした TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の発癌・癌浸潤・癌転移における作用機構を解明することによって、新たな分子標的療法の開発や診断・予後の判定のための基礎的知見が得られる。血管肉腫は症例数が少ないにも関わらず、当施設では患者血清/血漿および組織(パラフィン包埋組織、凍結組織)などの臨床検体および付随する臨床情報を多数保存している。血管肉腫に対する病態解明および新規治療に関する基礎的研究は少数しか報告がない。血管肉腫に対する臨床と研究を一貫して施行できる様な施設に所属する申請者が本研究を行う事で、得られた知見を、患者サンプルで検証することが出来る。

### 3. 研究の方法

血管肉腫における TGF- $\beta$  シグナル経路に関する分子発現の検討

患者検体組織および培養細胞株を用いて正常血管内皮細胞、血管肉腫細胞株である ISOHAS・HAMON の endoglin 蛋白質の発現レベルを検討する。

血管肉腫に対する endoglin 阻害による抗腫瘍効果の検討

endoglin siRNA を用いて、各々血管肉腫細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討する。細胞数を測定し、TUNEL assay にて apoptosis cell も測定する。遊走能・浸潤能(培養チャンバーを用いて遊走/浸潤する細胞数カウント)、Warburg 効果(細胞外フラックスアナライザー XFp を用いた OCR(ミトコンドリア呼吸;酸素消費速度)、ECAR(解糖系;細胞外酸性化速度)などへの影響を検討する。

endoglin が関与する血管肉腫の腫瘍進展の分子メカニズムの解明

プラスミドを用いて endoglin を過剰発現した正常血管内皮細胞、endoglin siRNA を用いて endoglin 発現をノックダウンした血管肉腫細胞株を作成する。

1) 上記 で検討した抗腫瘍効果に関与する各種分子発現量および活性状態を解析する。

増殖能: VEGF 受容体, ERK, p-ERK, MEK, p-MEK

アポトーシス: caspase3/7 の発現量および活性

遊走能: CD31, FAK, p-FAK, paxillin, p-paxillin, VE cadherin, p-VE cadherin

浸潤能: MMP-2 および MMP-9 発現量および活性

腫瘍免疫逃避機構: GM-SCF, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , CXCL-12, VEGF, PD-L1, 乳酸

2) 正常血管内皮細胞では endoglin が直接 TGF- $\beta$  受容体に作用し、EndoMT に関与する。一方、血管肉腫では明らかにされていない。腫瘍進展に重要な EndoMT に関与する endoglin の役割を解明するために、以下の分子発現量を解析する。

EndoMT marker: CD31, VE cadherin, Snail,  $\alpha$ -SMA

Smad pathway: ALK1, ALK5, TGF- $\beta$  RII, Smad2, p-Smad2, Smad 3, p-Smad3, Smad1, p-Smad1

Non Smad pathway: MAP kinase pathway (前述の ERK 以外の JNK), Rho-like GTPase signaling

pathway (Rho, Rac), PI3K/AKT pathway (PI3K, PTEN, PDK1, Akt)

#### 4. 研究成果

血管肉腫患者検体組織および培養細胞株において endoglin は過剰発現している

正常、老人性血管腫、血管肉腫組織における endoglin 蛋白質の発現を免疫染色にて検討した。血管肉腫患者組織では正常血管や老人性血管腫と比べ、endoglin が濃染された。次に血管肉腫培養細胞株 (HAMON、ISO-HAS) における endoglin 蛋白質発現を免疫プロット法にて解析した。培養血管内皮細胞株比較して、血管肉腫細胞株では endoglin とともに強発現を認めた。

endoglin siRNA は血管肉腫細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を抑制する

endoglin siRNA を用いて血管肉腫細胞株に対する endoglin 阻害効果を検討した。endoglin siRNA により血管肉腫細胞株において細胞数の減少を認め、アポトーシスが誘導された。遊走/浸潤アッセイでは、遊走能・浸潤能ともに低下した。Tube formation assay では、管腔形性能が阻害された。OCR/ECAR 比は、正常血管内皮細胞株と比べ、血管肉腫細胞株において OCR/ECAR の低下を認め、endoglin siRNA により血管肉腫細胞株において OCR/ECAR 比は増加した。

さらに正常血管内皮細胞に対してプラスミドを用いて endoglin を過剰発現させたところ、アポトーシスの抑制、遊走能・浸潤能が促進された。

血管肉腫における endoglin 阻害は、Smad 非依存性 TGF- $\beta$  シグナル伝達の調節を通じて抗腫瘍効果が誘導されている。

endoglin siRNA を用いて endoglin 阻害による血管肉腫への抗腫瘍効果のメカニズムを検討した。endoglin siRNA により、サイバピンの発現を抑制され、カスパーゼ 3/7 の活性を増強し、アポトーシスが誘導されること、VE カドヘリンとパキシリンのリン酸化が抑制され、遊走の抑制につながることで、MMP2 と MMP9 両者の活性が抑制され、浸潤抑制されることが明らかとなった。一方で TGF- $\beta$  ファミリー受容体、Smad1、Smad2、Smad3 のリン酸化には影響しなかった。以上より、血管肉腫における endoglin の阻害は、Smad 非依存性 TGF- $\beta$  シグナル伝達の調節を通じて、抗腫瘍効果がもたらされると考えられた。さらに、血管肉腫培養細胞株では TGF- $\beta$  ファミリー受容体 (T R-II、ALK1、ALK5) の強発現を認めたが、endoglin 阻害は、TGF- $\beta$  ファミリー受容体および Smad のリン酸化に影響しなかった。

本研究全体を通じて、1) 血管肉腫患者組織および培養細胞株では endoglin が過剰発現していたこと、2) 血管肉腫は TGF- $\beta$  刺激により誘導される過剰な endoglin 発現により進展すること、3) Endoglin 阻害により細胞数の減少及びアポトーシスの増加、遊走能・浸潤能低下、管腔形成能及び Warburg 効果の抑制を認めること、4) 血管肉腫における endoglin の阻害は、Smad 非依存性 TGF- $\beta$  シグナル伝達の調節を通じて抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。endoglin は、血管肉腫の新規治療標的になる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kashiwada Nakamura K., Myangat T. M., Kajihara I., Kusaba Y., Tanaka K., Sakamoto R., Maeda Otsuka S., Yamada Kanazawa S., Sawamura S., Kanemaru H., Nishimura Y., Honda N., Makino K., Miyashita A., Aoi J., Igata T., Makino T., Masuguchi S., Fukushima S., Ihn H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Absence of microsatellite instability in extramammary Paget's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Skin Health and Disease	6. 最初と最後の頁 e37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ski2.37	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 -

1. 著者名 Yamada Kanazawa S., Mijiddorj M.T., Kajihara I., Kanemaru H., Sawamura S., Makino K., Aoi J., Masuguchi S., Fukushima S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Upregulated androgen receptor variant 7 mRNA and protein in extramammary Paget's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e724-e726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.18229	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 -

1. 著者名 Kusaba Yudo, Kajihara Ikko, Myangat Tselmeg Mijiddorj, Tanaka Kenichiro, Kanemaru Hisashi, Sawamura Soichiro, Makino Katsunari, Aoi Jun, Masuguchi Shinichi, Fukushima Satoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Clinical significance of ERBB2 S310F mutation in extramammary Paget's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e305-e306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16439	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 -

1. 著者名 Kusaba Yudo, Kajihara Ikko et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Clinical significance of maximum standardized uptake value of positron emission tomography/computed tomography as prognostic factor in extramammary Paget's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e201-e202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16328	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 -

1. 著者名 Kusaba Yudo, Kajihara Ikko et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Intertumor and intratumor heterogeneity of PIK3CA mutations in extramammary Paget ' s disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 508 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16343	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 -

1. 著者名 Sawamura Soichiro, Mijiddorj Myangat Tselmeg, Kajihara Ikko et al.	4. 巻 31
2. 論文標題 Genomic landscape of circulating tumour DNA in metastatic extramammary Paget ' s disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 341 ~ 348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14476	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 -

1. 著者名 Ryoko Sakamoto, Ikko Kajihara et al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Inhibition of Endoglin Exerts Antitumor Effects through the Regulation of Non-Smad TGF-Signaling in Angiosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2060-2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.01.031.	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 -

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

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------