

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19610

研究課題名（和文）がんと感染症に共通した血栓形成機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of thrombus formation common to cancer and infectious diseases

研究代表者

樋田 京子（HIDA, Kyoko）

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：40399952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：加齢、若齢マウス肺のサンプリングを行い、血管内皮細胞を単離・濃縮し、RNAseqを行った。重症化モデルに特徴的な血栓症の発症メカニズムを解析した。腫瘍血管内皮細胞については、既に我々が樹立した方法で悪性度の異なる腫瘍や、抗癌剤治療を加えたマウスモデルから血管内皮細胞ならびに血管内皮細胞以外の分画を単離し血栓形成に関わる因子を同定した。vWF, P-selectin, Thrombomodulinなどの既知の因子のほか、血液凝固や免疫細胞遊走に関わる新規分子の同定を行った。分子の阻害剤候補を用いて、動物モデルを用いて血栓形成、血管炎に及ぼす作用を病理組織学的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、血管内皮細胞が免疫細胞や血小板、あるいは赤血球に対する作用が明らかになった。感染症と癌における共通した血栓症発症の分子機序を明らかにした。癌患者の予後が改善する中、心血管イベント発生予防は喫緊の課題でありアンメットメディカルニーズのひとつである。新型コロナウイルス感染症重症化に対する血栓症診断、治療法はまだ確立されておらず、本研究成果により新たな治療戦略開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lungs of aged and young mice were sampled, vascular endothelial cells were isolated and enriched, and RNAseq was performed. We analysed the pathogenesis of thrombosis without characteristic of the severe disease model. For tumor endothelial cells, we isolated endothelial cells and non-endothelial cell fractions from tumors of different grades and from anti-cancer-treated mouse models using our previously established method and identified factors involved in thrombogenesis, including known factors such as vWF, P-selectin and thrombomodulin. In addition to known factors such as vWF, P-selectin and thrombomodulin, novel molecules involved in blood coagulation and immune cell migration were identified. The effects of the molecular inhibitor candidates on thrombogenesis and vasculitis were analysed histopathologically in animal models.

研究分野：実験病理学

キーワード：血管内皮細胞 新型コロナウイルス感染症 腫瘍 血栓症 好中球

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんと感染症との関連は注目されてきた。特に胃癌、子宮頸癌、肝癌など、感染症による発癌についてよく研究されてきた。一方、両者に共通した病態についてはあまり注目されていない。特に癌患者の血栓症は致命的であるため、近年、新しい学際分野 Oncocardiology において盛んに研究され始めた。「人は血管と共に老いる」といわれるが、全身疾患や加齢に伴う血管病態とがん・感染症の血栓症との関連については不明な点が多い。

申請者らはこれまで行ってきた腫瘍血管内皮細胞の特性に関する研究から、「血管内皮細胞が周囲に作用し炎症性微小環境を形成しうる」ことを見出ししてきた。一方、COVID-19 では血管炎が特徴であるが、我々はその血管病態に関する報告から、「感染時の肺血管の病態が腫瘍血管に極めて類似している」ことに着想した。例えば悪性度の高い腫瘍血管内皮細胞は好中球遊走因子を高発現し、血管周囲に好中球トラップ (NETs) を形成するが、これは COVID-19 の重症例における血栓症、免疫細胞塞栓の原因として報告されている。そこで、同感染症における血管病態解明を目的に SARS-CoV-2 感染実験を開始した。これまで、マウス感染性を有するウイルスを用いてヒト感染肺の病態を再現するマウスモデルの構築に成功し、若齢・高齢マウスにおける感染肺の病理学的所見の違いを見出ししていた。

2. 研究の目的

感染症とがんとの関連は注目されており、感染症による発癌についてよく研究されている(胃癌、子宮頸癌など)。一方、両者に共通した病態についてはあまり注目されていない。「人は血管と共に老いる」といわれるが、全身疾患や加齢に伴う血管病態とがん・感染症の重症化や血栓症との関連は不明な点が多い。

申請者らは COVID-19 肺血管に関する文献で得られた知見と、これまでの自らの研究成果「腫瘍血管内皮細胞が周囲に作用し炎症性微小環境を形成しうる」を統合し、「COVID-19 肺血管と腫瘍血管が極めて類似している」と考えるに至った。SARS-CoV-2 感染モデルを作成し血管病態研究を開始した。ヒト感染肺の病態を再現するマウスモデルを用いて血管病態を詳細に解析することとした。本研究は、癌・感染症の両者に共通した血栓形成の新規メカニズムを解明し、両者の重症化に関わる血栓症発症の予測、あるいは血栓症の治療のためのマーカーを同定し重症例の治療法開発、患者の生命予後の改善につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

SARS-CoV-2 感染若齢・高齢マウスを用いた実験を行い、各モデルについて感染初期と後期の 2 点で肺のサンプリングを行った。血管内皮細胞を単離・濃縮し、scRNAseq 解析を実施した。重症化モデルと非重症化モデルの比較解析により、重症化モデルに特徴的なクラスターを同定した。また、肺胞上皮細胞や免疫細胞など血管内皮細胞以外の間質細胞との相互作用は、肺全体の公開 scRNAseq データとの統合解析を実施して血管内皮-間質細胞相互作用のダイナミクスを解析した。腫瘍血管内皮細胞については、既に我々が樹立した方法で悪性度の異なる腫瘍や、抗癌剤治療を加えたマウスモデルから血管内皮細胞ならびに血管内皮細胞以外の分画を単離し、血栓形成に関わる因子を同定した。因子のバリデーションは単離した血管内皮細胞を用いて、肺胞上皮細胞や好中球との共培養システム、3次元マトリクス上での tube formation や肺胞上皮細胞とのマトリクス、血管内皮細胞による組織培養などにより検証し血液凝固や免疫細胞遊走に関わる新規分子メカニズムに迫った。分子間ネットワーク解析データベース Ingenuity Pathway analysis (IPA) を用い血栓形成関連因子とその阻害剤を探索し、動物モデルを用いて血栓形成、血管炎に及ぼす作用を病理組織学的に検証した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍血管内皮細胞因子による血栓形成促進

炎症性組織である癌組織内では TEC が血栓形成促進性に変化していることが推察される。しかし癌関連血栓症の機序としての TEC の関与は殆ど報告がなかった。我々は TEC が分泌する因子(アンジオクリンファクター)について解析を行った。高転移性腫瘍 TEC で高発現している Damage associated molecular patterns (DAMPs) のひとつ Biglycan (Bgn) について研究を進めた。Bgn 高発現腫瘍血管周囲に ApoE で染色される LDL の蓄積と好中球集積さらに、それらによる LDL の酸化が起こっていることを見出した。さらに TEC に高発現する酸化 LDL 受容体 LOX-1 にこれら酸化 LDL が結合し、TEC の NF- κ B 活性化を介して IL-6、CCL2 などの好中球遊走に働くケモカイン産生が増えることを示した。これらにより好中球はさらに腫瘍血管周囲に集積し活性

化した好中球により血栓形成促進に働く好中球による Neutrophil extracellular Traps (NETs) 形成が誘導されることを報告した (Int J Cancer 2022). その後、これらのモデルにおいて血小板活性化マーカーによる染色により腫瘍血管において血栓が形成されていることも明らかにした。

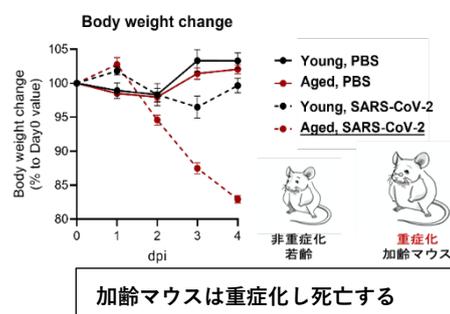
(2) 血管炎症による血栓形成と癌の転移

担癌状態の血管炎症による血栓形成についても解析した。これまで口腔常在菌による血管炎症が報告されているが、我々は口腔常在菌による転移先臓器の血管炎症による循環腫瘍細胞の血管への接着亢進と転移増加を明らかにした (Yu Li Cancer Sci 2022)。さらに炎症性に变化した遠隔臓器血管における血栓形成が腫瘍の転移増加につながることを in vivo, in vitro の実験により示した (Cancer sci 2024)。

(3) 新型コロナウイルス感染症における血管病態と血栓症

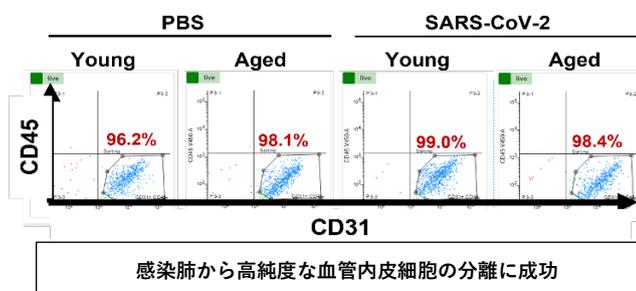
新型コロナウイルス感染症の重症化病態に関与する血管病態を解析した。分担者の澤らが樹立したマウス馴化 SARS-CoV-2 を用いて、非重症化/重症化マウスモデル (若齢/加齢マウス) を作成し、その肺病理像を比較解析した。重症化する感染加齢マウス肺では、これまで報告されている COVID-19 剖検病理所見と類似する

数多くの病変が観察された。我々は CD41 免疫染色抗体による血小板血栓の解析により、重症化マウスの肺においては、血管壁の破綻なく血栓が観察される箇所が多いこと、多くの肺静脈内に血小板の凝集がみられることに注目した。我々はこれまで一般的に COVID-19 血栓形成機序としていわれている「免疫細胞サイトカインによる血管内皮細胞傷害が起点である」とは異なるメカニズムの存在、「ウイルス



曝露、あるいは感染血管内皮細胞による血小板活性化が起こっている」可能性があるのではないかと考えた。上記の SARS-CoV-2 非重症化/重症化マウスモデルから、感染肺組織を回収し肺血管内皮細胞をフローサイトメトリーにより高純度に単離・濃縮し、RNAseq 解析を実施し網

羅的遺伝子発現解析を行うことに成功した。重症化マウス血管内皮細胞からウイルスが検出され、肺胞上皮を取り巻く毛細血管内皮細胞の感染を起点とする血栓形成過程を支持した。また既知の血栓形成関連分子が重症化マウス血管内皮細胞に高発現していることが明らかとなり論文を発表した (Tsumita, Takeda et al., Aging Cell 2023)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Trepas Lucas, Ager Ann, Hida Kyoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Tumor Vessels as Directors of the Tumor Microenvironment: New Findings, Current Challenges & Perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 885670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.885670	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 該当する
1. 著者名 Morimoto Masahiro, Maishi Nako, Tsumita Takuya, Alam Mohammad Towfik, Kikuchi Hiroshi, Hida Yasuhiro, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Annan Dorcas A., Takeda Ryo, Kitagawa Yoshimasa, Hida Kyoko	4. 巻 -
2. 論文標題 miR-1246 in tumor extracellular vesicles promotes metastasis via increased tumor cell adhesion and endothelial cell barrier destruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2023.973871	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 Sato Mineyoshi, Maishi Nako, Hida Yasuhiro, Yanagawa Matsuda Aya, Alam Mohammad Towfik, Sakakibara Konishi Jun, Nam Jin Min, Onodera Yasuhiro, Konno Satoshi, Hida Kyoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Angiogenic inhibitor pre administration improves the therapeutic effects of immunotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5696	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 Ayuningtyas Nurina Febriyanti, Chea Chanbora, Ando Toshinori, Sanninggar Karina Erda, Tanimoto Keiji, Inubushi Toshihiro, Maishi Nako, Hida Kyoko, Shindoh Masanobu, Miyauchi Mutsumi, Takata Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Bovine Lactoferrin Suppresses Tumor Angiogenesis through NF- B Pathway Inhibition by Binding to TRAF6	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 165 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15010165	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 該当する

1. 著者名 Furumido Jun, Maishi Nako, Yanagawa Matsuda Aya, Kikuchi Hiroshi, Matsumoto Ryuji, Osawa Takahiro, Abe Takashige, Matsuno Yoshihiro, Shinohara Nobuo, Hida Yasuhiro, Hida Kyoko	4. 巻 30
2. 論文標題 Stroma biglycan expression can be a prognostic factor in prostate cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.15080	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 Takeda Ryo, Sawa Hirofumi, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Maishi Nako, Tsumita Takuya, Ushijima Natsumi, Hida Yasuhiro, Sano Hidehiko, Kitagawa Yoshimasa, Hida Kyoko	4. 巻 12
2. 論文標題 Antiviral effect of cetylpyridinium chloride in mouthwash on SARS-CoV-2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18367-6	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 Yu Li, Maishi Nako, Akahori Erika, Hasebe Akira, Takeda Ryo, Matsuda Aya Yanagawa, Hida Yasuhiro, Nam Jin Min, Onodera Yasuhito, Kitagawa Yoshimasa, Hida Kyoko	4. 巻 113
2. 論文標題 The oral bacterium Streptococcus mutans promotes tumor metastasis by inducing vascular inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3980 ~ 3994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15538	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 Tsumita Takuya, Maishi Nako, Annan Dorcas Akuba Muhyia, Towfik Mohammad Alam, Matsuda Aya, Onodera Yasuhito, Nam Jin Min, Hida Yasuhiro, Hida Kyoko	4. 巻 151
2. 論文標題 The oxidized LDL/LOX 1 axis in tumor endothelial cells enhances metastasis by recruiting neutrophils and cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 944 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34134	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 Maishi Nako, Sakurai Yu, Hatakeyama Hiroto, Umeyama Yui, Nakamura Takashi, Endo Rikito, Alam Mohammad Towfik, Li Cong, Annan Dorcas Akuba Muhyia, Kikuchi Hiroshi, Morimoto Hirofumi, Morimoto Masahiro, Akiyama Kosuke, Ohga Noritaka, Hida Yasuhiro, Harashima Hideyoshi, Hida Kyoko	4. 巻 113
2. 論文標題 Novel antiangiogenic therapy targeting biglycan using tumor endothelial cell specific liposomal siRNA delivery system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1855 ~ 1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15323	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15件 (うち招待講演 15件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍血管内皮細胞の多様性と治療への応用
3. 学会等名 北海道DOS研究会 公開特別シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 血管の多様性 ~ Wetにdryを取り入れて
3. 学会等名 北海道発産官学・地域連携ダイバーシティ 数理・データサイエンス 特別セッション・ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 血管とがんの悪性化
3. 学会等名 日本女性科学者の会新春シンポジウム2023 学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍血管の多様性とがんの悪性化
3. 学会等名 AIR - Angiogenesis & Immunology Research - (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍血管とがん微小環境
3. 学会等名 鳥取大学医学部特別講義 第41回 発癌病理学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 がんと感染症における血管内皮細胞の多様性, The heterogeneity of endothelial cells in tumor and infectious disease
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会公募ワークショップ「生体組織の形成・再生・恒常性維持とその破綻における血管の新たな機能」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hida K
2. 発表標題 Tumor endothelial cells induce metastasis by disrupting immune environment
3. 学会等名 22nd International Vascular Biology Meeting (IVBM 2022) Session: Angiogenesis and Vascular Remodeling (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍血管とがん微小環境
3. 学会等名 Gynecologic Cancer Clinical Research Seminar2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hida K
2. 発表標題 Epigenetic heterogeneity in tumor endothelial cells (腫瘍血管内皮におけるエピゲノム多様性)
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Cutting Edge Session (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hida K
2. 発表標題 The contribution of tumor endothelial cells in tumor progression (腫瘍血管内皮細胞がもたらすがんの進展への影響)
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, JCA-AACR Joint Symposium -Sponsored by Princess Takamatsu Cancer Research Fund- (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍血管内皮細胞の特性とがん免疫
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム5「4歯科基礎領域におけるがん研究フロンティア」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 “そつだ留学、しよう！～逆転の発想！日本人だからこそ留学しよう～”，“双子連れ留学体験記～ハンディがあってもなんとかなる！？”
3. 学会等名 一般社団法人 日本歯科医学会連合 主催 令和4（2022）年度 国際活動委員会フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hida K.
2. 発表標題 Contribution of tumor endothelial cells in tumor progression
3. 学会等名 The 7th JCA - AACR Special Joint Conference “The Latest Advances in Pancreatic Cancer Research:From Basic Science to Therapeutics（招待講演）（国際学会）”
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hida K
2. 発表標題 The impact of vascular endothelial cell heterogeneity in tumor microenvironment
3. 学会等名 The 40th Sapporo International Cancer Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田京子
2. 発表標題 がんと血管のネットワークの理解と新たな治療戦略
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第59回生物部会学術大会癌シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院歯学研究院口腔病態学分野 血管生物分子病理学教室
<https://www.den.hokudai.ac.jp/vascular-biol-pathol/>

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
研究分担者	澤 洋文 (SAWA Hirofumi) (30292006)	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・兼務教員 (10101)	

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
---------	---------