

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590459

研究課題名(和文)「くり込み薬」による血管新生阻害

研究課題名(英文) Inhibition of angiogenesis by internalization inducer

研究代表者

榎崎 雅司 (Narazaki, Masashi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00467573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生阻害作用に関して、人工化合物、サイトカイン、阻害抗体の3つの異なる分子を解析した。人工的な化合物である硫酸多糖類、フコイダン、6分子以上からなるオリゴグアノシンなどが血管内皮細胞表面のNeuropilin-1を細胞内に内在化させ、細胞表面から消失させ血管新生阻害作用を示すことを解析し、こうした分子を「くり込み薬」と呼ぶことにした。生理的サイトカインVEGF-Bが血管新生に関与するFGF受容体に相互作用する特性を明らかにし、VEGF-Bの血管新生阻害活性の分子基盤を与えた。また、新規血管新生関連分子であるEphrinファミリーに対する抗体の性状を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the inhibitory mechanisms of angiogenesis by using three groups of molecule, including artificial compounds, physiological cytokine, and inhibitory antibody. Neuropilin-1 is a cell surface receptor of VEGF. We showed that sulfate polysaccharide, fucoidan, and oligo-guanosine nucleotide could internalize Neuropilin-1 from the endothelial cell surface to lysosome as an "internalization-inducer". Moreover, we showed that fucoidan and oligo-guanosine nucleotide could inhibit angiogenesis in vivo. We analyzed the interaction of a cytokine VEGF-B with FGF receptor. We proposed the possibility that VEGF-B works as an antagonist of FGF receptor. And we analyzed the biochemical property of the antibody against the members of Ephrin family that are recently identified to have a role in angiogenesis.

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：血管新生 Neuropilin-1 血管内皮細胞 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

多くの先進国での死因の1位は癌である。原発巣や転移巣が個体の生命を滅ぼすまで無秩序に増大しつづけるためには必ず酸素と栄養の供給を受ける必要がある。この酸素と栄養を供給するためには、癌塊へ伸びる血管新生が必須である。癌は多様な組織から由来し、様々な分化段階を持つ。しかし、それを栄養する新生血管は健常血管から連続的に生じている。遺伝的、表現的な多様性に富む発癌機構に対してそれぞれの阻害を行なう戦略より、癌に栄養を送るための腫瘍内血管新生を抑制する戦略は種々多様な癌の増大に対し共通して有効と考えられ盛んに研究されている分野である。血管新生因子の一つであるVEGFに対する阻害抗体(bevacizumab)が臨床の現場に登場し、結腸・直腸癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、乳癌、などの癌や、加齢黄斑変性症の治療に対して適応が承認されている。今後も血管新生抑制薬は血管新生を伴う様々な疾患に対して治療戦略の一つとして活発な研究が展開されるだろう。しかし、残念ながらVEGF一因子のみを単独で抑制する治療だけでは抗癌効果が弱いとされる。VEGF以外のFGF、PDGFなど複数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。

血管新生は癌の増大に寄与する以外にも加齢黄斑変性症や慢性炎症の病態に重要な役割を果たしている。関節リウマチでは慢性の滑膜炎により滑膜組織内で血管新生が認められ、酸素と栄養を得た滑膜が増殖しパンヌスを形成し、関節軟骨、関節骨を蝕んで行くことが関節リウマチにおける関節破壊の機序と考えられている。

慢性炎症の分野では血管新生阻害薬の応用はまだなされていないが、関節リウマチ治療薬である抗IL-6受容体抗体投与によってVEGF

が低下することが知られている。関節腫脹や滑膜血管新生抑制として血管新生阻害薬の導入も考えられ、慢性炎症での血管新生阻害の有効性も検討されるべきである。

## 2. 研究の目的

人工的な物質、生理的な血管新生阻害サイトカイン、血管新生に関与する新たな分子に対する阻害抗体、以上の3つのアプローチを行ない、血管新生阻害分子を広く検討する。新規血管新生阻害分子が得られたら、in vivoでの作用を検討し、新たな医薬品としての可能性を模索していく。従来より継続して研究してきた「くり込み薬」の作用をさらに解析していく。

生体内に元々存在するサイトカインによる血管新生阻害機構を解析する。これまで探索されていない血管新生関連分子に対する阻害抗体の生化学的作用を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 標的とする細胞表面分子に結合し、同時にスカベンジャー受容体などのように細胞内内在化を引き起こす細胞表面分子にも結合できる分子を過去の結合性質の報告から予測する。それらの分子を実際に細胞に作用させる。標的分子が細胞表面から消失した場合、標的分子と細胞内在化機能を持つ分子との連結が実際に生じるかをELISAで確認する。標的分子が細胞表面から消失したことを標的分子の本来のリガンドを用いて確認する。本来のリガンドの活性が亡くなっていることを確認する。

(2) VEGF-BのFGF受容体への相互作用をウェストウェスタン法で検出する。その後Biacoreを用いて片方を固相化し、もう片方を固相化表面上に流すことによって、結合速度、解離速度を測定し、詳細な解離定数を求める。

(3) 共同研究者から送付されたEphrinフ

ファミリーに対する抗体を用いてBiacoreを用いて Ephrin を固相化し、抗体を表面に流すことによって、結合速度、解離速度を測定し、詳細な解離定数を求める。

#### 4 . 研究成果

本研究によって、主に3つの成果を得た。研究進行の途中で当初の研究計画から変更があったが、研究をさらに展開し、海外の研究者とも共同研究を行ない、広く血管新生阻害の研究に取り組んだ。

(1) 細胞表面分子を細胞内へ内在化させ、細胞表面から消失させる機構での阻害剤を「くり込み薬 (internalization inducer)」とよぶことにした。血管内皮細胞の細胞表面の VEGF 受容体である Neuropilin-1 を細胞内へくり込ませて細胞表面から消失させる分子として、硫酸多糖類、フコイダン、6 分子以上からなるオリゴグアノシンなどを同定した。これらはスカベンジャー受容体との架橋により Neuropilin-1 を含む特定の細胞表面分子をリソソーム分画へ到達させて分解させるという機構を提唱している。In vivo では硫酸多糖類は生体毒性が強く致死的であったが、フコイダンはマウスに長期投与可能であり、縮小した癌は血管領域縮小を伴っていることを確認した。また、加齢黄斑変性症をモデルとした網膜内血管新生の阻害実験としてマウスの眼球内にグアニン重合体を投与したところ血管新生領域の縮小を認めた。眼球内投与であれば比較的安全であった。

(2) 生理的因子を用いた新規血管新生阻害の検討。米国 NIH/National Eye Institute (後に中国 Zhongshan Ophthalmic Center) の C.Lee らとの共同研究。血管新生に関与する FGF 受容体に VEGF-B が特異的に結合し、FGF を阻害する機構を生化学的手法で解析し、FGF 受容体の阻害機構に裏付けを与えた。

(3) 新規血管新生阻害抗体の解析。米国

NIH/National Cancer Institute の G.Tosato 博士らの研究チームとの共同研究。血管新生における新規標的分子群である Ephrin ファミリーに対する抗体の生化学的解析を行なった。Ephrin メンバーに対する結合特異性と結合速度、解離速度から解離定数を算出し、抗体の性状を示すデータを得た。

#### 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 5 件)

(1) Narazaki M, Hagihara K, Shima Y, Ogata A, Kishimoto T, Tanaka T. Therapeutic effect of tocilizumab on two patients with polymyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 査読有、2011. 50(7);1344-1346

(2) Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, for the treatment of autoimmune diseases. *FEBS Lett*. 査読有、2011. 585(23);3699-3709

(3) Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 査読有、2012. 52;199-219

(4) Tanaka T, Ogata A, and Narazaki M. Tocilizumab: An Updated Review of Its Use in the Treatment; Rheumatoid Arthritis and Its Application for Other Immune-Mediated Diseases. *Clinical Medicine Insights. Therapeutics* 査読有、2013. 5;33-52

(5) Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Interleukin-6; pathogenesis and treatment of autoimmune inflammatory diseases. *Inflammation & Regeneration*. 査読無、2013. 33;54-65

〔図書〕(計 1 件)

免疫学コア講義 改訂3版 熊ノ郷淳他編 南山堂 2012 207,208,218

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: New hetero-bifunctional ligand comprises target receptor-binding agent, heterologous internalizing receptor-binding agent, and linker, useful for inducing internalization of target receptor, and for treating or

inhibiting an HIV infection.  
発明者：Narazaki M, Tosato G  
権利者：US dept health&human services  
種類：  
番号：US8420620-B2、US2013243769-A1  
出願年月日：16/Apr/2013、19/Sep/2013  
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/  
lab\\_2/page6/summary.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab_2/page6/summary.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