

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659611

研究課題名(和文)新規血管新生阻害物質 DBP - maf の癌治療への応用

研究課題名(英文) Novel angiogenesis inhibitor DBP-maf for cancer therapy

研究代表者

松浦 成昭 (Matsuura, Nariaki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：DBP-maf (Vitamin D binding protein-macrophage activating factor) は血管内皮細胞に対して増殖能、一部の細胞外基質に対する接着能、遊走能を抑制し、その結果として管腔形成を抑制することで血管新生阻害作用を示した。Aorta ring assay、DASアッセイ、マトリゲル・プラークアッセイのいずれにおいてもDBP-mafは著明に血管新生を阻害した。DBP-mafは血管新生阻害作用に加えて、マクロファージ活性化作用を有し、貪食能の亢進も見られた。またin vivoにおいて肝細胞癌、膵癌細胞株の増殖を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：DBP-maf (Vitamin D binding protein-macrophage activating factor) showed inhibitory activity for angiogenesis through suppressive effect on endothelial proliferation, adhesion activity to extracellular matrix proteins, migration capacity, and tube formation. DBP-maf inhibits markedly angiogenesis by Aorta ring assay, Das assay and Matrigel plaque assay. Furthermore DBP-maf has stimulatory effect on macrophage activation. DBP-maf suppresses growth of hepatocellular carcinoma or pancreatic carcinoma cell lines in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管新生 マクロファージ がん治療

1. 研究開始当初の背景

癌の分子標的治療法の1つとして、血管新生をターゲットにした抑制物質が注目されており、VEGF(vascular endothelial growth factor)のヒト型抗体である Bevacizumab はすでに商品化されて、大腸癌を初めとした癌の治療に資料されている。しかし、単独では十分な作用が出ずに抗癌剤との併用であること、高額のコストがかかること、副作用も含めた安全性に問題があることなどの問題点が指摘されてきた。Bevacizumab を上回る効果を期待して、多くの抗体医薬品およびキナーゼ阻害薬の開発がなされているが、いずれの医薬品も人工的に合成したものである。一方、エンドスタチン、アンギオスタチン等の内因性の血管新生阻害物質の開発もなされているが、精製方法が難しく、研究は進展していない。本研究は新しい内因性の血管新生阻害物質であるビタミンD結合蛋白-マクロファージ活性化因子 (Vitamin D binding protein-macrophage activating factor; DBP-maf)に着目して、本物質による血管新生抑制により癌の治療法の確立を目的とするものである。

DBP-mafは研究協力者の鬼塚らがヒト膀胱癌細胞株BxPC-3の培養上清から単離精製した新しい血管新生阻害物質である。ビタミンD結合蛋白(DBP)は2本の糖鎖を有する分子量53kDaの糖蛋白で、この糖鎖が切断されDBP-mafに変化する。このDBP-mafは強い血管内皮細胞増殖抑制作用により血管新生を阻害し抗腫瘍効果を有する。その量は4ng/kgときわめて微量で効果を認めた (Neoplasia 5: 32-40, 2003)。また、DBP-mafはマクロファージを活性化することによる直接の抗腫瘍効果も認めている。DBP-mafが血管新生を抑制するメカニズムの詳細は不明である。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、本研究では DBP-maf

により抗癌治療が可能になるための基礎的研究ならびに、実際に臨床応用に向けての研究を行う。具体的には以下の点を明らかにしていく。

- 1、DBP-maf の血管新生阻害作用の検討
- 2、DBP-maf の血管新生阻害作用のメカニズムの解明
- 3、DBP-maf のマクロファージに対する作用の検討
- 4、DBP-maf の抗腫瘍効果の検討

3. 研究の方法

- 1) DBP-maf の血管新生阻害作用のメカニズムの解明 (in vitro)

血管内皮細胞に対する DBP-maf の作用を、細胞増殖能、細胞接着能、細胞遊走能、細胞浸潤能、管腔形成能について検討する。また、それらの機能に関連する接着分子、増殖因子、基質分解酵素などの変化を解析する。

- 2) DBP-maf の血管新生阻害作用のメカニズムの解明 (in vivo)

in vivo の血管新生評価系 (Aorta ring assay、DAS アッセイ、マトリゲル・ブラークアッセイ)における DBP-maf の作用を検討する。また、マウスに種々の癌細胞を接種し、血管新生に対する DBP-maf の効果を経時的に病理学的に検討する。

- 3) DBP-maf のマクロファージに対する効果の検討

DBP-maf は元々、マクロファージの活性化因子として同定された分子と同一であることが明らかにされている。そこで、マクロファージに対する DBP-maf の作用を検討した。マウス腹腔からマクロファージを採取して、DBP-maf で刺激して、マクロファージ特異的な表面分子の変化をフローサイトメトリーで、機能的な評価を家兔血清でオゾン化した羊赤血球に対する貪食能を検討した。

- 4) DBP-maf の抗腫瘍効果の検討

種々の癌細胞株をマウスに接種して、DBP-maf の効果を検討する。評価は病理学的、生化学的、分子生物学的方法から多面的に行い、DBP-maf の抗腫瘍効果の特徴を明らかにする。

4 . 研究成果

1) in vivo の血管新生評価系を用いて、DBP-maf の作用の検討を行った。アッセイ法として Aorta ring assay、マウスの背部に DAS アッセイ、マトリゲル・ブランクアッセイを用いた。Aorta ring assay はラットの大動脈をコラーゲンゲルに埋めて新生血管を見るアッセイであり、DBP-maf はコントロールに対して著明に新生血管の形成を抑制した。DAS アッセイはマウスの背部に可溶性の物質を入れた器具 (dorsal air sac) を挿入し、血管新生の程度を見るアッセイであるが、DBP-maf を産生した計では著明に新生血管の形成が阻害された。マトリゲル・ブランクアッセイはマウス皮下にマトリゲルの中に可溶性の分子を入れて、注射し、マトリゲル内に進入してくる新生血管を観察する方法であるが、DBP-maf を入れたものでは血管新生が抑制された。以上の3つのアッセイから DBP-maf は血管新生を in vivo の条件でに著明に阻害することが示された。

2) 血管内皮細胞に対する DBP-maf の作用としてまず、MTT アッセイによる増殖能の検討を行ったところ、DBP-maf は内皮細胞の増殖を有意に抑制した。次に、種々の細胞外基質に対する接着能の検討を行ったところ、DBP-maf はコラーゲン、ラミニンに対する接着性に対する影響を示さなかったが、ヴィトロネクチンに対する接着能の有意な抑制が見られ、フィブロネクチンに対しても阻害効果が認められた。また、wound assay による細胞運動能を検討したところ、DBP-maf は内皮細胞の運動能の有意な抑制が見られた。血管内皮細胞の管腔形

成能をコラーゲン内3次元培養により検討したところ、DBP-maf は管腔形成を阻害した。以上の基礎的検討から、DBP-maf は血管内皮細胞に対して増殖能、一部の細胞外基質に対する接着能、遊走能を抑制し、その結果として管腔形成を抑制することで血管新生阻害作用を示すことが明らかとなった。なお、他の細胞に対する効果を見るために線維芽細胞を用いてコントロール実験として同様の検討を行ったところ、線維芽細胞の増殖能、接着能、運動能には全く変化が見られなかった。この結果より、DBP-maf は血管内皮細胞特異的に作用することが示された。

3) DBP-maf は血管新生阻害剤として開発されたが、名前の通り、マクロファージの活性化作用も認められ、抗腫瘍効果に寄与しているという報告も見られる。そこではマクロファージに対する作用を検討した。マウス腹腔からマクロファージを分離し、DBP-maf 1ng/ml で刺激して細胞表面抗原の発現レベルをフローサイトメトリーで検討した。その結果、CD11b、CD18、CD105 の発現レベルの増加が認められたが、CD11a、CD14 の発現レベルは変化が見られなかった。次に、家兔血清でオプソニン化した羊赤血球に対する貪食能を検討したところ、コントロールに比べて約 30% の貪食能の亢進が認められた。以上の結果から、DBP-maf は血管新生阻害作用に加えて、マクロファージ活性化作用も有することが示された。

4) in vivo の実験として、4 週齢ヌードマウスにまず細胞株 PLC/PRF/5 細胞を皮下接種し、腫瘍体積が 100mm³ の時点から DBP-maf 4ng/ml を連日投与した (コントロールは PBS を投与) 。投与 3 週間後、コントロール群では腫瘍の体積は 1855mm³ と増大を示したのに対して、DBP-maf 投与群では 151mm³ と腫瘍の増殖は著明に抑制された。腫瘍組織の免疫組織学的検討により、DBP-maf 投与群ではマクロファージ数が増

加していること、血管新生が抑制されていること、腫瘍体積の減少は主としてアポトーシスによることが示された。ついで、ヌードマウスに膵癌細胞株 BX-PC 細胞を皮下接種し、腫瘍体積が 100mm³ の時点から DBP-maf 4ng/ml を連日投与した（コントロールは PBS を投与）。投与 3-4 週間後、コントロール群に対して、DBP-maf 投与群では腫瘍体積は約 40%減少し、肝癌同様に膵癌の増殖に対しても DBP-maf は抑制作用を持つことが示された。腫瘍組織の免疫組織学的検討により、DBP-maf 投与群では血管新生が抑制されていること、腫瘍体積の減少は主としてアポトーシスによることが示された。マクロファージ数の増加は有意ではなかった。以上から、in vivo における肝癌および膵癌の細胞株に対して、主として血管新生抑制作用を解して、増殖を抑制していることが示された。

以上より、DBP-maf には血管新生抑制作用、マクロファージ活性化作用があり、それらを介して腫瘍の増殖を抑制することが明らかにされた。

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 3 件)

1) Nonaka K, Onizuka S, Ishibashi H, Uto Y, Hori H, Nakayama T, Matsuura N, Kanematsu T, Fujioka H: Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Inhibits HCC in SCID Mice. J Surg Res 172: 116-22,2012.

2) Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N: Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. Cardiovasc Res

99:102-10,2013.

3) Mori S, Tran V, Nishikawa K, Kaneda T, Hamada Y, Kawaguchi N, Fujita M, Takada YK, Matsuura N, Zhao M, Takada Y: A Dominant-Negative FGF1 Mutant (the R50E Mutant) Suppresses Tumorigenesis and Angiogenesis. PLoS One 8(2):e57927,2013. doi: 10.1371/journal.pone.0057927. Epub 2013 Feb 28.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190402

(2)研究分担者

森 誠司 (MORI, Seiji)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90467506

(3)連携研究者

濱田 吉之輔 (HAMADA, Yoshinosuke)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：10362683