

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15054

研究課題名(和文) 腫瘍血管の正常化誘導機構の解明と誘導分子スクリーニング法の確立

研究課題名(英文) Tumor blood vessel normalization by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumor mouse model

研究代表者

富田 修平 (Tomita, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00263898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍移植モデルに対して血管形成に関わる低酸素応答性転写因子HIFの機能を高めるPHD阻害剤を処置することにより、脆弱な腫瘍血管が形態的・機能的に正常様血管へ変化することを見出した。さらに、このPHD阻害剤処置した腫瘍血管の形質変化により既存の抗癌剤の感受性を高める抗腫瘍効果が観察され、その結果としてこれまでの癌治療法とは異なる観点に基づき腫瘍血管形成の正常化による新規抗癌剤治療法の技術開発の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In tumor tissue, abnormal blood vessels, which are hyper-permeable and immature, are often formed; these tissues also have irregular vascularization and intravasation. This environment induces resistance to anticancer drugs, which causes an increase in anticancer drug doses, leading to increased side effects. We hypothesized that normalized tumor blood vessels would improve tumor tissue perfusion, resupply nutrition and re-oxygenate the tumor tissue. Chemotherapy would then be more effective and cause a decrease in anticancer drug doses. We report a neovascularization-inducing drug that improved tumor vascular abnormalities, such as low blood flow, blood leakage and abnormal vessel structure. These results could lead to not only an increased chemo-sensitivity and tissue-drug distribution but also an up-regulated efficiency for cancer chemotherapy. This suggests that tumor blood vessel normalization therapy accompanied by angiogenesis may be a novel strategy for cancer therapy.

研究分野：血管生物学

キーワード：腫瘍血管 低酸素 PHD阻害剤 HIF

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍に対する抗血管新生療法は、2004年に血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害剤の臨床使用が開始され、これまで様々な臨床試験でその有効性が確認されている。しかし、最近の研究結果では、血管新生阻害が腫瘍の低酸素低栄養状態に対する適応性を増加させることにより、腫瘍が抗癌剤および放射線に対して抵抗性を獲得することが分かってきた。また、腫瘍血管は正常血管と異なり血管組織の構造的機能的に未成熟で脆弱であり、短く、細い血管が数多く、腫瘍組織内の血流動態は悪く、血管新生阻害の場合と同様の組織内環境を呈する。したがって、腫瘍内の血管を成熟させ正常化することにより、腫瘍内環境を変化させることは腫瘍の悪性を抑制する可能性が考えられ、さらに血管の正常化による腫瘍内への血流改善は薬物送達の改善のみならず抗癌剤・放射線抵抗性の解除に繋がる可能性がある。

(2) 申請者はこれまでに生体の低酸素応答における血管形成に着目し研究を進めてきた。最近、プロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害剤が、低酸素応答性転写因子 (HIF) の活性化を介して血管形成を促進して創傷治癒を改善することを見出し、その分子機序を明らかにしてきた。申請者はこれらの結果を腫瘍領域に応用することで、PHD 阻害剤による腫瘍血管の正常化の可能性を検証することにした。

2. 研究の目的

本研究では、PHD 阻害剤による腫瘍血管の正常血管への誘導について、その分子機序を解明して正常化機序に必須の分子群の同定を試みる。それらの情報をもとに既存薬剤で PHD 阻害剤と同様の効果を示すものを探索するシステムを構築する。また、同定された薬剤を腫瘍移植モデルに投与して腫瘍血管の正常化と腫瘍内への薬物送達の改善効

果について検証する。

3. 研究の方法

本研究での腫瘍血管の解析は、マウスに各癌細胞株を移植して作製した腫瘍モデルを用いる。薬剤を投与することで腫瘍細胞への直接的効果ならびに血管形成、腫瘍内環境、薬物送達効率など多面的に評価することができる。本研究では、プロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害剤の腫瘍血管正常化への寄与の検証を中心に実験を進めた。

(1) マウス腫瘍移植モデルの作製、移植腫瘍ならびに PHD 阻害剤による血管性状評価

まず、PHD 阻害剤を腫瘍移植モデル動物に投与してその腫瘍血管の形質的变化および抗腫瘍効果について検証する。腫瘍細胞株をマウス皮下に移植し、移植腫瘍が既定の大きさとなったところで薬物投与を開始する。腫瘍および腫瘍血管性状は形態学的・病理組織学的に判断する。また、腫瘍血管の性状評価は蛍光免疫染色法にて CD31、NG-2、SMA、VE-cadherin、ZO-1、claudin-5 などに対する抗体を用いて血管を形成する細胞群を観察する。その他の性状評価方法として、モデルマウスに標識したレクチンあるいは高分子デキストランを経静脈的に投与して腫瘍組織内の血管数、血管長、血管径、血管密度、血液漏出について画像解析装置にて測定し評価を行う。

(2) 腫瘍血管正常化による化学療法奏効率、薬物送達効率の改善効果の評価

腫瘍移植モデルマウスを無処置群、PHD 阻害剤投与群、抗癌剤投与群、PHD 阻害剤/抗癌剤投与群に割り付け、生存率および腫瘍径を測定・比較し、PHD 阻害剤と抗癌剤併用の有効性について評価する。また、これら4群の腫瘍組織中の腫瘍細胞の細胞死領域をおよび DNA 損傷を測定し化学療法奏効率、薬物送達効率を判定する。さらにこれらのマ

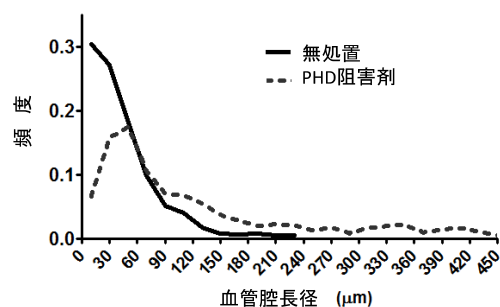
ウスに低分子標識化合物を投与し腫瘍内への標識化合物の移行率を測定することで薬物送達効率を判定する。

4. 研究成果

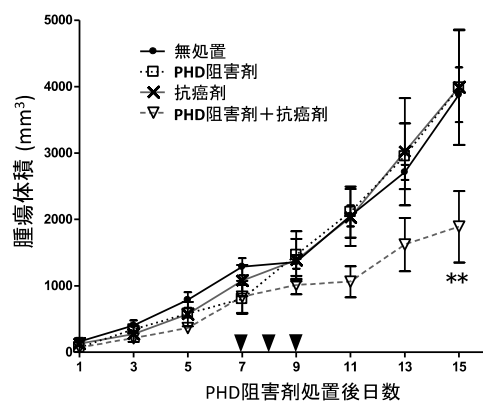
(1) 本研究の成果として、PHD 阻害剤による腫瘍血管の正常化様形質変化のメカニズムから HIF シグナルを介するメカニズムに依存することは、HIF シグナル関連阻害剤によることが間接的に検証できたが、詳細なメカニズムについては今後の課題となった。しかし本研究の最大の研究成果は、PHD 阻害剤処置した腫瘍血管の形質変化により既存の抗癌剤の感受性を高める抗腫瘍効果が観察され、その結果としてこれまでの癌治療法とは異なる観点に基づき腫瘍血管形成の正常化による新規抗癌剤治療法の技術開発の可能性を示したことである。

(2) 本研究開始に至るまでに、PHD 阻害剤が HIF の活性化を介して血管形成を促進して創傷治癒を改善することを見出し、その分子機序を明らかにしてきた。特記すべきことは、血管内皮の HIF の活性化が創傷治癒過程において血管新生を促進して治癒効果を高めたことである。本研究課題では、これらの結果を腫瘍領域に応用することで、PHD 阻害剤による腫瘍血管の正常化の可能性を検証することにした。その結果、腫瘍移植モデルに対する抗癌剤の効果において、PHD 阻害剤併用の治療群では、対照群（PHD 阻害剤無しの治療群）に比較して腫瘍サイズの縮小と、腫瘍組織内の血管長の延長が観察された。また、血管の組織学的な解析より、腫瘍血管の周囲に周皮細胞の集積が観察された。本研究成果は、腫瘍に対する血管・血流の影響の寄与度、重要性を明確にすると共に新規抗癌剤治療法の開発、創薬開発に繋がる。また、新規治療法ではあるが既存の抗癌剤治療法に追加することが可能であるため、幅広い癌

種の抗癌剤治療に適応させることが可能と考えられる。そして、血管を正常に形成させる分子機構の一端を明らかにすることから、腫瘍領域だけでなく血管形成異常を生じる疾患に対しての治療法開発に繋がることから期待される。以上の研究成果は、本研究に関連する特許の出願および原著論文によって報告された。



PHD阻害剤の腫瘍血管長への影響(PHD阻害剤投与により腫瘍内血管は長い血管が増加した。)



PHD阻害剤併用による腫瘍増殖抑制(抗癌剤とPHD阻害剤の併用により腫瘍増殖を抑制した。)
 ▼ 2.5mg/kg CDDP i.p.
 ** P < 0.01 v.s. others

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Mino-Oka A, Tomita S (7名, 6番目): Roles of hypoxia inducible factor-1α in the temporomandibular joint. Archives of Oral Biology 73:274-281 (2017). DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.028 査読有

Islam J, Tomita S (11名, 8番目): Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl

hydrocarbon receptor in mice. *J Nutr Biochem* 42:43-50 (2017). DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.019 査読有

Imori N, Tomita S (8 名 , 6 番目) : Clinical significance of the neutrophil- to-lymphocyte ratio (NLR) in endocrine therapy for stage IV breast cancer. *PLoS One* 12:e0170634 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0170634 査読有

Tsounapi P, Shiomi T (10 名 , 5 番目) : Antioxidant treatment ameliorates the diabetes-induced dysfunction of the vas deferens in a rat model. *Andrologia* in press (2017). DOI: 10.1111/and.12795 査読有

Koyama S, Matsunaga S, Imanishi M, Maekawa Y, Kitano H, Takeuchi H, Tomita S: Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model. *Sci Rep* 7:45621 (2017). DOI: 10.1038/srep45621 査読有

Nishimura Y, Tomita S (7 名 , 4 番目) : Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis. *Shock* in press (2017). DOI: 10.1097/SHK.0000000000000891 査読有

Imanishi M, Tomita S (9 名 , 9 番目) : Hypoxia-inducible factor-1 α in smooth muscle cells protects against aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:2158-2162 (2016). DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307784 査読有

Matsunaga S, Chen BP (12 名 , 1 番目) :

Spontaneous tumor development in bone marrow-rescued DNA-PKcs3A/3Amice due to dysfunction of telomere leading strand deprotection. *Oncogene* 35:3909-3918 (2016). DOI: 10.1038/onc.2015.459 査読有

[学会発表] (計 4 件)

Shuhei Tomita (2017) Role of hypoxia inducible factor-1 in Vascular Remodeling 第 94 回日本生理学会大会シンポジウム アクトシティ浜松 (静岡県浜松市) 3 月 30 日

富田修平 (2017) 血管リモデリングにおける平滑筋由来 HIF-1 の役割 第 46 回日本心臓血管作動物質学会シンポジウム 2 -代謝・循環器病研究の最近の進歩- 琉球大学 (沖縄県中頭郡) 2 月 10 日

Shuhei Tomita (2016) Role of hypoxia-inducible factor-1 α in vascular remodeling. 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会シンポジウム The roles of vascular remodeling in tissue hypoxia 長崎ブリックホール (長崎県長崎市) 12 月 10 日

富田修平 (2016) 血管リモデリングにおける低酸素応答性転写因子 HIF-1 の役割 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム 1PS8 低酸素バイオロジーの最前線-その分子機構から疾患まで- パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 11 月 30 日

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称 : 抗癌剤の抗腫瘍効果の増強剤、癌治療剤、及び癌治療用医薬組成物

発明者 : 富田修平 , 松永慎司

権利者 : 同上

種類：特許

番号：特許願 2016-171299 号

出願年月日：平成 28 年 9 月 1 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departments/bunshi-pharmacology.shtml>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富田修平 (TOMITA, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00263898

(2)研究分担者

松永慎司 (MATSUNAGA, Shinji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30704910