

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15831

研究課題名(和文)腫瘍血管特異的なノンコーディングRNAを標的とした新規血管新生抑制治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel anti-angiogenic treatment targeting Tumor endothelial cell specific non-coding RNA

研究代表者

岩本 英希 (Hideki, Iwamoto)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40529541

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)：現在、承認されている分子標的治療薬は、有効性が証明されている一方で、副作用が多く、その管理が難しい事が問題となっている。本研究は、現在の問題点を解決するために実施された研究である。癌の増殖には血管が必須であり、癌血管を特異的に阻害する分子の発見を試みた。本研究により二つの癌血管に重要な分子、特にノンコーディングRNAの一つであるマイクロRNAを発見した。実験的担癌マウスモデルを用いて、同定したマイクロRNAを遺伝子学的に操作する事で、正常な臓器血管には影響することなく、癌血管のみを抑制、結果的に癌を縮小させる事を、今回のプロジェクトにより明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の新規性として、一つ目は癌血管に特異的なマイクロRNAの発見が挙げられる。二つ目は、同定されたマイクロRNAを制御する事で癌血管のみを抑制する事ができるという点である。現在、癌血管を標的とした治療は、様々な癌種の標準的な治療であり、その治療における問題点を本研究では解決した。従って、本研究の達成による癌患者への貢献は大きいものと考えられる。また、遺伝子導入により癌治療を行う事は、今後の癌治療の大きな進歩の一つであり、本研究の達成により新たな可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：It is known that tumor endothelial cells (TECs) are functionally and genetically different from normal ECs. In this study, we have clarified morphologic, functional, and genetic differences between TEC and liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) to find a specific molecular target that can only inhibit tumor angiogenesis without inhibition of normal vessels. In the study, TEC showed disorganized, leaky, and less perfused vessels, compared with LSECs, which resulted in increased hypoxia within tumors. We have detected the top 5 downregulated TEC-specific miRs. Downregulation of TEC-specific miRs showed significantly increased tube formation. Notably, TEC-specific miRs agonists significantly inhibited tumor growth in HCC orthotopic model mice with only inhibiting tumor vessels. Our detected TEC-specific miRs were strongly correlated with tumor angiogenesis, which can be novel and promising therapeutic targets for HCC.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：癌血管 マイクロRNA 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍における“血管新生”は増大、浸潤、転移に深く関わる重要な要素であり、その血管新生を標的とした治療が血管新生抑制療法である。2000 年頃から大腸癌を始めとする固形腫瘍に血管新生抑制療法が行われ、肝細胞癌においても 2009 年よりソラフェニブと呼ばれる血管新生阻害剤が本邦でも承認された。しかし、従来の血管新生阻害剤の効果は充分でない上に、副作用が大きな問題とされている。これらの理由として、従来の血管新生阻害剤は正常臓器血管への作用もある事が挙げられる。従来の血管新生阻害剤は、癌細胞が分泌する VEGF などの血管新生を促す増殖蛋白及びその受容体を標的としてきた。しかし、我々のこれまでの研究成果からも標的となっている VEGF などの増殖因子は正常臓器血管の維持にも深く関わっている事は明らかである。つまり従来の血管新生抑制療法が抱える問題点の一つは、標的分子の“腫瘍血管特異性の欠如”であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は従来の血管新生抑制療法が抱える標的分子の腫瘍血管特異性の欠如という問題を解決する事である。その解決には、腫瘍血管特異的な分子の発見が必要である。そのためには、まず“正常臓器血管と腫瘍血管に形態的、機能的、遺伝子学的に違いがあるのか”を明らかにする事を目的とした。正常臓器血管と腫瘍血管に遺伝子学的な違いがあるとすれば、腫瘍血管特異性のある分子標的治療が可能となり得る。次に“正常臓器血管と腫瘍血管にノンコーディング RNA の一つであるマイクロ RNA の発現において違いがあるか”を明らかにする事を目的とした。以上から、癌血管特異的なマイクロ RNA を同定し、それらの発現を変化させる事で、癌血管のみを抑制し正常な血管には作用しない新しい癌血管新生抑制治療の確立を本研究では目指す。

2. 研究の方法

1. マウス肝細胞癌同所移植モデルを用いた周囲肝臓の血管内皮細胞(LSEC)と腫瘍血管内皮細胞(TEC)の肉眼的、機能的、遺伝子学的違いを明らかにする。

実験マウスを用いて肝細胞癌同所移植モデル(Liver orthotopic model)を作製する。マウス肝臓に形成された肝細胞癌の TEC 及びその周囲の LSEC を磁気細胞分離法を用いて単離する。また、蛍光色素が標識された高分子デキストランをマウス尾静脈より投与し、Whole-mount staining 法を用いた血管機能評価を行い TEC 及び LSEC の肉眼的及び機能的な違い(血管密度、血管径、血管の漏出性、血流灌流、微小環境の酸素濃度)を明らかにする。

単離されたそれぞれの血管内皮細胞をマイクロアレイを用いて網羅的な DNA 遺伝子発現解析を行う。加えて、単離されたそれぞれの血管内皮細胞のマイクロ RNA の発現もアレイにより網羅的に解析する。Gene ontology 解析及び KEGG pathway 解析を用いて TEC 特異的な発現遺伝子及びマイクロ RNA の役割を知り、標的遺伝子を抽出する。加えて、肝細胞癌患者の肝切除組織から TEC 及び周囲肝臓血管内皮細胞を cell sorting により単離し、それぞれの遺伝子発現及びマイクロ RNA 発現をリアルタイム PCR で解析し、臨床的な妥当性も担保する。以上の実験により TEC と周囲正常臓器血管内皮細胞の肉眼的及び遺伝子的違いが明らかになる。

2. TEC 特異的且つ治療標的となり得るマイクロ RNA の探索

上記 1 の結果、TEC 特異的なマイクロ RNA が抽出されており、その中で治療標的となり得るマイクロ RNA を選別する。マイクロ RNA はそれぞれの標的遺伝子を抑制的に制御する事が知られており、本研究においては特に TEC 特異的に発現が低下しているマイクロ RNA に注目する。発現が低下したマイクロ RNA により、その標的遺伝子の発現が増加する為である。

血管内皮細胞の細胞株(HUVEC)及び肝臓の血管内皮細胞の初代培養細胞を用いた in vitro の系で治療標的となり得るマイクロ RNA を選定する。即ち、上記 1 の結果のマイクロ RNA アレイから変動の大きい複数のマイクロ RNA を選び、それぞれの inhibitor を培養血管内皮細胞に作用させ、cell proliferation assay, wound healing assay, tube formation assay を行う。本実験により TEC の増殖、血管形成促進に関わる特異的且つ重要なマイクロ RNA が選定される。

TEC 特異的なマイクロ RNA を選定した後に、それらを過剰発現させた HUVEC を作製し、遺伝子発現の網羅的解析を行う。Ingenuity pathway 解析を行い特定のマイクロ RNA が標的とする重要な遺伝子を探索する。

3. TEC 特異的マイクロ RNA の補充による血管新生抑制治療の確立

単離した TEC を培養し、選定したマイクロ RNA を細胞内に導入する事で、TEC としての性質が失われる事を in vitro の実験系で評価する。加えて、in vivo の実験系で上記実験 2 の結果得られた特定のマイクロ RNA の補充により、TEC のみ抑制され、周囲正常臓器の血管内皮細胞が抑制されていない事を確認する。加えて腫瘍増大を抑制するかどうかについても検証する。確認の為に、whole-mount staining 法を用いた免疫染色法を行い、それぞれの血管、微小環境、血管周囲の構成細胞を評価する。

4. 研究成果

1. 腫瘍血管内皮細胞(TEC)と周囲肝臓の血管内皮細胞(LSEC)の肉眼的・機能的・遺伝子学的違いを明らかにした。

➢TEC 及び LSEC の肉眼的・機能的相違の評価

肝細胞癌に新生した癌血管(TEC)は肝臓血管に比べ、幼若で血管径のばらつきが大きく無秩序に新生した血管であり、漏出性が高く・灌流性の低い無機能血管である事が分かった。

➢TEC 及び肝類洞血管(LSEC)の遺伝子学的相違の評価

予備実験から 260 個の TEC 特異的遺伝子を選定していたが、これらの遺伝子の Gene Ontology 解析を行ったところ、TEC は明らかに増殖能・血管新生能・抗アポトーシス能に関連する遺伝子が活性化している事が分かった。

加えて、TEC 特異的なマイクロ RNA を抽出するべく、マイクロ RNA アレイを行い TEC 特異的なマイクロ RNA を選定したところ、最も発現低下を認めた 10 個の TEC 特異的マイクロ RNA を選定した(図 2B)。選定された 10 個の TEC 特異的マイクロ RNA をリアルタイム PCR を用いて発現低下の検証を行い、最終的に 5 つの重要な TEC 特異的マイクロ RNA を同定する事に成功した。

2. 同定した 5 つの TEC 特異的マイクロ RNA から治療標的となり得るマイクロ RNA を探索した。

➢血管内皮細胞株に対して、同定した 5 つの TEC 特異的マイクロ RNA 抑制剤を添加し、管腔形成アッセイを行ったところ、二つの TEC 特異的マイクロ RNA により著明に管腔形成が亢進した。また、この 2 つのマイクロ RNA を同時に発現低下させると、更に管腔形成が亢進する事を確認した。つまり、この 2

つのマイクロ RNA が癌血管新生に重要なマイクロ RNA である事を示唆した。

3. 2 つの TEC 特異的マイクロ RNA を標的とした癌血管新生抑制治療の確立

血管内皮細胞株に対して TEC 特異的マイクロ RNA をそれぞれ遺伝子導入し過剰発現させ、管腔形成アッセイを行ったところ、著明に管腔形成が抑制される事が確認された。この結果は同定した 2 つの TEC 特異的マイクロ RNA の治療標的としての可能性を示唆している。

これらの実験結果をもとに、肝細胞癌同種同所移植モデルマウスを用いて、TEC 特異的マイクロ RNA を遺伝子導入したところ、癌は著明に縮小された。その縮小には癌血管の著明な抑制が関与していた。一方で、正常な肝臓血管の抑制は認めなかった。これらの実験により、癌血管特異的マイクロ RNA の遺伝子導入により正常臓器血管には影響せず癌血管のみを抑制する事ができる事が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岩本英希
2. 発表標題 Fatty liver environment confers antiangiogenic drug resistance to hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer of colorectal cancer through activation of lipid dependent metabolic pathway
3. 学会等名 アメリカ肝臓学会年次総会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本英希
2. 発表標題 Exploration of the specific microRNA in tumor endothelial cell of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 アメリカ肝臓学会年次総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本英希
2. 発表標題 Nvel anti-angiogenic therapy using tumor endothelial cell-specific microRNAs in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 日本肝臓学会国際肝臓会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------