

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15354

研究課題名（和文）血管擬態の抑制を機序とする新規抗がん薬の開発に向けた基礎的検討

研究課題名（英文）Foundational investigation for development of new cancer drug based on blockage of vasculogenic mimicry

研究代表者

西中 崇（Nishinaka, Takashi）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50786184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：終末糖化産物(AGEs)は、加熱調理した食品に含まれ、生体内でも産生される物質であり、高血糖状態や老化に伴い生体内に蓄積する。本研究では、がん細胞自体が血管様構造を形成する血管擬態をAGEsが促進することを見出した。さらに、AGEsは抗腫瘍免疫応答に関わる細胞内シグナルを調節することを示した。これらAGEsによる作用には、AGEsが結合するスカベンジャー受容体が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの進展や治療応答性に関わる血管擬態の形成や抗腫瘍免疫応答の制御因子としてのAGEsの新しい役割を示した。その機序としてAGEsが作用するスカベンジャー受容体を見出しており、これを切り口にして新たながん治療薬開発の確立に寄与することが期待される。また、生体内のAGEs量は食事を含めた生活習慣と密接に関係することが知られている。本研究結果は、がんの進展と生活習慣を結びつける科学的根拠を示し、生活改善に向けた取り組みの重要性を改めて強調するものである。

研究成果の概要（英文）：Advanced glycation end products (AGEs) which are abundant in cooked foods and intravitaly produced under several condition such as high glucose, are accumulated in body with aging. In the present study, we found that AGEs accelerate vasculogenic mimicry which tumor cell itself forms vessel-like structure. In addition, AGEs are associated with the regulation of intracellular signaling related to the response to antitumor immunity. These effects of AGEs are mediated by scavenger receptor bound in AGEs.

研究分野：血管、腫瘍、自然免疫

キーワード：終末糖化産物 血管擬態 抗腫瘍免疫 マクロファージ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん薬物治療における抗血管新生療法は、血管内皮細胞による血管形成を抑制し、栄養ルートを絶つことによってがん進展を抑制する画期的な治療法である。しかし、がん細胞は自ら血管様の管腔構造を形成し、積極的に栄養を確保することが分かってきた。この血管擬態(vasculogenic mimicry, VM)は、正常な血液循環と開通することによって、がん細胞に栄養が送られ、がん細胞は VM を介して転移ことが示唆されている。さらに、がん組織で形成された VM は既存の抗血管新生療法に抵抗性を示すため、今後のがん治療薬開発の標的に位置づけられている。

AGEs は還元糖とタンパク質の非酵素的糖化反応により最終的に生じた物質の総称である。この反応はメイラード反応と呼ばれ、食品の加熱調理や生体内でも起こることが確認されている。高血糖状態や老化に伴い、組織や細胞に AGEs の蓄積が観察され、これが組織障害へとつながることが示唆されている。これまでに、組織再生の観点からマクロファージ(MΦ)と血管内皮細胞に対する AGEs の影響について解析を行い、AGEs による自然免疫応答の調節作用、異常な血管新生の誘導作用を見出した。これらの作用には AGEs が作用する複数の受容体が関与していることも明らかにしており、AGEs を標的とした治療法確立に有用な知見を得ている。

ヒトがん組織において、AGEs が検出されている。これまでに腫瘍組織の AGEs はがん細胞に対して増殖促進作用を示すことが報告されている。しかし、VM 形成に対する AGEs の関与については不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、VM 形成に対する AGEs の役割を明らかにするために AGEs とその受容体の関与について検討を行った。さらに、がん微小環境におけるがん細胞-免疫細胞間に作用する細胞内シグナルであり、抗腫瘍免疫との関係が報告されている STING シグナルに対する AGEs の影響について解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) AGEs の調製

AGEs は、ヒト血清アルブミン(HSA)と各種カルボニル化合物(AGE1: グルコース、AGE2: グリセルアルデヒド、AGE3: グリコールアルデヒド、AGE4: メチルグリオキサール、AGE5: グリオキサール)を 37°C でインキュベートして調製した。4°C にてリン酸緩衝液で透析を行い、未反応のカルボニル化合物を除去した。

#### (2) 管腔形成 in vitro モデル

96 ウェルプレートあるいは  $\mu$ -slide(Ibidi)のウェルにマトリゲルを添加してゲルを作成し、その上に各種がん細胞株(マウス由来: Colon-26、ヒト由来: NCI-H446、MDA-MB-231)を播種することによる細胞培養系管腔形成モデルを使用した。管腔形成の形態は、Calcein AM と反応させることで蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡で解析した。

#### (3) STING シグナルの解析

ヒト単球系細胞株 THP-1 は、ホルボールエステルを処置して M $\phi$  様細胞に分化させた。STING シグナルを活性化させるために、STING アゴニストである cyclic GMP-AMP (cGAMP) は、トランスフェクション試薬を用いて細胞内に取り込ませた。STING シグナルを構成する TBK1/IRF3 のリン酸化を Western blot 法、サイトカイン・ケモカインの発現を real-time RT-PCR 法ならびに ELISA 法を用いて解析した。

#### (4) 分子間相互作用解析

表面プラズモン共鳴に基づく分子間相互作用解析は Biacore X100(Citiva)を用いて行った。CM5 センサーチップにヒトリコンピナント STING タンパク質(Cayman)または HSA を固定した。HSA を固定したチップは 100 mM glycolaldehyde を 7 日間 37°C でインキュベートした。測定は、温度 25°C、流速 30  $\mu$ L/min の条件で行い、ランニング緩衝液には PBS-P を使用した。

#### (5) cGAMP 細胞内取り込みの評価

Fluor-2'3'-cGAMP(c[3'-Fluo-AHC-G(2',5')pA(3',5')p])、Biolog)を細胞に処置して細胞内取り込みを解析した。共焦点レーザー顕微鏡(C2、ニコン)あるいはフローサイトメーター FACSCantoII (BD)を用いて蛍光シグナルを測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) AGEs による VM 形成の促進作用

Colon-26 細胞において AGEs は用量依存的に VM 形成を促進した。AGEs による VM 促進作用は、スカベンジャー受容体のリガンドである Fucoidan の処置によって抑制された(図 1)。一方、AGEs 受容体である RAGE や TLR4 の各種アンタゴニスト

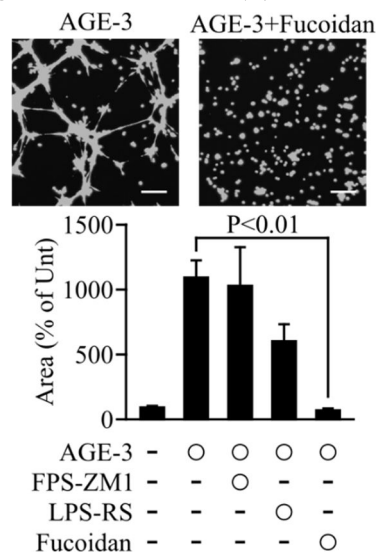


図 1. AGE3 による VM 形成促進作用に対する AGEs 受容体阻害薬の影響

(FPS-ZM1、LPS-RS)はAGEsによるVM形成促進作用には影響しなかった。よって、AGEsによるVM促進作用にはスカベンジャー受容体が関与していることが示唆された。ヒトがん細胞株(NCI-H446、MDA-MB-231)においてVM形成を解析する実験系を確立した。

## (2) AGEsによるSTINGシグナルの調節作用

小胞体に発現しているSTINGタンパク質は、セカンドメッセンジャーであるcGAMPが結合すると活性化し、下流シグナルであるTBK1/IRF3をリン酸化する。グルコース由来のAGE1はcGAMPによるTBK1/IRF3のリン酸化を増強した。反対に、その他のAGE2-AGE5は、TBK1/IRF3のリン酸化を抑制した(図2)。STINGシグナルを抑制するAGEsは、アルブミン中のリジン残基とアルギニン残基が各種カルボニル化合物によって高い修飾を受けていた。AGEs調製に使用するカルボニル化合物の濃度によるSTINGシグナルに対する影響を解析したところ、カルボニル化合物の濃度依存的にSTINGシグナルの抑制作用を示した。

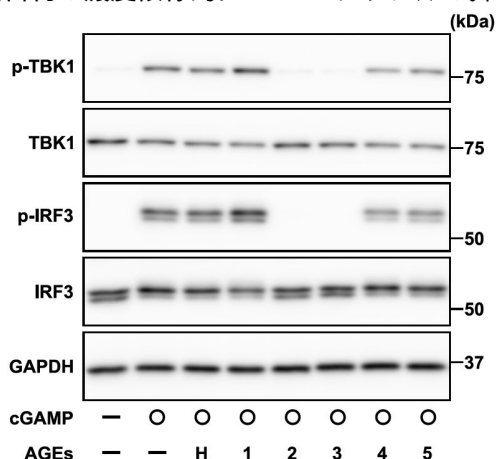


図2. cGAMPによるTBK1/IRF3リン酸化に対する各種AGEsの影響

HSA(コントロール、アルブミン)  
AGE1(グルコース)  
AGE2(グリセルアルデヒド)  
AGE3(グリコールアルデヒド)  
AGE4(メチルグリオキサール)  
AGE5(グリオキサール)

## (3) AGE3(glycol-AGE)によるSTINGシグナル抑制機序

STINGシグナルに対して抑制作用を示したglycol-AGE(AGE3)に着目して、詳細な解析を行った。cGAMPは細胞膜を通過できないため、実験ではトランスフェクション試薬(FuGENE HD)を用いて細胞内に導入している。cGAMPとFuGENE HDの複合体は、ナノスケールの粒子を形成し、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる。Glycol-AGEはスカベンジャー受容体が関与するエンドサイトーシスによって取り込まれることから、cGAMP細胞内取り込みを評価した。蛍光標識cGAMPは、FuGENE HDと共処置することで細胞内取り込み量が増加した。Glycol-AGEを処置した場合も細胞内に蛍光シグナルが観察されたことから、glycol-AGEはcGAMPの細胞内取り込みには影響しないことが示唆された(図3)。

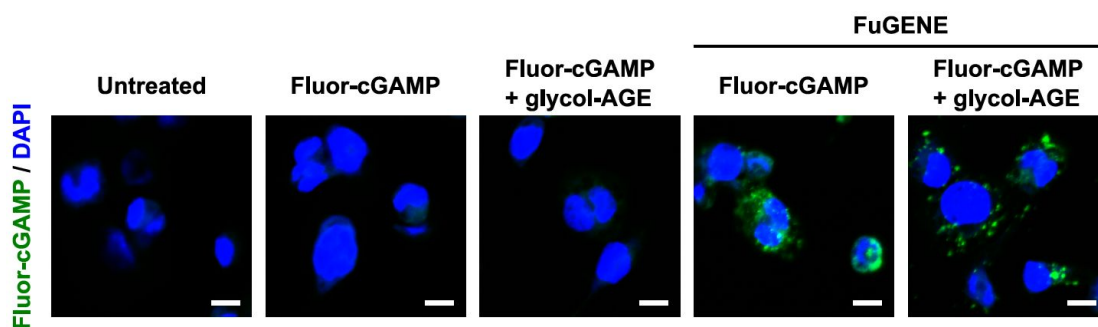


図3. cGAMP細胞内取り込みに対するglycol-AGEの影響

Glycol-AGEは細胞内でSTINGに直接結合することで下流のシグナルを抑制しているかを検証するために、表面プラズモン共鳴法を用いてglycol-AGEとSTING間の相互作用を解析した(図4)。コントロールとして、測定チップに結合させたSTINGタンパク質に対して、cGAMPを作用させると用量依存的に相互作用を示すResponseシグナルの増加が観察された。しかし、glycol-AGEとSTING間ではResponseシグナルが認めれないことから、glycol-AGEとSTINGは相互作用しないことが示唆された。AGEs受容体であるRAGEとglycol-AGEが相互作用することを確認している。よって、glycol-AGEはSTINGを直接結合することなく下流のシグナルを抑制することが考えられた。

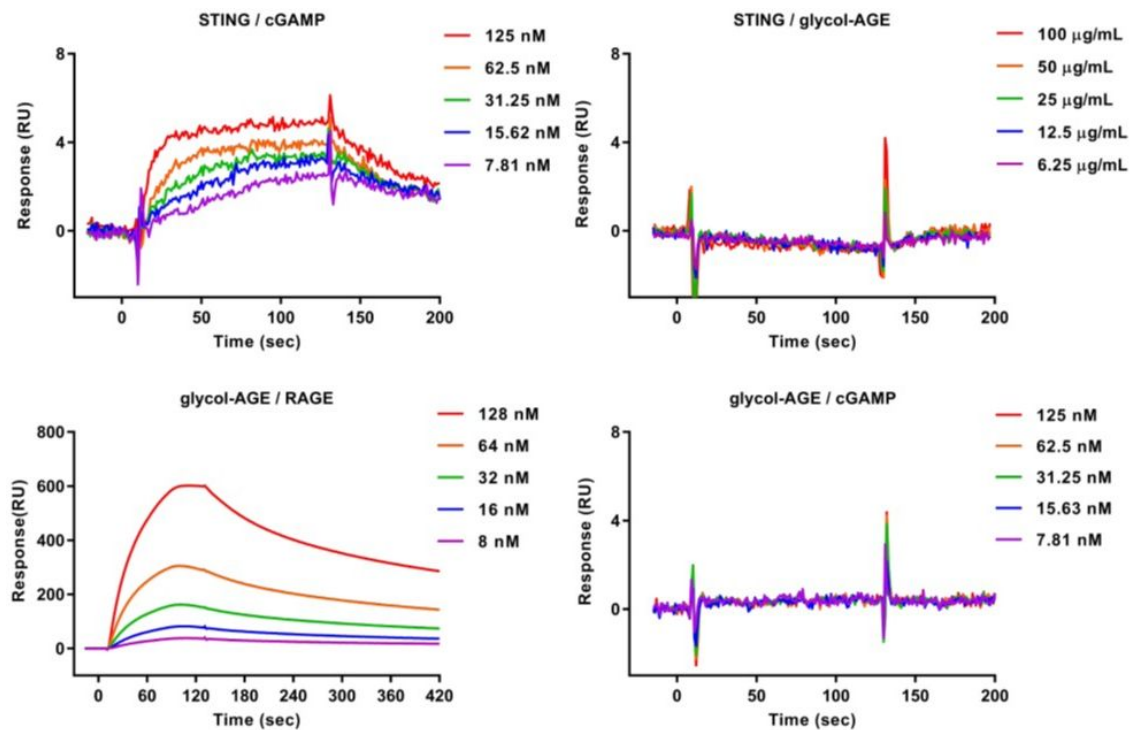


図 4. 表面プラズモン共鳴法による glycol-AGE/STING 間相互作用の解析

Glycol-AGE による STING シグナルの抑制作用は、スカベンジャー受容体 CD36 の中和抗体の処置によって抑制された。一方、receptor for AGE (RAGE)阻害薬である FPS-ZM1 と toll like receptor 4 (TLR4)阻害薬である LPS-RS は、glycol-AGE による STING 抑制作用には影響しなかった。よって、glycol-AGE は CD36 を介して STING シグナルを抑制することが示唆された(図 5)。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

がん組織における VM 形成は、1999 年に Hendrix らによって報告された現象であり、血管内皮細胞による血管新生と比較して、VM 形成機序に関する知見は少ない。これまでのがん組織の AGEs はがん細胞の増殖に作用することが報告されていたが、本研究成果より AGEs が VM 形成促進作用を示すことを見出し、がん組織における AGEs の新しい役割の可能性を示した。さらに、がん免疫療法として STING アゴニストの開発が進んでいるが、AGEs の蓄積しているがん組織では STING シグナルが抑制され、がん免疫療法が治療効果を示さないことが推測される。スカベンジャー受容体を切り口にして AGEs の効果を減弱できる可能性があることから、本研究成果は新たながん治療薬開発の確立に寄与するものと考えられる。また、生体内の AGEs 量は食事を含めた生活習慣と密接に関係することが知られている。本研究成果は、がんの進展と生活習慣を結びつける科学的根拠を示し、生活改善に向けた取り組みの重要性を改めて強調するものである。

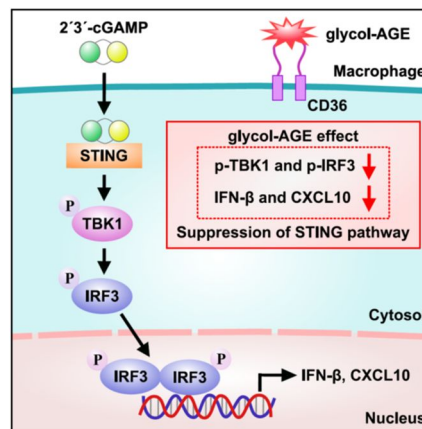


図 5. Glycol-AGE による STING シグナルの抑制機序

#### 引用文献

Different modulation of STING/TBK1/IRF3 signaling by advanced glycation end products. Nishinaka T, Hatipoglu OF, Wake H, Watanabe M, Toyomura T, Mori S, Nishibori M, Takahashi H. Arch Biochem Biophys. 2023. 750:109808. doi: 10.1016/j.abb.2023.109808.

Glycolaldehyde-derived advanced glycation end products suppress STING/TBK1/IRF3 signaling via CD36. Nishinaka T, Hatipoglu OF, Wake H, Watanabe M, Toyomura T, Mori S, Nishibori M, Takahashi H. Life Sci. 2022. 310:121116. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121116.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Takahashi Hideo, Nishibori Masahiro, Mori Shuji	4. 巻 71
2. 論文標題 Cationic ribosomal proteins can inhibit pro inflammatory action stimulated by LPS+HMGB1 and are hindered by advanced glycation end products	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology and Applied Biochemistry	6. 最初と最後の頁 264 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bab.2538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Wake Hidenori, Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Mori Shuji, Nishibori Masahiro, Takahashi Hideo	4. 巻 750
2. 論文標題 Different modulation of STING/TBK1/IRF3 signaling by advanced glycation end products	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109808 ~ 109808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2023.109808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hatipoglu Omer Faruk, Nishinaka Takashi, Nishibori Masahiro, Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Mori Shuji, Yaykasli Kursat Oguz, Wake Hidenori, Takahashi Hideo	4. 巻 151
2. 論文標題 Histamine promotes angiogenesis through a histamine H1 receptor-PKC-VEGF-mediated pathway in human endothelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 177 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.02.006	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 Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Wake Hidenori, Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Mori Shuji, Nishibori Masahiro, Takahashi Hideo	4. 巻 310
2. 論文標題 Glycolaldehyde-derived advanced glycation end products suppress STING/TBK1/IRF3 signaling via CD36	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 121116 ~ 121116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2022.121116	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 Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Ikegami Ryo, Suwaki Yui, Sada Minami, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Takahashi Hideo, Nishibori Masahiro, Mori Shuji	4. 巻 49
2. 論文標題 Nordihydroguaiaretic acid inhibits glyoxalase I, and causes the accumulation of methylglyoxal followed by cell-growth inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 10499 ~ 10507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-07929-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Takahashi Hideo, Nishibori Masahiro, Mori Shuji	4. 巻 49
2. 論文標題 Identification of ribosomal protein L9 as a novel regulator of proinflammatory damage-associated molecular pattern molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 2831 ~ 2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-021-07096-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Yui, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Liu Keyue, Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Mori Shuji, Yoshino Tadashi, Nishibori Masahiro, Takahashi Hideo	4. 巻 408
2. 論文標題 Involvement of multiple scavenger receptors in advanced glycation end product-induced vessel tube formation in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112857 ~ 112857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatipoglu Omer Faruk, Uctepe Eyyup, Opoku Gabriel, Wake Hidenori, Ikemura Kentaro, Ohtsuki Takashi, Inagaki Junko, Gunduz Mehmet, Gunduz Esra, Watanabe Shogo, Nishinaka Takashi, Takahashi Hideo, Hirohata Satoshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Osteopontin silencing attenuates bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111633 ~ 111633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.111633	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

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西中崇、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 自然免疫シグナルSTINGの活性制御に対する終末糖化産物の関与
3. 学会等名 第143回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西中崇、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 Glycolaldehyde由来の終末糖化産物による自然免疫応答の低下作用
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西中崇、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 終末糖化産物によるSTINGシグナルの調節はカルボニル化合物の種類や濃度に依存する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、西中崇、ハティポール オメル ファルク、高橋英夫
2. 発表標題 高ヒスチジン糖タンパク質は好中球恒常性維持に寄与する多面的機能を有する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ハティポール オメル ファルク、西中崇、和氣秀徳、西堀正洋、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、高橋英夫
2. 発表標題 TNF はインテグリン 3- 8を介して血管内皮細胞の管腔形成を促進する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西中崇、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 Glycolaldehyde derived advanced glycation end products suppress STING signaling in macrophage
3. 学会等名 第52回日本免疫学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡邊政博、豊村隆男、和氣秀徳、西中崇、ハティポール オメル ファルク、高橋英夫、西堀正洋、森秀治
2. 発表標題 抑制性DAMPsとしてのリボソーム構成分子RPL9の同定
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西中崇、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 終末糖化産物によるSTINGシグナルの調節
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 ハティポール オメル ファルク、西中崇、西堀正洋、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫
2. 発表標題 ヒスタミンは血管内皮細胞の管腔形成を促進する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、ハティポール オメル ファルク、西中崇、高橋英夫
2. 発表標題 高ヒスチジン糖タンパク質の抗酸化能は敗血症病態改善に寄与する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西中崇、北浦淳寛、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 マクロファージによるLPS細胞内取り込みに対する終末糖化産物の影響
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ハティポール オメル ファルク、Bilgic Dilek Gun、西中崇、和氣秀徳、廣畑聡、高橋英夫
2. 発表標題 ADAMTS5の発現はヒト軟骨肉腫細胞においてNF- $\kappa$ Bによってアップレギュレートされる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、西中崇、ハティポール オメル ファルク、高橋英夫
2. 発表標題 敗血症病態改善作用を有する高ヒスチジン糖タンパク質の抗酸化能
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森秀治、渡邊政博、和氣秀徳、西中崇、ハティポール オメル ファルク、高橋英夫、西堀正洋、豊村隆男
2. 発表標題 終末糖化産物による LPS - HMGB1共刺激炎症応答の相乗的活性化作用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西中崇、ハティポール オメル ファルク、和氣秀徳、渡邊政博、豊村隆男、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 マクロファージにおけるSTING経路に対する終末糖化産物の影響
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

薬理学教室 | 近畿大学医学部・大学院医学研究科  
<https://www.med.kindai.ac.jp/laboratory/pharmacology/>  
 近畿大学医学部薬理学教室  
<https://www.med.kindai.ac.jp/pharma/>

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