

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701054

研究課題名(和文)腫瘍血管新生の「引き金」となる新規マイクロRNAの同定と解析

研究課題名(英文) microRNA-125b inhibits tumor vascular formation through translational suppression of VE-cadherin

研究代表者

木戸屋 浩康(Kidoya, Hiroyasu)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00543886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAs(miRNA)は様々な生体現象に働く事が解明されつつあるが、腫瘍血管でもmiRNAによる遺伝子発現制御が起きている可能性がある。

我々は腫瘍血管に特異的に発現するmiRNAを探索し、mir-125bを同定した。血管形成への関与を解析した結果、mir-125bはVE-cadherinの翻訳を阻害し、血管新生を制御することが解った。また、担癌マウスに対するmir-125bの導入が、腫瘍内の血管形成を阻害し腫瘍増殖を抑えた。以上の結果からmir-125bは腫瘍血管新生におけるNegative regulatorとして機能していると推測でき、新規治療法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs(miRNAs) are endogenously expressed small non-coding RNAs that function as negative regulators of gene expression. Posttranscriptional regulation by miRNAs is important for many aspects of development and disease. Several miRNAs are highly expressed in endothelial cells. Whereas the specific functions of miRNAs for tumor angiogenesis are less clear.

Here, we identified miRNAs that were enriched in endothelial cells derived from LLC tumor. We found that miR-125b regulated the expression of endothelial cell adherent protein VE-cadherin. Additionally, overexpression of miR-125b in endothelial cells resulted in inhibition of proliferation, tube formation and migration activity. Furthermore, in vivo transfection of miR-125b in subcutaneous implanted LLC tumor, inhibited neo vascular formation and suppressed tumor growth.

These findings illustrate that miR-125b act as negative regulator of tumor angiogenesis and providing a new target for modulating vascular formation and function.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：マイクロRNA 血管新生 細胞接着 癌治療 核酸医薬

### 1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の増大と血管新生は密接に関連していることが知られており、これまで血管新生を対象とした癌研究が盛んに行われてきた。しかし、抗腫瘍血管新生の切り札として期待されていた VEGF 中和抗体を持ってしても、臨床的にはその効果が限定的で、新たな概念に基づく血管新生抑制剤の開発が待望されている (Grothey A, and Galanis E. Nat Rev Clin Oncol. 2009)。他方、マイクロ RNA(miRNA)とは小さな機能性 RNA 遺伝子であり、相補的塩基配列を持つ mRNA に結合して、その分解や翻訳を抑制することにより、遺伝子発現を制御している。興味深い点として、miRNA の標的は 1 つではなく複数の遺伝子を標的とする場合があり、生命現象における遺伝子発現変化を広範囲にわたって調整している。近年、miRNA が細胞機能に重要な役割を担っていることが明らかになり、癌の機能にも密接に関わっていることが示されている (Croce CM. Nat Rev Genet. 2009)。

### 2. 研究の目的

腫瘍の増殖における血管新生の必要性は一般的に知られるようになっており、臨床においても腫瘍血管を標的とした薬剤(VEGF 抗体など)が利用されるに至っている。しかし、その効果は限定的であり、さらなる改良や応用が求められている。本研究は、近年、注目を集めているマイクロ RNA に注目し、新しい概念に基づく腫瘍血管制御法の開発を目指して、基礎的な研究を行う。マイクロ RNA は細胞機能を幅広く制御しており、腫瘍血管内皮においても血管新生の「引き金」として機能している可能性がある。

### 3. 研究の方法

マイクロ RNA による血管新生制御機構を明らかにするために、まず、腫瘍血管内皮に特異的な miRNA を網羅的な発現解析により探索した。その結果を基に、より詳細な発現解析を進め、血管新生を制御する miRNA を選別し、候補を同定した。その後、同定した miRNA について、実際に血管新生へ関与しているかを培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* の系にて検討し、スクリーニングを行った。その結果、血管新生への関与が強いと期待される miRNA については、miRNA の標的遺伝子の探索を行い、分子機構を詳細に解明した。また、癌治療への応用の可能性について検討するため、担癌マウスを用いた miRNA の阻害実験にて抗腫瘍血管新生効果の検討を行った。

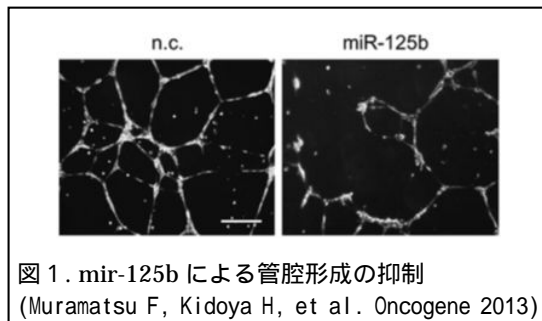
### 4. 研究成果

我々は腫瘍血管に特異的に発現しているマイクロ RNA(miRNA)を同定するため、Lewis lung carcinoma (LLC)細胞をマウスへ微静脈から移植し、肺に生着して増殖した腫瘍から CD31 陽性 CD45 陰性の血管内皮細胞をセルソ

ーターを用いて回収した。また、比較対象として正常肺由来の血管内皮細胞も同様の方法にて回収し。両者の比較によるマイクロ RNA 解析を行った。その結果、mir-23a、mir-30d、mir-125b、mir-126、mir-341、mir-696 といった幾つかの miRNA の発現が腫瘍血管内皮で変化していることが明らかとなった。

これらの発現変化が認められた miRNA に対して、Real-time PCR による確認実験、および他組織や腫瘍細胞との発現量の比較などを行った。その結果、腫瘍血管内皮に特異的に著しい発現上昇が認められた mir-125b を有力な候補 miRNA として同定した。実際に mir-125b が血管形成においてどのような活性があるかを解析するため、まず *in vitro* にて培養血管内皮細胞を用いた解析にて検討を行った。まず、mir-125b を過剰発現させたところ、血管内皮細胞の増殖、管腔形成、遊走活性を阻害することが明らかとなった (図 1)。さらに、データベース上から mir-125b が標的とする遺伝子の探索を行った結果、血管内皮細胞の細胞間接着に働く「VE-cadherin」を候補遺伝子として選定できた。実際に、培養血管内皮細胞に対して mir-125b を過剰発現させることによって VE-cadherin の発現量が減少することが確認され、mir-125b を介した血管新生の制御機構が明らかになった

また、mir-125b を標的とする新薬開発の可



能性を検討するため、LLC 癌細胞または Murine Colon carcinoma (colon26) 癌細胞を皮下移植することによって作成したマウス担癌モデルを用いて検討を行った。その結果、腫瘍血管へ mir-125b を過剰発現させる事によって、腫瘍中の機能的な血管の数が減少し、腫瘍の増殖が抑制できることが明らかとなった (図 2)。一方で、mir-125b の阻害剤でも投与時期や投与回数を変更する事で血管数の減少と腫瘍増殖の抑制効果が認められた。以上の結果から、mir-125b は血管の形成過程で特異的に発現し、VE-cadherin を抑制することによって新生血管の発芽を促進させる「引き金」として機能していることが示された。

本申請研究では、腫瘍血管内皮細胞の異常性を引き起こす miRNA として mir-125b を世界に先駆けて発見し、その解析を行った。miRNA に関する研究は様々な分野で進めら

れており、癌研究の分野においてもその重要性が認識され始めている。本研究にて同定された mir-125b は、腫瘍中の血管内皮細胞に対して、血管新生の発芽を促すような「引き金」として働く miRNA であると考えられ、これまでの血管新生抑制剤とは全く異なるコンセプトに基づく抗癌剤の開発に繋がると期待できる。また、mir-125b は癌以外の様々な条件下での血管形成に貢献している可能性も高く、血管新生の新たな制御方法として、癌以外の各種血管新生病の治療にも多大影響を与えると考えられる

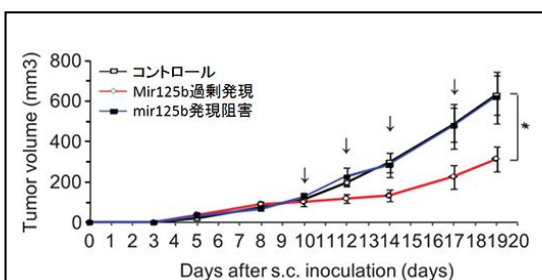


図 2. mir-125b の過剰発現による腫瘍抑制 (Muramatsu F, Kidoya H, et al. Oncogene 2013)

## 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 17 件)

Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*. 2012 Jul 5;31(27):3254-64. doi: 10.1038/onc.2011.489. 査読有

Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J*. 2012 Feb 15;31(4):842-55. doi: 10.1038/emboj.2011.465. 査読有

Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development*. 2012 Apr;139(7):1327-35. doi: 10.1242/dev.072330. 査読有

Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Sakimoto S, Takakura N. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene*. 2013 Jan 24;32(4):414-21. doi: 10.1038/onc.2012.68. 査読有

Kidoya H, Takakura N. Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *J*

*Biochem*. 2012 Aug;152(2):125-31. doi: 10.1093/jb/mvs071. 査読有

Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes*. 2013 Jun;62(6):1970-80. doi: 10.2337/db12-0604. 査読有

Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature*. 2013 Mar 28;495(7442):524-8. doi: 10.1038/nature11930. 査読有

Kawahara H, Naito H, Takara K, Wakabayashi T, Kidoya H, Takakura N. Tumor endothelial cell-specific drug delivery system using apelin-conjugated liposomes. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e65499. doi: 10.1371/journal.pone.0065499. Print 2013. 査読有

[学会発表](計 10 件)

Hiroyasu Kidoya. Keystone Symposia meeting on: Metabolism and Angiogenesis. Role of apelin-APJ system in regulation of tumor vascular normalization. March 16-21, 2014. Whistler Conference Centre, Whistler, British Columbia, Canada.

Hiroyasu Kidoya. microRNA-125b inhibits tumor vascular formation through translational suppression of VE-cadherin. がん支援冬期シンポジウム、2014年1月30日31日、東京都・千代田区

Hiroyasu Kidoya. 血管の「質」と「構造」を制御する分子機構 -Molecular mechanisms of blood vessel maturation and remodeling. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日-6日兵庫県・神戸市

Hiroyasu Kidoya. Tumor vessel maturation by apelin/APJ system improves the efficiency of immunotherapy. The European Cancer Congress 2013. 2013年9月27日-10月1日、オランダ・アムステルダム

Hiroyasu Kidoya. Regulation of vascular maturation by apelin-APJ and its application for angiogenic therapy. 第20回日本血管生物医学学会学術集会 The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology、2012年12月5日-7日、徳島

Hiroyasu Kidoya. Role of secreted frizzled-related protein-1 in tumor angiogenesis. 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19日-21日、ポスター

Hiroyasu Kidoya. Maturation Of The Tumor Blood Vessels Induced By Apelin/APJ System Improves The Efficiency Of Immunotherapy. Cell symposia:

Angiogenesis, Metabolic Regulation, and Cancer Biology in association with VIB. July 6 - 8, 2012. Katholieke Universiteit, Leuven, Belgium.

木戸屋浩康、血管成熟化因子「Apelin」を用いた、新概念の血管再生療法の開発、第49回日本臨床分子医学会学術集会、2012年4月13日-14、京都

Hiroyasu Kidoya. Maturation of the tumor blood vessels induced by apelin/APJ system improves the efficiency of immunotherapy. The Second Pacific Symposium on Vascular Biology. Oct. 30-Nov. 2, 2011. Jeju Island, Korea.

Hiroyasu Kidoya. microRNA-125b inhibits tumor vascular formation through translational suppression of VE-cadherin. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology. August. 24-27, 2011. Busan, Korea.

〔図書〕(計1件)

村松史隆, 木戸屋浩康, 高倉伸幸、メディカルレビュー社、血管医学、2013、14

〔その他〕

ホームページ等

微生物病研究所ホームページ

[http://st.biken.osaka-u.ac.jp/member/ki\\_doya.html](http://st.biken.osaka-u.ac.jp/member/ki_doya.html)

大阪大学 研究者総覧

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=7708>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木戸屋 浩康 (KIDOYA, hiroyasu)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00543886