

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670731

研究課題名(和文) CD36を標的としたがん治療の創薬開発

研究課題名(英文) Innovation of drug discovery targeting CD36

研究代表者

宮本 新吾 (Miyamoto, Shingo)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40209945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん増殖に関わる分子機構は成人病疾患発生の分子機構と類似していることが報告されています。本来、がん治療の標的分子であるHB-EGFは動脈硬化にも深くかかわる分子で、脂質代謝に関わる酸化LDL-CD36-PPAR の伝達経路の活性化が HB-EGFの発現亢進を制御することを明らかにしています。そこで、本研究では、CD36の卵巣癌症例における発現を検証するとともに、CD36の機能を抑制する中和抗体薬を作製してがん治療薬の創薬開発を行うことです。本研究の成果は、新規標的治療薬の開発となることだけでなく、HB-EGF特異的抑制剤BK-UMとの併用療法による相乗的治療効果が期待されます。

研究成果の概要(英文)：It is reported that the molecular mechanism about cancer proliferation resembles molecular mechanism of the geriatric diseases disease outbreak. HB-EGF which is target molecules of the cancer treatment originally clarifies that the activation of the transmission course of oxidation LDL-CD36-PPAR concerned with lipid metabolism with the molecules which are concerned with arteriosclerosis deeply controls expression sthenia of HB-EGF. In this study, We verify the expression of CD36 in the ovarian cancer patients and am to manufacture neutralizing antibody medicine suppressing CD36, and to develop the innovative drug development of the cancer therapeutic drug. As well as the result of this study becoming the development of the new target therapeutic drug, synergistic curative effect with the combination therapy with HB-EGF-specific suppressant BK-UM is expected.

研究分野：医学、分子生物学

キーワード：卵巣癌 CD36 動脈硬化 HB-EGF BK-UM

1. 研究開始当初の背景

HB-EGF の発現制御機構を解明するため、申請者らは HB-EGF の発現制御に関わる分子として CD36 をクローニングしました。CD36 は酸化 LDL と結合し Src 活性化 Ectodomain Shedding による HB-EGF 分泌亢進 転写因子 NRF2 により HB-EGF 発現亢進とともに PPAR α の活性化より CD36 自己の発現を急増させます (HB-EGF 及び CD36 の Autocrine loop の増強)。一方、HB-EGF は EGFR に結合して ERK・AKT を活性化し HB-EGF の Autocrine Loop を亢進させるとともに過酸化脂質の産生酵素群を活性化し酸化 LDL の産生が亢進します。すなわち、悪性腫瘍における HB-EGF 及び CD36 の自己増殖亢進機構に酸化脂質と CD36 による脂質代謝異常が大きく関わることを明らかにしています。また、卵巣癌細胞株における CD36 の発現を抑制すると SCID Mouse における腫瘍形成能や腹膜播種を抑制することや HB-EGF と PPAR α を抑制すると相乗的な抗腫瘍効果を示すことが分かっています。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌症例における組織中 CD36 発現と血清中酸化 LDL、腹水中酸化 LDL の測定を行い臨床背景との関連を検討し、CD36 の標的分子としての臨床的意義やコンパニオン診断薬開発の可能性を検討します。また、ヒト CD36 発現のマウス細胞株を作製し、CD36 の機能を抑制する中和抗体を抽出し非臨床試験までを行い、標的治療薬の創薬開発を行います。

3. 研究の方法

中和活性を保有した CD36 中和抗体の同定。

抗原提示を目的にヒト CD36 遺伝子作製および抗原提示細胞の作製

CD36 は細胞膜 2 回貫通型の受容体で、酸

化 LDL や Thrombospondin などが結合します。CD36 は細胞表面に表現されているため、中和抗体を作製することが可能です。ヒト CD36 分子発現ベクターを作製し、マウス NIH3T3 細胞に遺伝子導入します。ヒト CD36 を細胞表面に発現した NIH3T3 細胞を作製し、CB マウスの腹腔内にアジュバントとともに注入します。脾臓を摘出後に細胞をマウス形質細胞と細胞融合して Hybridoma Library を作製します。

抗体精製および CD36 に結合する抗体スクリーニング

Hybridoma により産生された抗体を精製する。ヒト CD36 遺伝子を導入したマウス NIH3T3 細胞を 96 穴のプレートに固定し、精製された抗体を加えて抗マウス二次抗体で細胞染色します。同様の操作を、CD36 を高発現したヒト卵巣癌、乳癌などの細胞株で同様の細胞染色を行い、CD36 と結合する抗体を探索・同定します。

酸化 LDL との結合を阻害する CD36 中和抗体の検出

CD36 は酸化 LDL と結合することにより、Src を介して NRF2 を活性化し、HB-EGF の転写を活性化します。本スクリーニングはこの働きを阻害する中和抗体を検索することを目的とします。HB-EGF のプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に導入します。酸化 LDL 添加による発光強度の増強が抑制にされる抗体を中和抗体とします。また、ヒト CD36 遺伝子を導入した HB-Vero 細胞 (HB-EGF と CD36 を高発現した細胞となる) に CD36 に結合する抗体をインキュベーションします。その後、酸化 LDL を加えて細胞膜表面の HB-EGF を染色します。酸化 LDL による HB-EGF 分泌を抑制する抗体を中和抗体とし、大量に精製します。

CD36 の発現および CD36 に結合する酸化 LDL の発現の検出

CD36 の発現を、卵巣癌、乳癌、胃癌以

外の悪性腫瘍の細胞株 50 株以上について解析を行い、発現の高い癌腫を同定します。CD36 の発現の高かった癌種かつ固形腫瘍を中心にヒトがん組織での CD36 の発現を Real-time PCR と免疫組織染色法で解析します。

CD36 中和抗体による抗腫瘍効果を検討した非臨床試験

皮下腫瘍の抗腫瘍効果の検討

CD36 を発現する卵巣癌・乳癌・胃癌などの細胞株(10⁷個)を用いて SCID マウスに皮下腫瘍(100mm³以上)を形成します。精製した CD36 中和抗体を 10mg/kg, 1mg/kg を週 1 回(計 4 回)静脈投与し皮下腫瘍の大きさ及びマウスの体重を毎週測定し、抗腫瘍効果を検討します。

癌性腹膜炎への抗腫瘍効果の検討

CD36 を発現する卵巣癌・乳癌・胃癌などの細胞株(10⁷個)を用いて腹腔内投与して腹腔内播種したのちに(細胞を腹腔内投与し 1 週間後より) CD36 中和抗体を 10mg/kg, 1mg/kg を週 1 回(計 4 回)腹腔内投与あるいは静脈投与して生存期間を比較検討します。

抗がん剤との併用による抗腫瘍効果

CD36 を発現する卵巣癌・乳癌・胃癌などの細胞株(10⁷個)を用いて、皮下腫瘍あるいは腹腔内播種を作製します。CD36 中和抗体を 10mg/kg, 1mg/kg を週 1 回(計 4 回)とともにそれぞれの癌腫に適応のある抗がん剤を週 1 回投与し、皮下腫瘍の大きさ及びマウスの体重を毎週測定あるいは生存期間を比較して抗腫瘍効果を検討します。

CD36 の発現および CD36 に結合する酸化 LDL の発現の検討

ヒト固形腫瘍を中心とし Real-time PCR 法や免疫組織染色法を用いて CD36 の発現の解析結果と臨床的特徴とから CD36 の臨床的意義について検討します。同時に、CD36 の高発現する悪性腫瘍について、血液検体を用

いて酸化 LDL を ELISA 法にて測定し、症例の臨床的特徴についても解析し臨床的意義についても明らかにします。

4 . 研究成果

卵巣癌組織での CD36 の発現は良性卵巣腫瘍や正常卵巣と比較し高値であり、HB-EGF の発現と相関していた。また、リガンドである、酸化 LDL は卵巣癌患者の腹水中には高濃度に存在し、これも HB-EGF との相関を認めた。その後の解析により、CD36 は活性型 HB-EGF である遊離型の HB-EGF を増加させるとともに、Src を介した細胞内シグナル伝達により、HB-EGF の転写も活性化することが証明された。shRNA 法を用いた腹膜播種モデルマウスでの検討では、CD36 の発現を抑制すると腹膜播種が減少することがわかった。そこで、糖尿病治療薬の一つであるピオグリタゾンが高濃度での使用で CD36 の転写を低下させることから、抗腫瘍薬としての効果について検討した。卵巣癌皮下移植モデルマウスで、ピオグリタゾン単独投与では抗腫瘍効果はみられなかったものの、CRM197 との併用では CRM197 単独投与と比較しても有意に抗腫瘍効果がみられた。これらの結果から、CD36 は卵巣癌における HB-EGF の転写および活性を補助的に制御しており、有効な標的分子である可能性が示唆された。

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 4 件)

1. Fukagawa S, Miyata K, Yotsumoto F, Kiyoshima C, Nam SO, Anan H, Katsuda T, Miyahara D, Murata M, Yagi H, Shirota K, Yasunaga S, Kato K, Miyamoto S, MicroRNA-135a-3p as

- a promising biomarker and nucleic acid therapeutic agent for ovarian cancer. *Cancer Science*, 108, 2017, 886-896. (査読あり)
2. Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, Fukami T, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Fukagawa S, Katsuta T, Maehara M, Kondo H, Miyahara D, Shirota K, Yoshizato T, Kuroki M, Nishikawa H, Saku K, Tsuboi Y, Ishitsuka K, Takamatsu Y, Tamura K, Matsunaga A, Hachisuga T, Nishino S, Odawara T, Maeda K, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Ohishi M, Hikita T, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E: BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: a first-in-human phase-I study. *BMC Cancer* , 17(1), 2017, 89, DOI 10.1186/s12885-017-3071-5, 2017. (査読あり)
3. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Fukagawa S, Yamada H, Kuroki M, Miyamoto S, Warburg effect regulated by amphiregulin in the development of colorectal cancer. *Cancer Medicine*, 4, 2015 , 575-587), (査読あり)
4. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Souzaki R, Taguchi T, Kuroki M, Miyamoto S: Validity of HB-EGF as Target for Human Neuroblastoma Therapy, *Anticancer Research*, 35, 2015, 4433-4440, (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 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

宮本 新吾 (MIYAMOTO Shingo)

福岡大学 医学部産婦人科学教室 教授

研究者番号 : 40209945

(2)研究分担者

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

四元 房典 (YOTSUMOTO Fusanori)

福岡大学 医学部産婦人科学教室 講師

深川 怜史 (FUKAGAWA Satoshi)

福岡大学 医学部産婦人科学教室 助教