



Title	Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大坪, 嗣輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	乙第6905号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56320
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsuguteru_Otsubo_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(歯学) 氏 名 大 坪 嗣 輝

学 位 論 文 題 名

Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy

(血管新生阻害療法のための新規標的分子の同定)

1970 年代に Judah Folkman が血管新生阻害療法という画期的な概念を提唱して以来、Napoleone Ferrara らによる血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発見、クローニングが契機となり、2004 年には、世界初の血管新生阻害剤として、抗 VEGF 中和抗体であるベバシズマブが米国食品医薬品局(FDA)に承認されるに至った。これ以降も、スニチニブやソラフェニブなどのマルチキナーゼ阻害剤を始めとして、血管新生阻害作用を謳った複数の薬剤が次々と上市または開発されてきており、現在に至るまで、血管新生阻害療法はがん薬物治療の有力な手段の一つとなっている。しかしながら、これら既存の血管新生阻害剤は、いずれも正常血管の生存にも重要な VEGF シグナルの遮断によってその薬理作用を発揮するため、その結果として、出血、血栓症、消化管穿孔、創傷治療遅延とい

った副作用を有している。また、無効例の存在や治療抵抗性の出現なども既存の血管新生阻害療法が抱える問題であり、これら諸問題を克服可能な、より安全かつ有効な新たな血管新生阻害剤の開発が望まれている。

血管新生に関する研究は長らくヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を始めとする正常血管内皮細胞 (NEC) を対象に行われてきたが、近年、正常血管と腫瘍血管は大きく異なることがわかり、腫瘍血管内皮細胞 (TEC) を対象とした研究の重要性が益々高まってきている。これまでに、いくつかの研究グループによって、NEC と TEC の違いに着目した新たな血管新生阻害剤の標的分子を同定する試みがなされてきたが、臨床上有効な標的分子の同定には未だ至っていない。この原因として、腫瘍組織中に僅かしか存在しない TEC を高純度で分離し、その機能を維持した状態で培養することが困難であることが挙げられる。

本研究では、既存の血管新生阻害剤が抱える諸問題を解決すべく、VEGF 及びその受容体以外の分子を標的とし、腫瘍血管に特異的に作用するより安全かつ有効な血管新生阻害剤の開発を目的として、マウス皮下移植腫瘍から TEC を、マウスの皮膚から NEC をそれぞれ高純度で分離、培養し、それらの遺伝子発現プロファイルを比較解析することにより、腫瘍血管特異的に発現する新規な標的分子の同定を試みた。

先ず、3 種類のヒトがん細胞 (口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3、腎明細胞癌細胞

胞株 OS-RC-2、高転移性悪性黒色腫細胞株 A375SM) のマウス皮下移植腫瘍から TEC (それぞれ Oral Ca-ECs を 2 ロット、Renal Ca-ECs を 3 ロット、Melanoma-ECs を 3 ロット) を、マウスの皮膚から NEC (Skin-ECs を 2 ロット) をそれぞれ分離培養した。分離培養後の各細胞について、血管内皮細胞、血球細胞、ヒト細胞の各マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法にて検討し、移植したヒトがん細胞やマウス由来の血球系細胞が混在していないことを確認した。また、マトリゲル中での管腔形成能を検討することで、培養後のマウス NEC 及び TEC が、それぞれ血管内皮細胞としての機能を維持していることを確認した。

次に、培養後の上記各細胞から各々抽出した RNA を用い、それぞれの遺伝子発現プロファイルを、Affymetrix 社の GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いたマイクロアレイ解析にて網羅的に比較解析した。NEC と比較して 3 種類の TEC 全てにおいて 5 倍以上発現が亢進していた遺伝子を検索した結果、180 遺伝子が抽出された。このうち、ヒト対応遺伝子の存在が確認できなかった 19 遺伝子と、定量的 RT-PCR 解析において、3 種類のうちのいずれか 1 つ以上の TEC において NEC と比較して 5 倍以上の発現亢進が認められなかった 30 遺伝子を除外した、131 個の遺伝子を新規標的候補遺伝子として選抜した。

上記 131 遺伝子について、各々 3 配列の siRNA を用いてその発現を抑制し、腫瘍血管新生において必須の機能である TEC (Melanoma-ECs) の細胞増殖と

遊走への影響を網羅的に解析した。その結果、複数の siRNA によるノックダウンによって TEC の増殖抑制が確認された遺伝子として Def6 を、遊走の抑制が確認された遺伝子として Tmem176b, Pcdhb22, Enah, Nsg1 の 4 遺伝子を見出した。

最後に、上記各遺伝子のヒトにおける腫瘍血管での発現亢進を確認するため、腎がん患者 3 名より切除された各腫瘍組織のがん部から TEC を、がん部から 5-10cm 離れた非がん部から NEC をそれぞれ分離培養し、RNA を抽出後、定量的 RT-PCR 解析を実施して、上記 5 遺伝子の発現を比較解析した。その結果、TMEM176B および DEF6 の 2 遺伝子についてのみ、全てのケースにおいて、NECと比較してTECにおいて発現亢進していることが確認された。また、各腫瘍組織から作製した病理切片について、各々の抗体を用いた免疫染色を実施した結果、TMEM176B および DEF6 について、腫瘍血管における発現亢進が蛋白質レベルでも確認された。

上記の一連の結果から、TMEM176B および DEF6 は、腎がんにおいて腫瘍血管特異的に作用する血管新生阻害剤の新規な標的分子となり得ることが世界で初めて示唆された。

DEF6 は、がん細胞の増殖や遊走の制御に関与している RAC1、CDC42、RHOA などの Rho-family GTPase の活性を調節する因子の一つであることが報告されている。また、大腸がんや乳がんにおいてその発現が上昇する例が報告

されており、がん悪性化への関与が示唆されている。今回、我々が腫瘍血管新生への DEF6 の関与を示したことから、DEF6 の発現または機能阻害を標的とした薬剤は、がん細胞への直接作用と腫瘍血管新生阻害作用とを併せ持つ効果的ながん治療薬となる可能性が示唆された。

TMEM176B については、その機能についての十分な解析はなされておらず、生理的役割が未だ不明な分子であるが、肺がんなど幾つかのがんにおいてその発現が報告されている。今回、我々が腫瘍血管新生への TMEM176B の関与を示したことから、TMEM176B の発現または機能阻害を標的とした薬剤は、DEF6 と同様、がん細胞への直接作用と腫瘍血管新生阻害作用とを併せ持つ効果的ながん治療薬となる可能性が期待できる。

なお、上記の 2 遺伝子とは異なり、NSG1、ENAH、PCDHB15 (Pcdhb22 のヒト対応遺伝子) の 3 遺伝子については、今回解析した腎がんのサンプルでは、腫瘍血管における発現亢進は確認できなかった。しかしながら、腎がん以外の腫瘍血管においてその発現が亢進している可能性があることから、がん種の検討を始めとして、更なる解析が必要と思われる。

これまでも、いくつかの研究グループが TEC と NEC の違いに着目し、TEC 特異的に発現する遺伝子の探索を試みてきたが、今回我々が見出した上記 5 遺伝子についての報告は皆無であった。我々が独自に確立した TEC の分離培

養方法が、従来の研究では見出し得なかった新たな標的分子の同定を可能にしたと考えられる。

本研究において、我々は、独自に調製した TEC と NEC の網羅的な遺伝子発現プロファイルの比較解析によって、異常な腫瘍血管新生を引き起こす可能性のある新規な遺伝子を複数見出すことに成功した。中でも、TMEM176B および DEF6 が、腎がんにおいて腫瘍血管特異的に作用する血管新生阻害剤の新規な標的分子となり得ることを世界で初めて示唆することができた。本発見は、より安全かつ有効な新しい血管新生阻害剤の開発に繋がる画期的な成果であり、既存薬とは異なる作用機序を有する新しいタイプの血管新生阻害剤の創製に向けて、*in vivo* における機能解析を始めとした更なる検討を進めていきたい。