

## 研究題目 腫瘍血管のダイナミクスを制御する分子システムの解明

### 研究組織

研究代表者：木戸屋 浩康（福井大学学術研究院医学系部門）

共同研究者：林 弓美子（福井大学学術研究院医学系部門）

研究分担者：竹本 龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

腫瘍組織の増大化には血管を介した酸素や栄養分の供給が必須となることから、腫瘍血管の退縮誘導や形成抑による「兵糧攻め」のコンセプトによる癌治療法の開発が進められてきた。特に腫瘍組織中の新規血管の形成機構である血管新生(angiogenesis)の強力な誘導因子である VEGF(Vascular endothelial growth factor)を標的として、VEGF シグナル阻害薬が数多く開発されている。これらは臨床にてがん治療に用いられるに至っているが、期待に反して単独使用では抗腫瘍効果が少なく、想定されていた劇的な治療効果が得られていない(Nat Rev Clin Oncol. 2009)。その理由として、VEGF 以外の代替的シグナルやストローマ細胞による作用によって血管新生が代替的に誘導されることや、がん組織の代謝適応などが関与することが示唆されているが、VEGF シグナル阻害薬に対する治療抵抗性の実体は明らかになっていない(Pinto MP, et al. Int J Mol Sci. 2016)。

腫瘍血管抑制剤に対する治療抵抗性の獲得機構を明らかにするため、我々は様々な癌種の細胞株を用いて担癌マウスモデルを作成し、血管新生阻害剤による治療効果や、腫瘍組織中の血管の変化を解析した。その結果、VEGF シグナル阻害薬に対して治療抵抗性を示す腫瘍であっても、血管新生は抑制されて血管数が減少していることが確認できた。このことから、血管数が減っても腫瘍を増大化させる機構が働いていることが予測された。そこで、我々は生体イメージング系にて腫瘍組織内で血管新生阻害剤に応じて血管にどのような変化が起きているかの解析を進めた。

#### [1-2]研究の方法・経過

我々はこれまでに、血管内皮細胞にて特異的に tdTomato を発現する血管イメージングマウスを多光子顕微鏡下で観察することで、長期間（～72 時間）にわたる腫瘍血管の生体イメージング解析系を構築している。この解析系を用いて VEGF シグナル阻害薬を投与した際に腫瘍組織にどのような変化が起きるかを観察した。また、その結果から示された血管構造の変化を引き起こす分子機構を解明するため、VEGF シグナル阻害薬の投与にて腫瘍組織で発現が上昇する分子を探索した。同定した候補分子に対して遺伝子欠損マウスを作成して担癌モデルマウスを作成し、VEGF シグナル阻害薬を投与することで候補分子が血管構造変化に関与するかを検証した。評価方法としては血管構造の組織学的な変化に加えて、VEGF シグナル阻害薬による抗腫瘍効果の改善が認められるかを指標とした。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

VEGF シグナル阻害薬を投与して腫瘍組織内の生体イメージング解析を行った結果、腫瘍血管がダイナミックに構造を変化させている様子が確認された。この現象は、申請者が血管の発生過程で発見した動静脈の併走過程で認められたものと類似していた(Kidoya H, et al. Dev Cell. 2015)。これらの結果から、腫瘍血管は血管構造を変化させることで血管新生阻害剤への治療抵抗性を示すと考えた。そこで、VEGF シグナル阻害薬が血管構造の変化を誘導する分子の発現の誘導に働くのではないかと仮説を立て、腫瘍組織で発現が上昇する分子を探索

した結果、幾つかの分泌タンパクの遺伝子発現が変化することを明らかにした。これらの分子が血管構造の変化に関与しているかを検証するため、各遺伝子を欠損するマウスの作成に着手した。まず、遺伝子発現の変化や再現性、遺伝子機能などから最有力候補とした NDF1（未発表データのため仮称）について遺伝子欠損マウスを作成した。このマウスの背部皮下に LLC 肺がん細胞を移植し、VEGF シグナル阻害薬を投与したところ、腫瘍増殖が顕著に抑制された。現在も解析中であるが、VEGF シグナル阻害薬による腫瘍血管の構造変化も抑制されている様子が確認されつつある。

#### [2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究では癌治療において課題となっている「血管新生阻害剤に対する治療抵抗性機構」に対して、生体内イメージング解析などを用いることで解析を進めた。その結果、これまでに予測されていなかったような血管構造の変化が起きていることを明らかにし、さらにはこのような構造変化を引き起こす候補分子を同定することができた。候補分子の機能の検証には遺伝子欠損マウスを効率よく作成することが必要になるが、ゲノム編集技術にてマウスを迅速に作製する技術を有する貴研究所の竹本龍也教授から支援を受けることで、NDF1 という分子が有力な標的分子となることを明らかにすることができた。本研究の成果は、腫瘍血管に対して従来の「抗血管新生」とは異なるアプローチによる治療戦略の可能を創出し、新たな癌治療法の開発に繋がると期待できる。

#### [3] 主な発表論文等

##### [3-1] 論文発表

1) Sawane M, Ogura Y, Nakamura A, Otaka H, Kidoya H, Sato K, Takakura N, Kajiya K. Blood vessels sense dermal stiffness via a novel mechanotransducer, APJ. Angiogenesis. In press.

2) Hu L, Hayashi Y, Kidoya H, Takakura N. Endothelial cell-derived Apelin inhibits tumor growth by altering immune cell localization. Sci Rep. 11(1):14047. 2021.

3) Jia W, Kong L, Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Hayashi Y, Hsieh HY, Yamakawa D, Hsu DK, Liu FT, Takakura N. Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells.

Nat Commun. 12(1):2118. 2021.

##### [3-2] 学会発表

1) 木戸屋 浩康、Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. 第 16 回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾)、Web 開催、2021 年 6 月 19 日

2) 木戸屋 浩康、血管内皮細胞の安定化誘導による COVID-19 血管障害の抑制、Web 開催、第 94 回日本生化学会大会、2021 年 11 月 3 日

3) 木戸屋 浩康、腫瘍血管のダイナミクスを解き明かす時空間的アプローチ、木戸屋 浩康、令和 3 年度 福井大学ライフサイエンスイノベーションセンター「研究交流会」、Web 開催、2021 年 9 月 29 日

4) 木戸屋 浩康、白血病の病態進展に働くアンジオクラインシステムの解明、木戸屋 浩康、第 2 回血管研究会、Web 開催、2022 年 2 月 22 日

5) 木戸屋 浩康、血管研究の新展開：アンジオクラインシステム、第 5 回 Neurovascular 研究会、Web 開催、2022 年 3 月 11 日

#### [4] 今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究にて NDF1 が腫瘍血管の構造変化を誘導することで血管新生阻害に対する治療抵抗性の獲得に働く可能性が示されたが、その詳細な分子・細胞機構は明らかになっていない。NDF1 を標的としたがん治療薬の開発に向けては、NDF1 が正常組織の血管に与える機能を含めて詳細に解明する必要がある。今後は、NDF1 が血管内皮細胞にどのようなシグナルの活性化を介して構造変化を誘導しているかを解析していきたい。さらに、NDF1 以外の候補分子についても同様の解析を進めることで、血管構造変化を標的とする新たな癌治療法の確立を目指していきたい。