

(報告様式4)

【課題管理番号16cm0106508h0001】

平成29年5月24日

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名：(日本語) 腫瘍血管正常化によりがん悪性を抑制する治療法の開発  
(英語) Development of therapy to inhibit tumor malignancy by tumor  
vascular normalization

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 微生物病研究所 情報伝達分野 教授 高倉 伸幸  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial Diseases,  
Osaka University. Professor. Nobuyuki Takakura

実施期間：平成28年5月25日～平成29年3月31日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

腫瘍内の血管は血管内皮細胞同士の接着が抑制され、血管透過性が亢進している。このことで、腫瘍内の浸透圧が高くなる為に、血管内圧との差がなくなり、薬剤が腫瘍内に送達されなくなっている。当研究では、腫瘍血管を LPA 受容体を活性化することで正常化し、腫瘍内への薬剤の送達や免疫細胞の浸潤を改善して、効率のよいがん治療法の開発を行うことを目標にして、以下の3つの研究項目について研究を遂行してきた。研究項目1は、「LPA 受容体活性化による血管正常化の分子機序の解明」である。LPA の受容体は LPA1-6 までの6種類が現在のところ知られており、細胞によってその細胞内シグナルはそれぞれ固有の G 蛋白により誘導される。G 蛋白としては Gs, Gi/o, Gq/11, G12/13 などが候補と考えられてきた。今回、過去の血管内皮細胞における透過性と G 蛋白の関係性を示す報告等を参考に、候補を絞り検討したところ、LPA4 受容体の下流では部分的に Gi が機能して血管内皮細胞同士の接着を担う VE-cadherin の細胞膜局在を誘導していることが判明した。ただし、他の複数の G 蛋白の関与の可能性も否定できないことも示唆された。研究項目2は、「PDX マウスモデルにおける LPA 投与による血管正常化の誘導」である。この項目では、patient derived xenograft (PDX)モデルを用いて、ヒト腫瘍内の血管がある程度維持された環境で LPA4 アゴニストの血管に対する効果を観察する為に、従来ヒト血管を解析する実験系のないこのモデルでの解析系の構築にあたった。B16 メラノーマ細胞の脳への移植系を用い、メラノーマ形成後の腫瘍から再度腫瘍組織片をマウス脳に移植する系で、もともとのがん組織に存在した血管が部分的には80%程度残存することが判明した。これがなぜ、部分的であるのかを解明することで、移植片内の血管がさらに残存する移植モデルを構築する。研究項目3は「LPA による血管正常化と免疫チェックポイント阻害による抗腫瘍効果の解析」である。LLC(レイス肺がん)細胞はマウス皮下腫瘍モデルにおいて、免疫チェックポイント阻害剤の効果が殆どないことで知られている。このことから LLC 腫瘍内には CD8 陽性のキラーT 細胞が浸潤していないと考えられた。実際に LLC 腫瘍内のリンパ球浸潤を観察するとリンパ球の浸潤はわずかであった。そこで LPA 投与後血管透過性が改善した状態ではどうなるかを観察したところ、非常に多くの CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が観察された。

In the tumor blood vessels, endothelial cell (EC) to EC adhesion is very loose and hyperpermeability is induced. By this leakiness, interstitial hypertension is induced in the tumor microenvironment, resulting in suppression of drug delivery from intraluminal cavity of blood vessels into parenchyma of tumor. In this research program, we have aimed the development of efficient cancer therapy by improving drug delivery and lymphocyte infiltration in the tumor through normalization of blood vessels by LPA receptor activation. In this year, we have conducted experiments following three research plans.

In the 1<sup>st</sup> research plan (Molecular analysis of tumor vascular normalization by LPA), we have analysed the down stream signal pathway of LPA4 for vascular normalization. It is well known that there 6 types of LPA receptor (LPA1~6), this receptor is GPCR and then specific G protein is used for each LPA1~6 for signal transduction into cytoplasm, i.e., Gs, Gi/o, Gq/11, G12/13. Here, based on the published data, we targeted several G proteins in the down stream of LPA4 and found that Gi is a candidate for membrane localization of VE-cadherin in ECs. However, we could not deny the possibility that other G proteins are also involved in the membrane localization of VE-cadherin.

In the 2<sup>nd</sup> research plan (Induction of vascular normalization in the PDX model), we would like to obtain proof of concept (POC) that LPA4 agonist acts on human tumor vasculature for normalization. In order to do this, we planned to analyze the blood vessel using patient derived xenograft (PDX) model. To observe the human vasculature in this model, human blood vessels should not be occupied with recipient mouse blood vessels induced by sprouting angiogenesis. Therefore, in this year, we have analyzed how much proportion of originally existed blood vessels in tumor tissue is kept in the transplant of the recipient mice. B16 melanoma cells were injected into brain of B6 mice in which ECs are genetically labeled with fluorescent and after establishment of brain tumor, we dissected the tumor and small piece of tumor explant was transplanted into the brain of recipient B6 mice (wild type). After 2 weeks later, we observed blood vessels in the tumor and found that the contribution of originally existed blood vessels to second brain tumor vasculature was varied. For example, in a part of tumor, 80% of tumor vasculature was derived from original tumor, however, in a part of tumor, original blood vessels were completely disappeared. By analyzing this difference, we may understand how original tumor vasculature is maintained in allograft and obtain the method for keeping original tumor vasculature in the PDX model.

In the 3<sup>rd</sup> research plan (Analysis of anti-tumor effect of LPA with immune-checkpoint inhibitor), we analyzed whether vascular normalization by LPA affects lymphocyte infiltration into tumor tissues or not. When LLC cell line was used for subcutaneous tumor model, we found that the number of lymphocyte penetrated into tumor was few. However, after injection of LPA, we found that infiltration of CD8 T cell abundantly migrate into tumor tissues after normalization of tumor vasculature.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N. Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J Biochem*. In press
2. Kanzaki R, Naito H, Kise K, Takara K, Eino D, Minami M, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Okumura M, Takakura N. PSF1 (Partner of SLD Five 1) is a Prognostic Biomarker in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Treated with Surgery Following Preoperative Chemotherapy or Chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 23: 4093-4100, 2016
3. Yamane K, Naito H, Wakabayashi T, Yoshida H, Muramatsu F, Iba T, Kidoya H, Takakura N. Regulation of SLD5 gene expression by miR-370 during acute growth of cancer cells. *Sci Rep*. 6 :30941, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 腫瘍の血管新生、口頭、高倉伸幸、第 116 回日本外科学会定期学術集会（大阪）, 2016/4/16
2. 第 116 回日本外科学会定期学術集会、口頭、高倉伸幸、第 58 回 日本脂質生化学会（秋田）, 2016/6/10

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. WinterSchool@微研（血管研究、免疫学研究、感染学研究についての高校生向けセミナーを開催）、高倉伸幸、大阪大学微生物病研究所、2016 年 12 月 27 日、国内

(4) 特許出願

公開対象なし