

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019年

受付番号 201960272

氏名

滝真奈

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ヒューストン （国名： 米 国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
難治性卵巣癌の腫瘍微小環境に起こる免疫抑制メカニズムの新たな解明
3. 派遣期間：平成 31年 4月 1日 ～ 令和 2年 7月 19日
4. 受入機関名及び部局名
テキサス大学、MD アンダーソン癌センター婦人科腫瘍部門
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

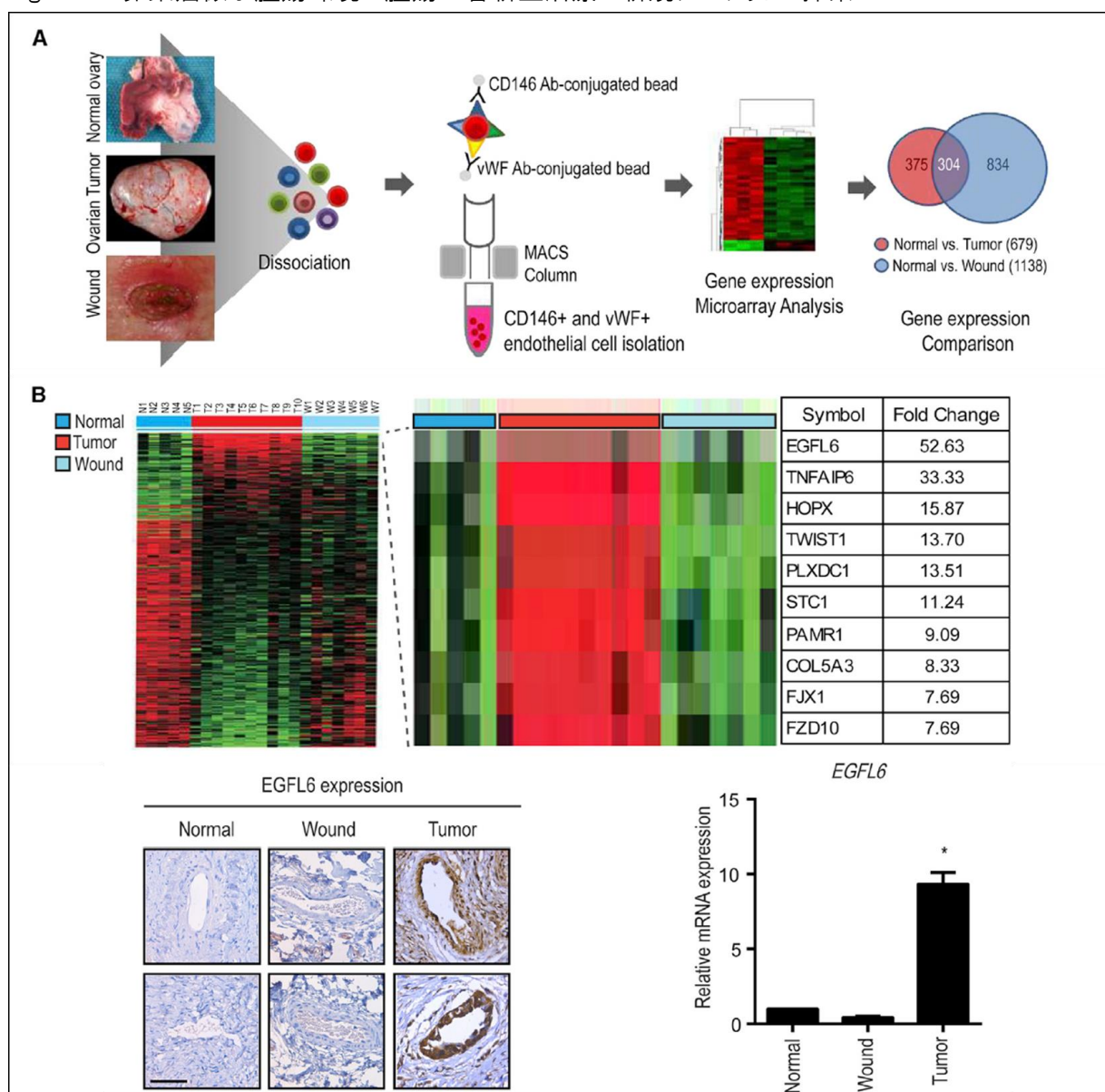
5. 所期の目的の遂行状況及び成果 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語での記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

【研究・調査実施状況】

派遣先研究室では長年に渡って卵巣癌の腫瘍微小環境に関して研究しており、とくに血管内皮細胞について研究し、内皮細胞をターゲットとした siRNA や nanoparticle を開発して臨床治験に応用している。卵巣癌の腫瘍血管新生をターゲットとした標準治療として Bevacizumab があるが、臨床での治療成績はマウスを用いた基礎実験での成績と比較すると、予想を下回っており、新しい血管新生治療のターゲットが必要になっている。当研究室ではそのターゲットを検索するために、卵巣漿液性腺癌、正常卵巣および

Figure 1: 卵巣癌微小腫瘍環境の腫瘍血管新生治療の新規ターゲットの探索

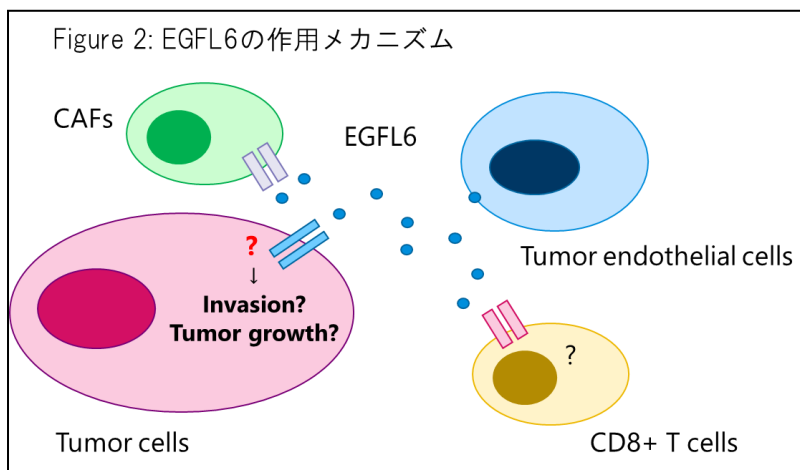


び損傷治癒組織から CD146 および vWF 陽性の血管内皮細胞を分離し、遺伝子網羅的解析を行った (Figure 1: Noh K and Sood Anil K.; Cell Reports 2017)。Bevacizumab を代表とする抗 VEGF 抗体は、創傷治癒の過程で VEGF が重要な役割を果たすため、重篤な副作用として創傷治癒の遅延および出血傾向が指摘されていた。そのため、新規ターゲットを探索する際、創傷治癒血管および正常卵巣血管で高発現している遺伝子を除外し、腫瘍血管内皮細胞でのみ高発現している遺伝子を抽出した。そこで EGFL6 (EGF-like domain multiple 6) という EGF リポートファミリーに属する遺伝子が腫瘍内皮細胞で最も高発現していることを突き止めた。

EGFL6 は分泌タンパク質で、腫瘍血管内皮細胞での EGFL6 の発現と予後を調査したところ、免疫染色で高発現である症例は予後不良であることが分かった (Figure 1)。抗 EGFL6 抗体を作成し、マウス治療実験を行ったところ腫瘍増生は明らかに抑制され、卵巣癌の血管新生治療として新たな治療ターゲットとして有用であることが示唆された。派遣先研究室では、薬物開発チームと協力開発し、抗 EGFL6 抗体の臨床応用を検討中であった。しかし EGFL6 が腫瘍細胞自体にどのようなメカニズムでどのような作用をもたらすかについてはあまり明らかになっていない。受容体拮抗薬との併用で、さらなる治療効果が見込めることが示唆されたため、受容体の探索が重視された。それと同時に EGFL6 が免疫系にどのような影響を及ぼしているか、卵巣腫瘍の微小環境での免疫系への影響も検討した。

まず EGFL6 が腫瘍細胞のどのレセプターに作用し、さらには downstream pathway が主に活性化するか検索した。EGFL6 は EGF リポートファミリーに属するため、受容体チロシンキナーゼ (RTK: receptor tyrosine kinase) に作用すると考えた。そこでヒト卵巣癌細胞株 OVCAR5 およびヒト血管内皮細胞株 RF24 を EGFL6 で治療し、human phospho-RTK array を用いて、どの RTK がリン酸化しているか検索した。約 50 の RTK の中から EGFR のみが活性化していた。また、EGFL6 で治療した OVCAR5 を RPPA (Reverse Phase Protein Array) で検索し、どの downstream pathway を確認した。予想したとおり EGF pathway が大きく反応しており、中でも MAPK pathway が強く活性化していた。そのため EGFR が主要なレセプターと考え、どのような作用を腫瘍細胞にもたらすか検討していった。

浸潤能および増殖能を確認したところ、EGFL6 で治療した OVCAR5 では浸潤能は増加したが、増殖率については変化を認めなかった。また EGFR を介しての作用であるか検討するため、shRNA targeting EGFR を用いて EGFR 発現低下 OVCAR5 細胞株を作成し、浸潤能を検討したところ、EGFR を発現低下させた細胞株では EGFL6 での浸潤能の増加は認めなかった。以上より、腫瘍細胞に対して EGFL6 は EGFR を介して MAPK pathway を活性化し、浸潤能を増加させることが分かった。RPPA のデータでは増殖能にも作用をもたらすことが示唆されたが、実際 shRNA を用いて検討したところ増殖能については変化なかった。



さらに現在 EGFL6 が EGFR に直接結合しうるかどうか SPR assay および Octet system を用いて検討した。しかし direct に結合していることは証明できなかった。

そのほか、EGFL6 を腫瘍細胞および血管内皮細胞に投与した場合、EGFL6 の発現がどのように変化するかを検討した。興味深いことに、EGFL6 の発現が細胞に投与した EGFL6 タンパク質の濃度に応じて増加することが分かった。現在細胞培養液の分泌タンパク質および細胞の全タンパク質をもちいて、タンパク質のレベルも増加するかを検索している。この作用は腫瘍由来間質細胞(CAFs: Cancer-associated fibroblast)でも見られており、EGFL6 が CAFs に対しても何らかの作用をもたらして言えることが示唆される。EGFL6 を投与することで、ケモカインなどの発現が増加して、免疫系に影響を及ぼす可能性を検討したが、残念なことにケモカイン発現については有意差は認めなかった。卵巣癌の臨床 TCGA データを用いて主な免疫系のマーカーである CD8 や CD4、またケモカインに関しても EGFL6 と何らかの相関がないか検討したが、明らかな相関は認めなかった。

そのほか、当研究室では EGFL6^{flx/flx} マウスを所有しており、このマウスを Tie2-Cre マウスおよび CMV-Cre マウスと交配させて、血管内皮の EGFL6 発現が低下することで、免疫にどのように作用をもたらすか、また全身から EGFL6 が欠損することで、免疫系にどのように作用するのかも検索開始していた (Figure 2)。しかし COVID-19 パンデミック感染のため動物施設への入室が不可能となり、途中で終了となった。

3 月中旬から 3 か月余り COVID-19 のために remote work に従事しており、実際の実験が思うように進まなかった。そのため、研究が途中で終了してしまったことは誠に残念であった。

この海外派遣を通じて世界の中における日本の立ち位置、そして今後の日本での医学研究の発展について深く考えさせられた。とくに派遣先研究室は病院と併設しており、PI 自体が MD で臨床のトップでもあったことから、基礎研究から臨床治験までのルートが確立していた。その点が、日本の研究室と比較して圧倒的に臨床応用の面で進んでいると感じた点だった。日本での研究の発展として臨床応用までスムーズに進めるようにしていくことは必須と思うが、開発費用の面や薬剤開発チームとの円滑な協力の面では日本は不利である。派遣終了後は臨床病院に併設した研究室に雇用される予定であり、そこでの臨床検体のスムーズな収集、そして臨床治験を積極的に進めていきたいと考えている。

また当奨学金で経済的にサポートしていただき、誠にありがとうございました。経済的にサポートがなければ、留学先での研究を継続することは不可能でした。この海外派遣中に得た経験を活かし、今後の日本の医療研究の発展に貢献できればと存じます。