

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11294

研究課題名(和文) バソヒビンファミリーによる血管新生と免疫逃避を標的とした新たな卵巣がん治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel ovarian cancer therapy targeting angiogenesis and immune escape by the vasohibin family

研究代表者

嵯峨 泰 (Saga, Yasushi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70360071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：バソヒビン2を標的とした卵巣がん新規治療法の開発を目指して研究を行っている。バソヒビン2は様々ながんで産生され腫瘍血管新生を促進することをわれわれは報告している。バソヒビン2を標的とした卵巣がん治療の臨床応用にあたって、がん化学療法との併用を念頭に基礎検討を行った。その結果、バソヒビン2ノックアウト卵巣がん細胞はパクリタキセルの感受性が増強することを発見した。またこの機序としてバソヒビン2ノックアウトによる微小管活性阻害と細胞周期の異常集積を観察した。バソヒビン2を標的とした卵巣がん新規治療法は従来の抗がん剤であるパクリタキセルとの併用により、より良い治療効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バソヒビン2を標的とした卵巣がん新規治療法の開発を目指して研究を行っている。今回の検討結果から、バソヒビン2のノックアウトは、卵巣がん初回多剤併用化学療法の第一選択であるパクリタキセル-シスプラチン併用療法に用いられる抗がん剤であるパクリタキセルの感受性を増強させ、一方、シスプラチンの感受性には影響を与えないことが明らかとなった。この知見からバソヒビン2を標的とした卵巣がん新規治療法は従来の多剤併用化学療法との同時施行により、より良い治療効果が得られる可能性が示唆され、ひいては卵巣がんの予後改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Vasohibin-2 (VASH2) is expressed in many cancer cells to accelerate tumor angiogenesis and tumor progression. Recent years, it has been reported that VASH2 has a tubulin carboxypeptidase activity related to microtubule functions. Paclitaxel (PTX), a key drug for ovarian cancer therapy, acts as an inhibitor of microtubule depolymerization, which may show some interactions with VASH2. We have established 4 VASH2 knocked out ovarian cancer cell lines by CRISPR/Cas9 genome editing system to examine the intracellular tubulin detyrosination status and the PTX chemosensitivity. The knockout of VASH2 significantly increased PTX chemosensitivity, whereas it did not affect chemosensitivity to cisplatin in all 4 knocked out cell lines. From these results, in the ovarian cancer treatment strategies targeting VASH2, not only known angiogenesis inhibition but also increasing PTX chemosensitivity can be expected.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：バソヒビン2 卵巣がん パクリタキセル シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは本邦を含む世界中で顕著な増加がみられる悪性疾患である。卵巣は腹腔内臓器であること、また卵巣がんは初期症状に乏しいことから早期診断が困難である。そのため卵巣がん症例の多くは腹膜播種や遠隔転移をきたした進行例として診断される。進行卵巣がんに対してはできる限りの腫瘍減量手術と引き続き多剤併用化学療法が施行される。卵巣がんは化学療法に比較的感受性が高く、多くの症例は寛解が得られる。しかしその効果は一時的であり、約半数の症例は再発し死亡する。卵巣がんの予後改善を目的に新たな分子標的治療薬の開発が進められている。近年では血管新生因子のひとつである VEGF を阻害するモノクローナル抗体のベバシズマブが開発され、臨床応用が始まった。従来の化学療法とベバシズマブとの併用、引き続きベバシズマブの長期投与による維持療法によってある程度の予後改善がみられる。しかしながらベバシズマブは高価であり医療費の増大が懸念されている。また化学療法との併用のメリットも不明な点が多い。

われわれはこれまで、バソヒピンファミリーを応用した卵巣がん新規治療法の開発をめざして研究してきた。特にバソヒピン 2 は卵巣がんを含む多くの悪性腫瘍が産生する血管新生因子であることをわれわれは報告しており、治療標的として有望である。実際に、卵巣がん細胞の産生するバソヒピン 2 を RNA 干渉やゲノム編集、われわれが開発したモノクローナル抗体で阻害することにより卵巣がんの進展を阻止できることを報告してきた。

2. 研究の目的

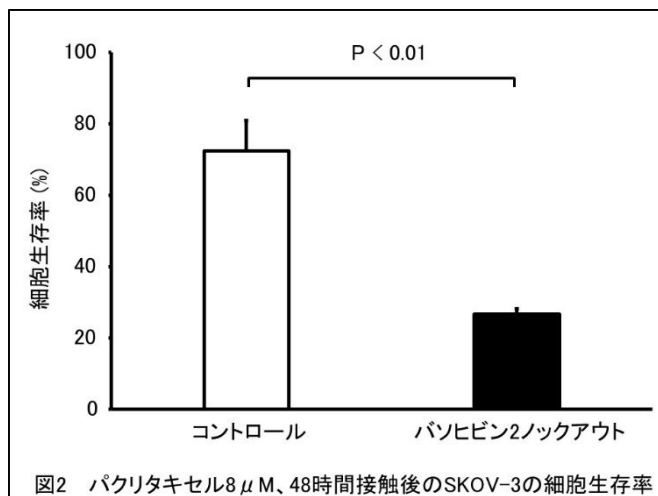
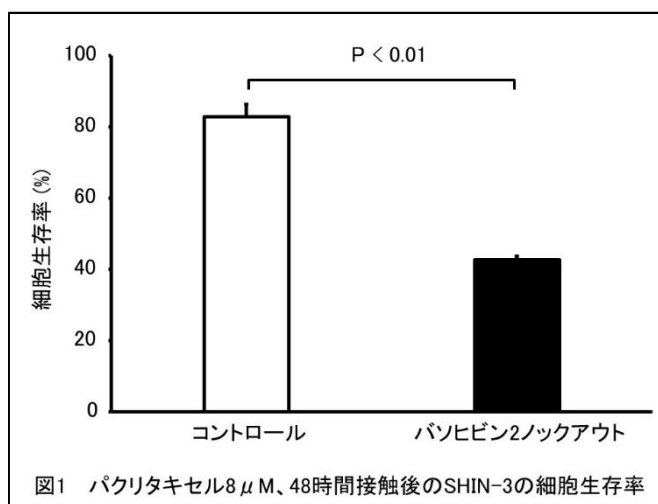
卵巣がんの予後改善を目的に、バソヒピン 2 を標的とした卵巣がん新規治療の開発を目指す。今回は臨床応用に直結する可能性の高い、バソヒピン 2 阻害と抗がん剤との併用効果およびその機序の解明を進めた。

3. 研究の方法

バソヒピン 2 を産生することを確認した複数の卵巣がん細胞 (SHIN-3、SKOV-3 など) を対象に、ゲノム編集技術のひとつである CRISPR/Cas9 を用いてバソヒピン 2 ノックアウト株を樹立した。具体的には B 群溶連菌由来の Cas9 とバソヒピン 2 に特異的な配列を標的としたシングルガイド RNA を搭載した発現ベクターをリポフェクション法で遺伝子導入し、耐性化コロニーをセレクションした後に、標的部位への変異導入をサンガーシークエンスで確認した。これらのノックアウト卵巣がん細胞の抗がん剤に対する感受性の変化をコントロールと比較した。抗がん剤は、まず初めに現在卵巣がんに対する多剤併用化学療法薬として第一選択のシスプラチンとパクリタキセルを用いた。

4. 研究成果

ゲノム編集技術の応用によってバソヒピン 2 ノックアウト卵巣がん細胞株が複数樹立できた。これらのバソヒピン 2 ノックアウト細胞は、形態および細胞増殖に変化はみられなかった。抗がん剤に対する感受性の検討では、シスプラチンに対して変化はみられなかった。一方、パクリタキセルに対しては顕著な感受性の増強が認められた (図 1、2)。研究を進めていたところ、バソヒピン 2 には微小管の活性化に関わる酵素作用を持つことが複数の研究施設から報告がなされた (、)。パクリタキセルは微小管を標的とする抗がん剤であることから、この知見を手掛かりに増強機序解明の研究を進めた。その結果、細胞周期の検討でバソヒピン 2 ノ



ックアウト細胞はコントロールに比べてサイクリン B1 の発現が明らかに増強していることが判明した。サイクリン B1 は M 期中期に発現上昇する細胞周期マーカーであることから、バソヒビン 2 ノックアウト細胞では M 期中期が延長していることが推定された。この知見は、バソヒビン 2 の持つ微小管活性化作用を最も必要とするのが M 期後期であり、その低下は M 期中期から後期への移行を妨げるという他施設の報告と矛盾しない。M 期中期はパクリタキセルの感受性が最も高いことが報告されており、バソヒビン 2 ノックアウトによる M 期中期の延長が感受性増強機序のひとつと考えられた。これらの結果からバソヒビンを標的とした治療戦略は従来の抗がん剤の感受性を増強させ、ひいては卵巣がん症例の予後が改善できる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Aillaud C, Bosc C, Peris L et al. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* 358: 1448-1453,2017.

Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB et al. Vasohibins encode tubulin deetyrosinating activity. *Science* 358: 1453-1456,2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koyanagi Takahiro, Saga Yasushi, Takahashi Yoshifumi, Tamura Kohei, Yoshida Takahiro, Takahashi Suzuyo, Taneichi Akiyo, Takei Yuji, Urabe Masashi, Mizukami Hiroaki, Fujiwara Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Knockout of vasohibin 2 reduces tubulin carboxypeptidase activity and increases paclitaxel sensitivity in ovarian cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2732 ~ 2739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida T, Saga Y, Urabe M, Uchibori R, Matsubara S, Fujiwara H, Mizukami H	4. 巻 17
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 2197-2206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurosaki F, Uchibori R, Sehara Y, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Hagiwara K, Kume A	4. 巻 29
2. 論文標題 AAV6-Mediated IL-10 Expression in the Lung Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Gene Ther	6. 最初と最後の頁 1242-1251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/hum.2018.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosaki F, Uchibori R, Mato N, Sehara Y, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Sugiyama Y, Kume A.	4. 巻 24
2. 論文標題 Optimization of adeno-associated virus vector-mediated gene transfer to the respiratory tract	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gene Ther	6. 最初と最後の頁 290-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/gt.2017.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato N, Saga Y, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Fujiwara H, Suzuki M, Ozawa K, Mizukami H.	4. 巻 52
2. 論文標題 Eradication of cervical cancer in vivo by an AAV vector that encodes shRNA targeting human papillomavirus type 16 E6/E7	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 687-696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurosaki F, Uchibori R, Sehara Y, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Hagiwara K, Kume A.	4. 巻 -
2. 論文標題 AAV6-mediated IL-10 expression in the lung ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Gene Ther	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/hum.2018.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小柳貴裕
2. 発表標題 Knockout of the angiogenesis regulator vasohibin-2 increases paclitaxel sensitivity through regulating microtubule activity in ovarian cancer cells
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柳貴裕、嵯峨 泰、高橋詳史、葭葉貴弘、高橋寿々代、町田静生、種市明代、竹井裕二、藤原寛行
2. 発表標題 卵巣がん細胞株におけるバソヒピン2ノックアウトはパクリタキセル感受性を増強させる
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小柳貴裕、嵯峨 泰、高橋詳史、葭葉貴弘、高橋寿々代、森澤宏行、町田静生、種市明代、竹井裕二、藤原寛行、松原茂樹
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるバソヒピン2ノックアウトは子宮頸がん細胞のパクリタキセル感受性を増強させる
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葭葉貴弘、嵯峨 泰、小柳貴裕、高橋詳史、高橋寿々代、森澤宏行、町田静生、種市明代、竹井裕二、藤原寛行、松原茂樹
2. 発表標題 16型ヒトパピローマウイルスE6のCRISPR/Cas9によるノックアウトは子宮頸がんのバソヒピン2発現を抑制する
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嵯峨 泰、高橋詳史、小柳貴裕、葭葉貴弘、高橋寿々代、森澤宏行、町田静生、種市明代、竹井裕二、藤原寛行、松原茂樹
2. 発表標題 血管新生調節因子バソヒピン1は免疫抑制酵素であるインドールアミン酸素添加酵素発現を低下させて卵巣がんの腫瘍免疫寛容を抑制する
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------