

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09149

研究課題名(和文) 前立腺癌における免疫応答と血管新生調節因子バソヒピンを標的とした新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new therapy targeting immune response and angiogenesis regulator vasohibin in prostate cancer

研究代表者

宮崎 保匡 (Miyazaki, Yasumasa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：80445329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞株や前立腺癌細胞株におけるバソヒピン2の発現をウェスタンブロット、細胞蛍光免疫染色にて検討した。バソヒピン2は血管内皮細胞と一部の前立腺癌細胞株で強く発現を認めた。この結果から、癌血管新生においては癌細胞自体もバソヒピン2を発現しており、バソヒピン2は血管内皮細胞で発現が認められることが判明した。バソヒピン2の強く発現を認めた血管内皮細胞や前立腺癌細胞株に抗バソヒピン2抗体を投与したところ細胞増殖抑制効果を認めた。バソヒピン2を阻害することによって直接的な癌細胞の増殖抑制を認めることが判明した。血管内皮細胞に対しても細胞増殖抑制効果を認め、血管新生を阻害することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、前立腺癌におけるバソヒピン発現の病態解明につながると期待され、学外研究者との交流が飛躍的に活性化し、血管新生を標的とした泌尿器科癌の病態解明を行う臨床研究プロジェクトにも発展しつつある。バソヒピンは前立腺癌以外の癌においても癌の進展や転移に関与していると報告されており、本研究で明らかになったバソヒピンの研究成果は、前立腺癌の進展予知に有用なバイオマーカーの開発という新しい研究領域の開拓(萌芽的研究の発見)に結びつき、腫瘍における血管内皮の異質性、つまりVASH1、VASH2を発現している血管内皮細胞をターゲットとした新規治療方法の開発の可能性への今後の発展が期待される。

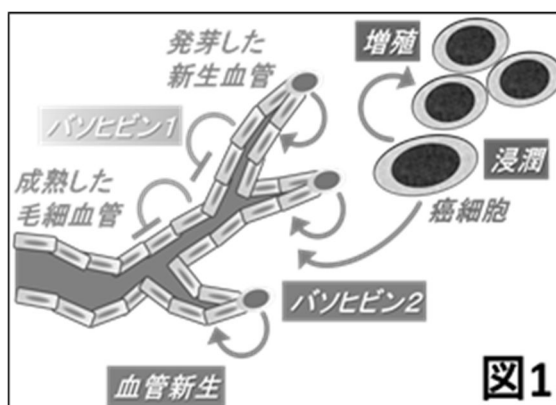
研究成果の概要(英文)：The expression of vasohibin-2 in vascular endothelial cell lines and prostate cancer cell lines was examined by Western blotting and cell fluorescent immunostaining. Vasohibin-2 was strongly expressed in vascular endothelial cells and some prostate cancer cell lines. We found that in cancer angiogenesis, the cancer cells themselves also express vasohibin-2, and vasohibin-2 is expressed in vascular endothelial cells. When the anti-vasohibin-2 antibody was administered to the vascular endothelial cells and the prostate cancer cells in which the strong expression of vasohibin-2 was observed, the cell proliferation inhibitory effect was observed. It was found that inhibition of vasohibin-2 directly suppresses the growth of cancer cells. It was also found that the cell proliferation inhibitory effect was observed on vascular endothelial cells, and that it may inhibit angiogenesis.

研究分野：血管新生

キーワード：前立腺癌 血管新生 上皮間葉転換 抗体療法 バイオマーカー 血管新生阻害剤 癌微小環境 バソヒピン

1. 研究開始当初の背景

癌と癌血管を治療の標的に考える上で、解決すべき最大の命題は「癌血管に異質性 (heterogeneity) が存在するか？」であると申請者らは考えた。均一に観察される癌血管において、もし、癌の悪性度と連動したバイオマーカーを証明すれば、当該分野でのパラダイムシフトである。申請者らは、ヒト尿路上皮癌において腫瘍組織の血管内皮細胞に特異的に発現しているバソヒビン 1 の高発現が予後不良因子であることを明らかにした (Miyazaki Y, et al. Clin Cancer Res. 2012)。また、前立腺癌においてもバソヒビン 1 の高発現が術後 PSA 再発の予後予測因子であることを明らかにした (Kosaka T, Miyazaki Y, et al. Br J Cancer. 2013)。また、腎細胞癌においてもバソヒビン 1 の高発現が術後再発や癌死の予後予測因子であることを明らかにした (Mikami S, et al. Lab Invest. 2017)。バソヒビン 1 の発現は癌の核異型度と病期に関連し、従来から血管新生のマーカーとして評価されてきた微小血管密度とも有意に相関することが明らかにした。一連の研究でバソヒビン 1 は、腫瘍における血管内皮細胞の異質性、血管新生の活性度を反映していると考えられ、癌の悪性度と連動したバイオマーカーであることを証明することに成功した。



バソヒビンは、VEGF で活性化した血管内皮細胞で発現する遺伝子群の中から血管新生調節因子として同定された蛋白質である。さらにバソヒビンは、遺伝子解析からバソヒビン 1 とバソヒビン 2 が同定されている。バソヒビン 1 は主に新生血管の発芽領域で発芽後方の血管内皮細胞に発現して血管新生を成熟させ (図 1)、バソヒビン 2 は、血管新生が活発な発芽領域に浸潤している骨髄由来の単核球に発現して、血管新生を促進する (Watanabe K et al. J. Clin. Invest. 2004)。

2. 研究の目的

本研究は、血管新生の際に特異的に発現する新規血管新生調節因子バソヒビン 1 と 2 に着目し、未だに明らかになっていないその発現制御機構の解明と治療応用を検討することにより、癌細胞と活性化した血管内皮細胞を標的とした次世代の前立腺癌治療薬の臨床応用に発展するための基盤研究を行う。血管新生に治療介入した際の変動遺伝子の発現解析の検討も行う。

3. 研究の方法

血管内皮細胞と前立腺癌の培養細胞株における細胞レベルでのバソヒビン発現解析を行い、発現調節因子を特定する。細胞株、マウス担癌モデルへの候補治療薬の投与を行い、バソヒビンや免疫応答に関する遺伝子発現の変化を検討し、ヒト前立腺癌検体の免疫染色を行って生命予後との関連を解析して、新規免疫チェックポイント阻害剤の治療介入の可能性の検討とバソヒビンの発現制御機構を明らかにして新規治療法を確立する。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞株 (HUVEC) における Vasohibin-1 (VASH1), Vasohibin-2 (VASH2) の発現をウェスタンブロット、細胞蛍光免疫染色にて検討した。VASH1 は血管内皮細胞に発現していたが、前立腺癌細胞株 (DU145, PC3, C4-2, LNCaP) では殆ど発現していなかった。しかし、VASH2 は血管内皮細胞と前立腺癌細胞株 (DU145, PC3) で強く発現を認めた。この結果から、癌血管新生においては癌細胞自体も VASH2 を発現しており、VASH1 と VASH2 は血管内皮細胞で発現が認められることが判明した。

(2) VASH2 の強く発現を認めた HUVEC や DU145, PC3 に抗 VASH2 抗体を投与したところ細胞増殖抑制効果を認めた。細胞増殖抑制は抗体の濃度依存的に起こり、濃度によっては抗体を作用させてから 24 時間後からも認められることが判明した。VASH2 を阻害することによって直接的な癌細胞の増殖抑制を認めることが判明した。また、血管内皮細胞に対しても細胞増殖抑制効果を認め、血管新生を阻害する可能性があることが判明した。抗 VASH2 抗体と同様サブタイプの抗体を同様の濃度でこれらの細胞に投与しても特に細胞増殖抑制効果を認めなかったことから、VASH2 が癌微小環境において癌の治療標的となり得ると考えられた。

(3) 前立腺癌細胞株のマウス皮下腫瘍モデルを作成し、抗 VASH2 抗体を投与したところ、皮下腫瘍の著しい腫瘍体積縮小を認めた。腫瘍内の血管密度は減少しており、癌細胞だけでなく血管新生も抑制していることが判明した。

(4) 前立腺癌細胞株 (DU145、PC3)、血管内皮細胞株 (HUVEC) に対して抗 VASH2 抗体を投与を行い、マイクロアレイ解析にて発現が変動した遺伝子群を解析した。抗 VASH2 抗体によって変化が起きる遺伝子を同定して変化する遺伝子群の解析 (パスウェイ解析) を行った。パスウェイ解析の結果、いくつかの候補を同定して、リアルタイム PCR による遺伝子発現の変化の確認を行った。Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) 関連の遺伝子と angiogenesis 関連の遺伝子の発現が抗 VASH2 抗体を投与することによって変動しており、今後さらに解析をすすめて発現調節のメカニズムについて同定する予定である。

本研究は、癌血管に異質性 (heterogeneity) が存在するか? という命題から始まった研究であるが、泌尿器科癌で一連のバソヒビンの発現に関する研究を通してバソヒビンの重要性を認識するに至った。また、バソヒビン 2 は癌細胞と血管内皮細胞に発現することから、これら両者を標的とする抗バソヒビン 2 抗体の投与が抗腫瘍効果を持つところまで証明するに至った。

バソヒビン 1 は、ヒト肺癌、子宮体癌・頸癌、乳癌で報告があり、癌の血管新生や悪性度に関与すると報告されていたが、泌尿器科癌におけるバソヒビンの発現や意義・機能解析に関する検討は全くされていなかった。そのためバソヒビンを発見した東北大学加齢医学研究所と、泌尿器科癌におけるバソヒビンの意義についての共同研究を開始し、まず尿路上皮癌での研究成果をすでに申請者らは世界に先駆けて報告してきた (Clin Cancer Res. 2012,) また、前立腺癌においても VASH1 の高発現が術後 PSA 再発の予後予測因子であることを世界で初めて明らかにした (Br J Cancer. 2013)。また、腎細胞癌においてもバソヒビン 1 が予後因子であることを明らかにした (Lab Invest. 2017)。これらの研究から癌微小環境におけるバソヒビン 1 の重要性を認識するに至り、現在はバソヒビン 2 も臨床検体を用いて解析し、バソヒビンの意義について包括的に解明すべく研究を行っている。泌尿器科癌においてバソヒビンを標的として新たな癌治療の確立を目指して解析を行っているのは本研究の組織だけであり、現在までに研究成果を世界に先駆けて報告してきている。本研究において、前立腺癌において抗バソヒビン 2 抗体の投与を行い、マウス担癌モデルにおいては抗腫瘍効果を認めている。

本研究は、抗バソヒビン 2 抗体投与による新規前立腺癌治療法の確立を目指した研究であり、世界的にみても他に同様の研究を行っている研究組織は皆無である。

本研究の一部の内容は、2018 年 5 月 20 日に米国泌尿器科学会において世界に先駆けて報告された。(THE ANALYSIS OF EXPRESSION AND MOLECULAR MECHANISM FOR VASOHIBIN-2 IN PROSTATE CANCER. Yasumasa Miyazaki, Takeo Kosaka, Shuji Mikami, Hiroshi Hongo, Yota Yasumizu, Nobuyuki Tanaka, Eiji Kikuchi, Yasufumi Sato, Mototsugu Oya American Urological Association (AUA) 2018 Annual Meeting)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasumasa Miyazaki
2. 発表標題 THE ANALYSIS OF EXPRESSION AND MOLECULAR MECHANISM FOR VASOHIBIN-2 IN PROSTATE CANCER
3. 学会等名 American Urological Association (AUA) 2018 Annual Meeting (国際学会)
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
研究分担者	小坂 威雄 (Kosaka Takeo) (30445407)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

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
---------	---------