

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18702

研究課題名（和文）血管新生促進因子バソヒビン2を標的とした新たな婦人科がん治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment strategy for gynecologic cancer targeting the angiogenesis regulator vasohibin-2

研究代表者

小柳 貴裕（Koyanagi, Takahiro）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90742122

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）：バソヒビン2（VASH2）はがん細胞特異的な血管新生促進因子であり、微小管重合に寄与するチューブリン脱チロシン化作用も有する。卵巣がんおよび子宮頸がん細胞株についてVASH2ノックアウト（KO）株を樹立し、パクリタキセル（PTX）に対する薬剤感受性を検討した。VASH2 KO株では、PTX曝露による脱チロシン化チューブリン発現亢進が抑制され、薬剤感受性が有意に増強した。VASH2 KO株ではCyclin B1発現が増加し、細胞周期がM期中期で停止した細胞の割合が増加して薬剤感受性が増強したと考えられた。血管新生阻害やチューブリン脱チロシン化活性など、多角的な視点から治療開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バソヒビン2の有する血管新生促進活性およびチューブリン脱チロシン化酵素活性に着目することで、より多角的な視点から新たな分子標的治療の確立が期待できる。バソヒビン2は成体の正常組織ではほとんど発現しておらず、ノックアウトマウスの表現型にも異常がみられないため、バソヒビン2阻害療法は既存薬にみられるような重篤な副作用を引き起こしにくいと推測される。このように、バソヒビン2阻害療法は、既存薬の感受性増強、副作用の軽減により、がん治療における身体的負担および経済的負担を軽減できる可能性を秘めている。さらには、バソヒビン2を発現する他癌種への治療応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Vasohibin 2 (VASH2) is a cancer cell-specific pro-angiogenic factor and also has tubulin detyrosination activity that contributes to microtubule polymerization. We established VASH2 knockout (KO) cell lines for ovarian cancer and cervical cancer cell lines and examined their sensitivity to paclitaxel (PTX). In the VASH2 KO cell lines, PTX exposure inhibited the upregulation of detyrosinated tubulin expression and significantly enhanced the sensitivity to PTX. In the VASH2 KO cells, cyclin B1 expression was increased, and the ratio of cells with cell cycle arrest at middle M phase was increased, leading to enhanced chemosensitivity. Novel treatment development can be expected from multiple perspectives, such as angiogenesis inhibition and tubulin detyrosination activity.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：婦人科がん バソヒビン 血管新生 微小管制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

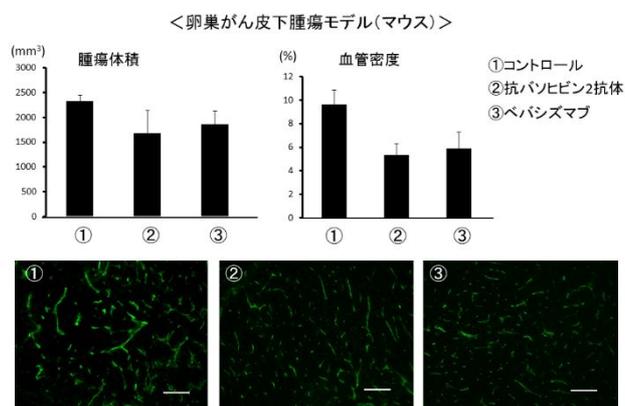
近年、抗 VEGF 抗体ベバシズマブが卵巣がんおよび子宮頸がんに対する分子標的治療として臨床で用いられるようになった。最近の基礎研究により、ベバシズマブ投与後のがん細胞は VEGF 以外の様々な血管新生因子を産生して耐性化することが示されている。また、ベバシズマブは生理的な血管新生も阻害するため高血圧、タンパク尿、血栓症、消化管穿孔といった特異的な副作用がみられ、これらを克服する必要がある。

バソヒピンファミリーは本邦で発見された新規血管新生調節因子群であり、バソヒピン 1 とバソヒピン 2 からなる。バソヒピン 1 は VEGF の刺激に対して血管内皮細胞から産生され、異常血管新生を抑制する。一方、バソヒピン 2 はバソヒピン 1 とは対照的に卵巣がんを含む多くのがん細胞から産生され、血管新生を促進する。バソヒピン 2 はがん細胞特異的に発現しており、腫瘍の血管新生や増殖に寄与している。また、バソヒピン 2 は低酸素では誘導されないこと、microRNA-200b の発現によって負に制御されること、バソヒピン 2 発現の変動は VEGFR2 の発現には影響しないことも明らかとなり、主要な血管新生因子である VEGF-A とはその発現様式が異なることも新たな分子標的として注目に値する。

われわれはこれまでに、バソヒピン 2 は卵巣がんにおける腫瘍血管新生の有望な治療標的と考え、臨床応用をめざした研究を行ってきた。卵巣がん細胞株においてバソヒピン 2 をノックダウンすると、*in vivo* における腫瘍増殖が著明に抑制された (Takahashi Y and Koyanagi T et al. Mol Cancer Res. 2012)。また、バソヒピン 2 を標的とする siRNA をアテロコラーゲン保護下に卵巣がん動物モデルに投与し、血管新生抑制を介した抗腫瘍効果を確認した (Koyanagi T et al. Cancer Sci. 2013)。さらに、実臨床への応用を想定し、高い中和活性を持った抗バソヒピン 2 抗体を世界に先がけて樹立した。卵巣がん皮下移植マウスモデルにこれを全身投与すると、ベバシズマブと同等の抗腫瘍効果を確認した (図 1、Koyanagi T et al. Cancer Sci. 2017)。バソヒピン 2 は成体の正常組織ではほとんど発現しておらず、バソヒピン 2 ノックアウトマウスの表現型には異常がみられないため、本抗体療法は重篤な副作用を引き起こしにくいと推測される。また、腫瘍組織でバソヒピン 2 をノックダウンしても VEGF など他の血管新生因子の誘導を認めないことから、治療抵抗性にも有利にはたらく。

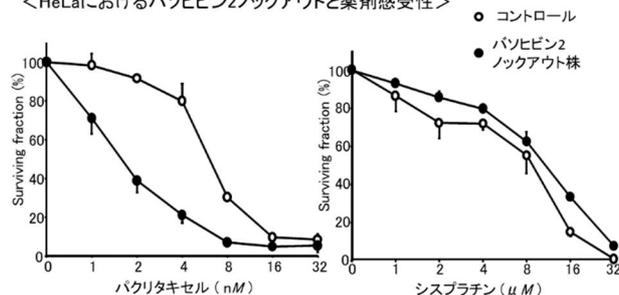
最近、バソヒピンファミリーがチューブリン脱チロシン化酵素であることが海外より相次いで報告された (Aillaud C et al. Science. 2017、Nieuwenhuis J et al. Science. 2017)。子宮頸がん細胞株のバソヒピン 2 をノックアウトすることで、微小管の脱重合阻害剤であるパクリタキセルの薬剤感受性が増強した (図 2)。この酵素活性ががん細胞に及ぼす影響は不明であり、より詳細な分子メカニズムの解明を要する。

2. 研究の目的



(図1) 抗バソヒピン2抗体を全身投与すると、ベバシズマブと同等の腫瘍増殖抑制効果、血管新生阻害を認めた。

<HeLaにおけるバソヒピン2ノックアウトと薬剤感受性>



(図2) 子宮頸がん細胞株HeLaでバソヒピン2をノックアウトすると、パクリタキセルに対する感受性が増強した。パクリタキセルは微小管の脱重合阻害剤であり、バソヒピン2のチューブリン脱チロシン化酵素活性ががん細胞に何らかの影響を与えていることが示唆される。

本研究の目的は、婦人科がんにおける新規血管新生阻害療法、抗バソヒピン 2 中和抗体による分子標的治療の確立である。これまで卵巣がん細胞株を中心に基礎実験を行い、皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を確認した。今後の臨床応用を想定して、腹膜播種モデル、同所移植モデルにおける本中和抗体の至適投与量・スケジュールの条件検討をさらに詳細に進める。また、婦人科がんによく用いられるプラチナ製剤やタキサン系製剤などの殺細胞性抗がん剤との併用についても検討する。さらに、子宮頸がん細胞株や子宮体がん細胞株でも同様の実験を行い、広く婦人科がん全般に抗バソヒピン 2 中和抗体が治療応用可能かを検討する。

近年明らかになったバソヒピンファミリーのチューブリン脱チロシン化酵素活性についても、がん細胞・組織にどのような影響を与えるのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗バソヒピン 2 中和抗体療法の確立をめざした前臨床試験

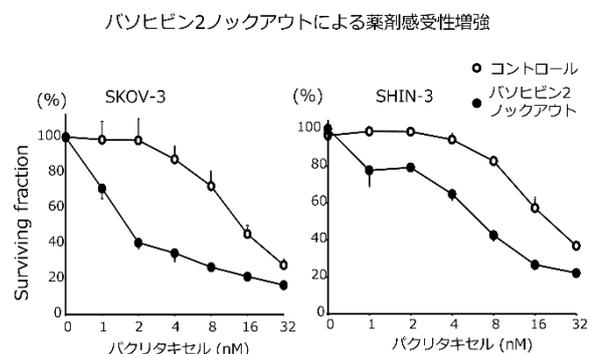
今後の臨床応用を想定して、本中和抗体の至適投与量、投与スケジュールについて詳細に検討する。さまざまな担がんマウスモデルに抗バソヒピン 2 中和抗体および殺細胞性抗がん剤を腹腔内投与し、経時的に腫瘍径を測定して腫瘍増殖抑制効果を確認する。体重や血圧、尿・血液データを経時的に測定し、また観察終了後に各臓器を病理学的に検索して、副障害の有無を観察する。腫瘍内微小環境の変化を評価するため、微小血管密度、低酸素状態、アポトーシスなどについて適宜免疫染色を行う。腫瘍内の血流について、レクチンを静脈内投与した後に灌流固定を行い、腫瘍組織を摘出したのちに免疫染色を行い定量する。本抗体による十分な治療効果が得られない場合は、再度標的部位の異なる抗バソヒピン 2 中和抗体の樹立を試み、あらためて抗腫瘍効果を検討する。

(2) バソヒピンファミリーのチューブリン脱チロシン化酵素活性と婦人科がんとの関連

バソヒピンファミリーの脱チロシン化酵素活性ががん細胞に及ぼす影響について、分子生物学的に検討する。婦人科がんの培養細胞株においてバソヒピン 1 または 2、あるいは両者を RNAi や CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトし、細胞内におけるチューブリン脱チロシン化の状態をウエスタンブロット法で観察する。また、細胞の蛍光免疫染色によって脱チロシン化チューブリンを可視化して定量する。この時のがん細胞の増殖能や浸潤能、およびパクリタキセルやカルボプラチンなどの薬剤に対する感受性について *in vitro* で評価する。バソヒピンを過剰発現させた系においても同様に検討する。

4. 研究成果

卵巣がん細胞株においてバソヒピン 2 をノックアウトすると、細胞内の脱チロシン化チューブリンが減少し、微小管脱重合阻害剤であるパクリタキセルの薬剤感受性が増強することを明らかにした(図 3、Koyanagi T et al. Cancer Med. 2021)。このとき、バソヒピン 2 ノックアウト株では Cyclin B1 発現が増加しており、細胞周期が M 期中期で停止している細胞の割合が増加して薬剤感受性が増強したと考えられた。この現象のさらなるメカニズム解明のため、バソヒピン 2 ノックアウト卵巣がん細胞株について RNA



(図3) 卵巣がん細胞株SKOV-3およびSHIN-3でバソヒピン2をノックアウトすると、パクリタキセルに対する感受性が増強した。

シーケンスを行い、細胞周期に関連する複数の遺伝子発現変動を確認した。このうち、特に発現変動の大きいものとして MCM2 (mini chromosome maintenance 2) などいくつかの遺伝子を抽出しており、卵

巣がん細胞でノックアウト株の樹立を進めている。

抗バソヒピン 2 中和抗体療法の確立をめざした前臨床試験については、動物実験の条件検討、治療実験に必要な抗バソヒピン 2 中和抗体の作成を進めており、今後成果報告していく予定である。

以上より、バソヒピン 2 を標的とした婦人科がん治療戦略では、既知の血管新生阻害療法のみならずチューブリン脱チロシン化酵素活性に着目することで、抗がん剤感受性増強作用や副作用の軽減など、より多角的な視点から新たな分子標的治療の確立が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, Tamura K, Yoshida T, Takahashi S, Taneichi A, Takei Y, Urabe M, Mizukami H, Fujiwara H.	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 -

〔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 Takahiro Koyanagi, Yasushi Saga, Yoshifumi Takahashi, Kohei Tamura, Takahiro Yoshida, Suzuyo Takahashi, Akiyo Taneichi, Yuji Takei, and Hiroyuki Fujiwara
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～2022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、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～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、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ノックアウトと微小管活性およびパクリタキセル感受性
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2020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、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 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、松原 茂樹
2. 発表標題 子宮頸がん細胞株におけるバソヒピン2ノックアウトとパクリタキセル感受性の関連
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019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
---------	---------