

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月2日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21791538  
 研究課題名（和文）  
 新規血管新生阻害因子 Vasohibin を用いた子宮頸癌における血管新生阻害薬開発  
 研究課題名（英文）  
 Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas.  
 研究代表者  
 吉永 浩介（YOSHINAGA KOUSUKE）  
 東北大学・病院・准教授  
 研究者番号：40343058

研究成果の概要（和文）：

Vasohibin は、血管内皮細胞より分泌される血管新生阻害因子であり VEGF との関連も強い。Vasohibin は血管内皮に特異的な内因性の血管新生抑制物質と言える。このような性質から Vasohibin は今後の腫瘍循環学に臨床応用が期待される有望な血管新生阻害因子である。本邦オリジナルの臨床応用の可能性が高い将来性のある物質であり、子宮体癌と乳癌では我々がヒトの癌において世界で初めてプロファイルを報告した。また 2010 年には、子宮頸癌における Vasohibin と VEGF-Receptor の発現プロファイリングを報告した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study is to clarify the critical roles of vasohibin in cervical carcinomas. We investigated the expression ratios of vasohibin and vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 on endothelium and microvessel density, lymphatic vessel density (LVD) by immunohistochemistry. Sixty-one squamous cell carcinoma (SCC), 18 mucinous adenocarcinoma (Adenocarcinoma), 38 carcinoma in situ (CIS), and 35 normal cervical epithelium were collected. This is the first study to elucidate the correlation between the expression of vasohibin in the stromal endothelial cells and the expression of VEGFR-2 in human cervical carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮頸癌、血管新生、vasohibin、VEGF

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞の内因的な負の制御機構として、

2種類の Vasohibin 分子が研究協力者の佐藤靖史博士の教室（東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野・教授）で分離同定された（Watanabe K, et al. J Clin Invest 2004; 114: 898-907）。Vasohibin は 腫瘍血管の血管内皮細胞内に VEGF を添加することにより同細胞が発現する。さらに Vasohibin を肺癌細胞株において過剰発現させることで腫瘍血管新生を阻害し腫瘍増殖を抑える。特徴的なのは、Vasohibin を分泌するのは血管内皮細胞のみであること、また Vasohibin が抑制するのは血管内皮細胞の増殖に特異的であること、である。すなわち Vasohibin は血管内皮に特異的な内因性の血管新生抑制物質と言える（Shimazu K, et al. BBRC 2005; 327: 700-6）。このような性質から Vasohibin は今後の腫瘍循環学に臨床応用が期待される有望な血管新生阻害因子である。Vasohibin の有望性は、腫瘍血管新生において最も力化が高く重要な機構である VEGF (vascular endothelial growth factor) と VEGF receptor 2 (以下 VEGFR2) との下流に直接作用することにある。腫瘍血管内皮細胞の VEGFR2 が腫瘍細胞が産生する VEGF と結合し血管新生が増勢されるが、その際に vasohibin は腫瘍血管内皮細胞より産生され negative feed back 機構として作用するが、最近の知見では内在する Vasohibin の濃度では腫瘍血管新生を抑えることは困難であるが、Vasohibin の濃度を上昇させることで in vitro、in vivo の実験において著明に腫瘍血管新生を抑制することが明らかとなった。（Shimazu K, et al. BBRC 2005; 327: 700-6）このことは、今後 Vasohibin が本邦オリジナルの血管新生阻害薬としての大いなる可能性を示している。

研究代表者は当時既に佐藤博士との共同研究に着手しており、正常内膜の血管内皮における Vasohibin 蛋白の発現が増殖期ではほとんどみられないのに反し、分泌期で強く発現することを明らかとし、分泌期から増殖期に移行するにあたり Vasohibin の発現が増殖期に盛んであった血管新生を急速に強く抑制するのであろうと推測している。子宮内膜癌において Vasohibin の発現頻度は増殖期よりも有意差をもって分泌期、類内膜腺癌で高くかつ高分化型よりも低分化型で発現頻度が高くなっていったこと、さらに正常子宮内膜と子宮内膜癌において Vasohibin と VEGFR2 の発現頻度に有意な正の相関を認めた。これらのことはヒトの癌においては初めての報告であり、既にこの成果を我々が論文報告している。（Yoshinaga K, et al. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. Cancer Sci. 2008 99 :914-9）。また、乳癌においても Vasohibin と VEGFR2 を中心とした腫瘍循環に関する報告を我々のグループより行っている。（Tamaki K, Yoshinaga K, et al. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. Cancer Sci 2008 in press.）我々は Vasohibin と VEGFR2 を中心とした癌における腫瘍循環をプロファイリングしていくことで、今後 Vasohibin が本邦オリジナルの血管新生阻害薬としての発展の基盤になるものと考えている。

## 2. 研究の目的

今回子宮がんのうち最も罹患頻度が高い子宮頸癌における Vasohibin 分子 (Vasohibin および Vasohibin II) の存在意義を明らかにすることである。具体的には、各子宮頸部扁

平上皮病変組織中の血管新生に関わる分子群 (Vasohibin, Vasohibin, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, TSP-1, TSP-2 など) の遺伝子発現を免疫染色で検討する。これらにより Vasohibin や他の血管新生因子との相互関係が子宮頸癌の腫瘍循環におよぼしている影響を検討する。さらに子宮頸癌細胞株をラット角膜に移植する血管新生能を観察する実験系により、Vasohibin 遺伝子の導入が細胞の血管新生能を大幅に抑制することを観察する。最終的には、Vasohibin 遺伝子導入による遺伝子治療法への可能性につなげたいと考えている。本研究により、血管内皮に対して特異的に抑制効果を示す Vasohibin の発現時期、発現程度、発現場所が各子宮頸部扁平上皮病変で明らかになるであろう。さらに子宮頸癌由来の各種培養細胞を用いた研究から Vasohibin の子宮内膜における機能・役割についても明らかになる。我々は Vasohibin と VEGFR2 を中心とした癌における腫瘍循環をプロファイリングしていくことやがん患者の血液中での Vasohibin 濃度を把握することで、今後 Vasohibin が本邦オリジナルの血管新生阻害薬としての発展の基盤になるものと考えている。

このように本研究は国際的にみても先進的かつ独創的な研究であり、また研究代表者は本研究遂行に必要なマテリアルを世界に先駆けて優先的に使用することができる立場にある。

### 3. 研究の方法

研究1：子宮頸部組織における血管新生因子及び Vasohibin 遺伝子発現プロファイリング

子宮頸部扁平上皮病変を段階的に解析する。軽度異形成 20 例・中等度異形成 20 例・高度

異形成 20 例・上皮内癌 20 例・微小浸潤扁平上皮癌 50 例・進行浸潤扁平上皮癌 50 例の凍結標本を用いて大規模遺伝子発現プロファイリングをマイクロアレイで行う。その結果得られた情報を基に 3D マイクロアレイ用のカスタムチップを作製する。カスタムチップには Vasohibin や血管新生関連遺伝子の他に大規模マイクロアレイで発現の差が認められた 20 から 30 の遺伝子をのせるが、研究協力者の林慎一教授（東北大学医学部保険学科教授）との共同研究による。3D マイクロアレイの施行にさいしては各組織の扁平上皮組織部分と間質部分をマイクロダイセクションで分けて採取し RNA を抽出してから行う。3D マイクロアレイでは微量で発現を知ることができるのみならず、発現量を定量化することもできる。以上により、血管新生関連遺伝子群の子宮頸部病変における発現動態、腫瘍化による発現の変化の概要を知ることができる。

研究2：免疫染色による Vasohibin 遺伝子・血管新生関連遺伝子の組織内発現局在の解析

各組織のホルマリン固定後パラフィン包埋標本を用いて、Vasohibin をはじめとする血管新生関連遺伝子 (VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, TPH-1, TPH-2 など) の蛋白発現を検討する。子宮頸部扁平上皮病変を段階的に解析するために軽度異形成 20 例・中等度異形成 20 例・高度異形成 20 例・上皮内癌 20 例・微小浸潤扁平上皮癌 50 例・進行浸潤扁平上皮癌 50 例を対象とする。これにより、研究1で確認した Vasohibin をはじめとする血管新生関連分子の発現を蛋白レベルでも確認する。さらに免疫染色では、発現の局在も検討する。これらより頸部腫瘍化に伴う血管新生因子の発現局在の変化から、癌発生や進展との関連性を

検討する。抗 Vasohibin 単クローン抗体は研究協力者の佐藤靖史博士より供与を受ける。他の抗体は市販のものを使用する。

平成 22 年度以降

研究 1：子宮頸癌の新規腫瘍マーカーとしての Vasohibin の応用

子宮頸部扁平上皮病変で手術を受けた患者の手術前血清を用いて血中 Vasohibin 濃度の測定を行う。測定は研究協力者である佐藤教授の教室で開発した Vasohibin 濃度を測定する ELISA 法を用いる。軽度異形成 20 例・中等度異形成 20 例・高度異形成 20 例・上皮内癌 20 例・微小浸潤扁平上皮癌 50 例・進行浸潤扁平上皮癌 50 例の患者の血中 Vasohibin 濃度と病理データおよび臨床データとをつきあわせて検討する。これにより Vasohibin の血中濃度測定が子宮頸癌の腫瘍マーカーとしての可能性、予後因子としての可能性を探索する。

研究 2：ラット角膜を用いた血管新生能の検討と Vasohibin 遺伝子導入

子宮頸癌細胞株 (Hela 他、数種類をすでに保有) をラット角膜に移植することで、各細胞株の血管新生能を観察する。さらに Vasohibin 遺伝子の発現ベクターを作製し、細胞株に遺伝子導入する。予想では Vasohibin 遺伝子が導入された細胞では血管新生能が抑制されると思われる。

研究 3：平成 21 年度の研究の継続

個体差や加齢による発現の変化などを考慮し、遺伝子発現プロファイリングの検討は随時、症例数を増やして続ける。

#### 4. 研究成果

子宮頸部組織における腫瘍間質の血管内皮細胞の vasohibin と VEGFR-2 の発現頻度の関連と血管密度とリンパ管密度、および腫瘍

組織の VEGF-A の発現強度を免疫染色を用いて計測した。

本学倫理委員会の承認後インフォームドコンセントを得られた手術患者の正常頸部 35 例、上皮内癌 38 例、扁平上皮癌 61 例、腺癌 18 例であった。正常頸部は筋腫や腺筋症などの良性疾患にて摘出された子宮頸部を用いた。腫瘍に近接した間質の脈管を観察するために抗体として CD34、D2-40、vasohibin、VEGFR-2、腫瘍細胞を観察するために VEGF-A を用いた免疫染色を行った。CD34 は血管のマーカーとして血管密度を測定した。D2-40 はリンパ管のマーカーとしてリンパ管密度を測定した。vasohibin と VEGFR-2 は連続切片にて CD34 陽性の血管にそれぞれが染色される割合を発現頻度としてカウントした。VEGF-A の判定は H score を用いた。

正常頸部・上皮内癌・扁平上皮癌の vasohibin と VEGFR-2 との発現頻度の間には弱い相関を認めた。VEGF-A の H score では扁平上皮癌が・正常扁平上皮と上皮内癌よりも優位に高かった。

子宮頸部においては、扁平上皮から上皮内癌、扁平上皮癌と腫瘍が進行するにつれて血管密度・リンパ管密度・vasohibin および VEGFR-2 の発現頻度が上昇する傾向が明らかとなった。また、悪性度の高い腺癌において、扁平上皮癌以上にそれらが上昇する傾向が認められた。

Vasohibin は、血管内皮細胞より分泌される血管新生阻害因子であり VEGF との関連も強く特徴的なのは、Vasohibin を分泌するのは血管内皮細胞のみであること、また Vasohibin が抑制するのは血管内皮細胞の増殖に特異的であることである。すなわち Vasohibin は血管内皮に特異的な内因性の血管新生抑制物質と言える。このような性質から Vasohibin は今後の腫瘍循環学に臨床応用が期待される有望な血管

新生阻害因子である。

その後、血中のvasohibinの濃度測定を試みたが、東日本大震災にて患者血漿をストックしていたディープフリーザの電源が一週間弱失われてしまい、サンプルの劣化が懸念され、サンプルによるばらつきなど正しい結果が求められるか懐疑的な見解もあり、測定不可能となってしまった。今後、新たに同意の得られた患者での血液中での濃度測定を考慮している。

ラット角膜を用いた血管新生能の検討とVasohibin遺伝子導入に関しては、臨床検体を用いた免疫染色による頸部組織の免疫染色によるvasohibinのプロファイリング作業に図らずも時間を要してしまい、遺伝子導入実験の準備ができなかったために施行できなかった。今後、準備が整い次第実験を遂行していくことを考慮している。

また、3Dマイクロアレイの解析に関しては研究協力予定の林博士の研究室の都合により大幅に実験開始が遅れていしまうということになり、先行して免疫染色によるプロファイリング作業を行い論文化した。機会があれば、サンプルをそろえて3Dマイクロアレイ解析を施行したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y. Cancer Science. 2011,

102(2):446-451. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①吉永 浩介、子宮頸癌における新規血管新生阻害因子 vasohibin の発現検討  
第 63 回日本産科婦人科学会、大阪、2011 年 8 月 29 日

②Yoshinaga K. The role of the intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas.

102th AACR, Orland, USA. Apr 5 2011.

③吉永 浩介、子宮頸癌における新規血管新生阻害因子 vasohibin の発現検討  
日本癌治療学会、京都、2010 年 10 月 30 日

④吉永 浩介、新規血管新生阻害因子 Vasohibin を用いた子宮頸癌における血管新生阻害薬開発  
日本癌学会、横浜、2009 年 10 月 2 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 浩介 (YOSHINAGA KOUSUKE)  
東北大学・病院・准教授  
研究者番号: 40343058