様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　５　月　２１　日現在

機関番号：　１１３０１
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５０１３０９

研究課題名（和文）癌悪性化におけるＶａｓｏｈｉｂｉｎ－２の機能解明と新規治療法への応用

研究課題名（英文）Identification of the role of Vasohibin-2 in tumor malignancy and its application in novel cancer therapy

研究代表者

鈴木　康弘（SUZUKI, YASUHIRO）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：６０３３２２７７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：癌の悪性化における血管新生抑制因子Vasohibi-2（VASH2）の機能解析を行った。癌細胞におけるVASH2の発現レベルは癌転移に関連するmiR-200ファミリーによって調節されること、VASH2は癌細胞の遊走・浸潤を制御すること、VASH2の細胞外分泌にはVASH2蛋白の脂質結合性が重要であること、胃癌組織ではVASH2が高発現しており、VASH2欠損によって炎症・癌細胞増殖・血管新生に関わる遺伝子の発現が低下して胃癌の発育が抑制されることを明らかにした。VASH2は血管新生促進作用だけでなく、癌細胞の形質転換や炎症反応を介して癌の悪性化を制御することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：In this study, the role of Vashibin-2 (VASH2) in tumor malignancy was analyzed. The expression level of VASH2 in cancer cells was regulated by miR-200 family, and affected cancer cell migration and invasion mediated by epithelial-mesenchymal transition-related (EMT) gene expressions. Purified VASH2 protein selectively interacted with some types of phospholipids (e.g. cardiolipin and phosphatidic acid), and its interaction affected the extracellular secretion of VASH2 protein from cancer cells. The expression of Vash2 mRNA was significantly increased in mouse gastric tumors compared with normal mucosa. Knocking out of Vash2 gene suppressed gastric tumor growth accompanying the down-regulation of gene expressions related to cancer growth, inflammation, and angiogenesis (e.g. Epiregulin and Interleukin-11). These results suggest that VASH2 may influence tumor malignancy via EMT and inflammation beside its role in angiogenesis.

研究分野：　基礎医学

キーワード：　Vasohibin　上皮間葉転換　癌悪性化　炎症　血管新生　miR-200　胃癌　脂質結合

１．研究開始当初の背景

申請者の所属研究室では 2004 年に血管新生における新規分泌性ネガティブフィードバック調節因子として VASH1 を単離・同定した。VEGF や FGF-2 等の血管新生促進因子の刺激を受けた血管内皮細胞において VASH1 遺伝子の発現が促進され、翻訳された後に細胞外へと分泌され、内皮細胞自身の遊走や増殖を抑制し血管新生を抑制する。病態との関係においては、VASH1 の精製蛋白やアデノウイルスベクターを用いて外因性に作用すると、癌・動脈硬化・未熟児網膜症のマウスモデルにおける血管新生を抑制し、且つ血管の成熟化を誘導して、病態の改善に寄与することを報告している。特に、癌においては血管新生だけではなくマクロファージの浸潤やリンパ管新生も抑制されることが確認されている。一方、VASH1 と高いアミノ酸相同性（約 50%）を有する VASH2 も同定し、骨髄由来の単核球に発現して VASH1 の作用とは反対に血管新生を促進することが確認されている。

これまでの VASH ファミリーの機能については、VASH1 が先行して解析が進められてきており、VASH2 の機能については不明な点が多く、解明すべき最重要課題となっている。（図 1）

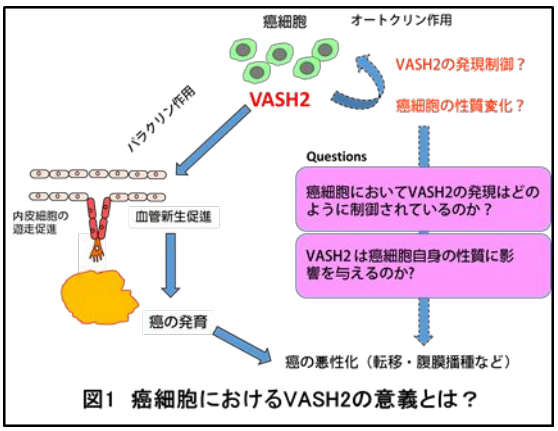

図1　癌細胞におけるVASH2の意義とは？

最近になって、多くの癌細胞株で VASH2 の発現が確認され、shRNA 導入により VASH2 をノックダウンした癌細胞株クローンとの比較において、マウスへの移植後の血管新生・腫瘍の成長・腹膜播種が顕著に抑制されることがわかってきた。これに対し、VASH2 を低レベルで発現する癌細胞株に VASH2 を高発現させることによって、血管新生と腫瘍の成長を促進することが確認されている。これらの腫瘍に対する効果はどれも劇的な変化であり、単に血管新生を制御するだけではなく、他の要因によって癌の悪性化を制御していると予想される。予備実験の結果では、癌細胞の悪性化に深く関わる micro RNA の miR-200 ファミリーが VASH2 mRNA を標的としていること、shRNA 導入によって VASH2 の発現をノックダウンした癌細胞では炎症性サイトカインや間葉系・上皮系マーカーの発現が変化しうるデータが得られていた。これらの結果は、VASH2 の作用は血管新生だけではなく、癌細胞の形質転換（上皮―間葉転換（EMT））や炎症反応に対しても影響することを強く示唆している。

以上の経緯を踏まえ、申請者は「VASH2 は微小環境において癌悪性化を制御する重要な制御因子である」と予想し、その作用機序を明らかにすることによって、VASH2 をターゲットとした新しいタイプの癌治療法の開発に応用することができると考え、本研究を構想するに至った。

２．研究の目的

本研究では、①癌細胞の発生・上皮―間葉転換（EMT）・浸潤・転移における VASH2 の役割とその制御メカニズムを解明すること、② VASH2 の働きを人為的に制御することによって癌の悪性化を抑制することを証明し、新規癌治療法開発に向けた基礎基盤を築くことを目的とする。

３．研究の方法

（１）癌細胞における VASH2、miR-200 ファミリー、EMT マーカー発現の相関

種々の癌細胞株における VASH2、miR200 ファミリー、EMT 及び癌幹細胞マーカーの発現レベルの違いや変化を Real time-PCR、Western Blot、免疫染色で確認し、それぞれの発現パターンの相互関係を調べる。VASH2 を強制発現あるいはノックダウンした各種癌細胞において EMT 誘導に変化をきたすかどうか調べる。また、癌細胞に miR-200 ファミリーの Pre-miR(前駆体)を導入して VASH2 の発現変化を確認するとともに、VASH2 mRNA の 3’UTR を繋げたレポーターベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイにて miR-200 の標的となることを確認する。

（２）VASH2 によって変動する癌悪性化に関わる因子の網羅的探索

VASH2 を強制発現あるいはノックダウンした種々の癌細胞株を用いて、コントロールの細胞株と比べて発現が変動している遺伝子及び micro RNA をマイクロアレイ解析にて探索する。また、癌細胞の培養上清を用いて抗体アレイ解析を行い、炎症性サイトカインをはじめとする癌悪性化に関わる分泌性制御因子を探索する。

（３）VASH2 の機能部位の解析

VASH2 の一部のアミノ酸を欠いた欠損蛋白を発現するプラスミドベクターを作製し、癌細胞に導入することによって、VASH2 の細胞内局在・細胞外分泌・機能発現に重要な部位を同定する。さらに、活性部位を絞っていくことによって、どのアミノ酸配列が大切かを明らかにし、アミノ酸置換により活性を消失した変異 VASH2 蛋白の作製を試みる。

（４）胃癌発症モデルマウスにおける VASH2 発現レベルと癌悪性化の相関

VASH2 ノックアウトマウスと胃癌を自然発症する K19-Wnt1/C2mE トランスジェニックマウス（Gan マウス）を交配し、VASH2 を欠損した Gan マウスを作製する。（図２）

コントロールと比して胃癌発症の有無、腫瘍の大きさ等を評価する。VASH2 欠損により発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ解析や Real time-PCR で比較解析する。

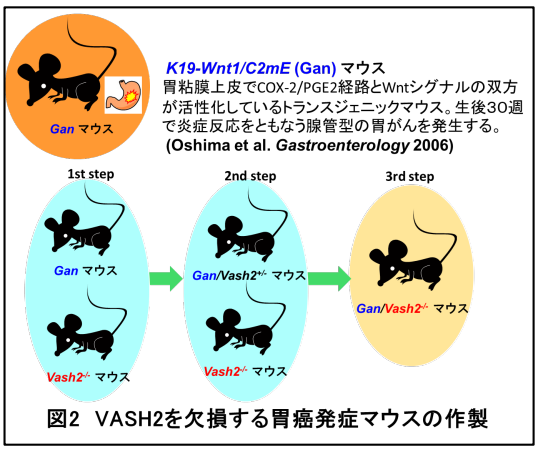

図2　VASH2を欠損する胃癌発症マウスの作製

４．研究成果

（１）癌細胞における VASH2 の発現は miR-200 ファミリーによって制御される

ヒト VASH2 mRNA の 3'UTR（終止コドンから 1,817bp 下流まで）を挿入したレポーターベクターを細胞に導入し、miRNA 前駆体 Pre-miR-200b 処理によって濃度依存的にレポーター活性が低下することから、VASH2 mRNA の 3'UTR が miR-200b の標的であることを確認した。（図３）

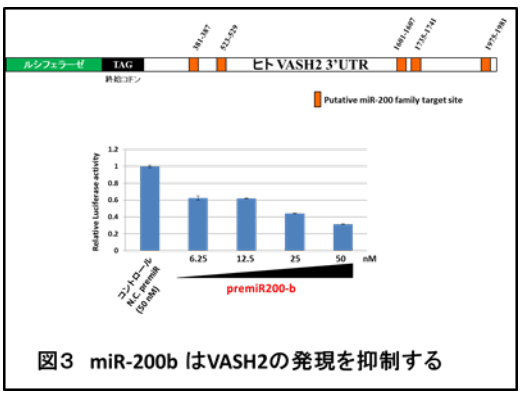

図３　miR-200b はVASH2の発現を抑制する

（２）VASH2 は EMT 関連因子の発現調節を介して癌細胞の遊走・浸潤を制御する

VASH2 の発現を特異的にノックダウンしたヒト漿液性卵巣癌細胞株 DISS 細胞では、コントロール株と比して、EMT 誘導に寄与する転写因子 ZEB2・SNAI2・TWIST1 の発現が低下し、連動して上皮マーカーである E-cadherin と β-catenin の発現亢進と間葉系マーカーである Vimentin の発現低下が確認された。（図４）トランスウェルチャンバーを用いた解析から、VASH2 をノックダウンすることによって DISS 細胞の遊走能・浸潤能が抑制されることを見出した。（図５）

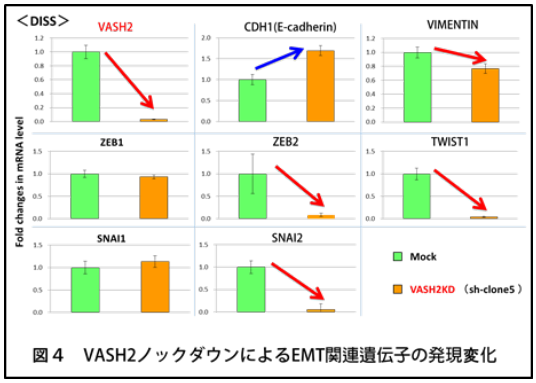

図４　VASH2ノックダウンによるEMT関連遺伝子の発現変化

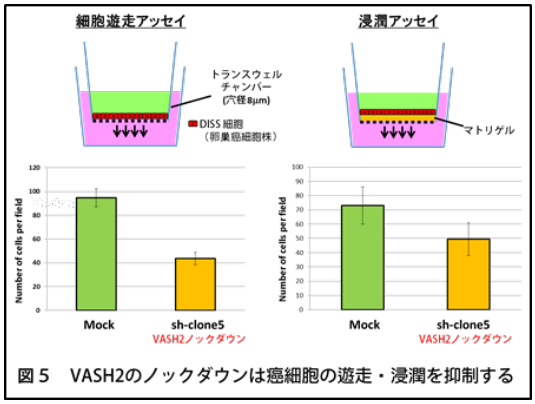

図５　VASH2のノックダウンは癌細胞の遊走・浸潤を抑制する

（３）VASH2 によって変動する癌悪性化に関わる因子の探索

抗体アレイ解析により、ヒト漿液性卵巣癌細胞株 SKOV-3 細胞によるケモカイン MCP-1 の分泌が VASH2 ノックダウンにより顕著に抑えられることを確認した。VASH２の発現が高いヒト小細胞肺癌細胞株 SBC-3 細胞と横紋筋肉腫株 RH30 細胞の VASH2 を siRNA によりノックダウンすると、SBC-3 細胞では間葉系マーカーVimentin・N-cadherin の発現低下とともにアポトーシス・細胞老化・アミノ酸代謝・糖代謝に関連する遺伝子群が変動し、RH30 細胞では p53 とアポトーシスに関連する遺伝子の発現が変動することをマイクロアレイ解析と Real time-PCR で確認した。一方、VASH2 の発現が低いヒト乳がん細胞株 MCF7 に VASH2 を強制発現することによって、LCAT、PLA2G1B1、MOGAT1 等の mRNA の発現に加え、miR-4267、miR-210、miR-4710 等の miRNA の発現が 2 倍以上変化することを見出した。

（４）VASH2 の機能部位の解析

乳癌細胞株 MCF7 に VASH2-Flag を遺伝子導入し免疫染色法にて細胞内の局在について確認したところ、VASH2 はミトコンドリアに局在することを確認した。精製 VASH2 蛋白と各種脂質成分との結合を脂質アレイにて解析したところ、VASH2 蛋白がミトコンドリア内膜に局在するカルジオリピンをはじめ種々のリン脂質に結合することを見出した。（図６と図７）リン脂質結合に寄与すると予想されるアミノ酸に変異を加えると VASH2 の

細胞外分泌がよくせいされたことから、脂質との結合が細胞内局在や細胞外分泌に重要であることが示唆された。

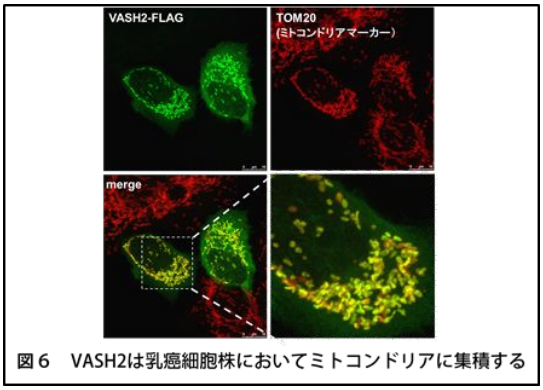

図６　VASH2は乳癌細胞株においてミトコンドリアに集積する

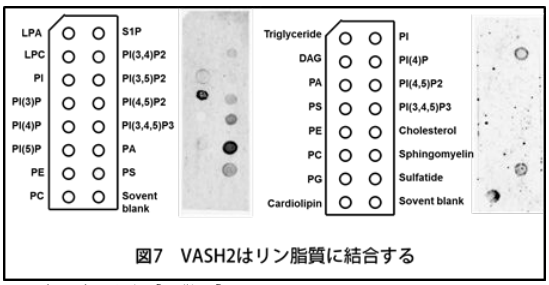

図7　VASH2はリン脂質に結合する

（４）胃癌発症モデルマウスにおけるVASH2 発現レベルと癌悪性化の相関

胃癌発症モデルマウスにおいて、生後３０週で発症した胃癌組織では、癌幹細胞マーカーCD44 及びそのバリアントの発現と共に、VASH2 の発現が増加することが確認された。胃癌発症モデル Gan マウスと VASH2 ノックアウトマウスの交配を行い、VASH2 を欠損する Gan マウスを作出したところ、VASH2 欠損によって胃腫瘍部の発育が抑制される傾向があった。（図 8）同時に、遺伝子発現解析の結果から、VASH2 欠損する Gan マウスの腫瘍組織では Il11、Cd44、Ereg、Areg、Tek、End1、Klf5 等の炎症性サイトカイン、癌幹細胞、上皮細胞増殖因子、血管新生等に関わる遺伝子の発現が低下し、Per3、Dbp、Hlf、Tef 等の時計遺伝子の発現が高くなることが確認された。（図 9）

以上の結果から、本研究では、①癌細胞における VASH2 の発現レベルは miR200 ファミリーによって制御されること、②VASH2 ノックダウンにより種々の遺伝子発現変化を伴って EMT が抑制され癌細胞の遊走能・浸潤能が抑制されること、③VASH2 は脂質結合性を有し、脂質との結合が VASH2 の細胞内局在や細胞外分泌に重要であること、④胃癌発症モデルを用いた解析から、胃癌組織では VASH2 が高発現し、VASH2 欠損によって炎症・癌細胞増殖・血管新生に関わる遺伝子の発現が低下し胃癌の発育が抑制されることを明らかにした。（図 10）これらの成果は、VASH2 は血管新生促進作用だけでなく、癌細胞の形質転換や炎症反応を介して癌の悪性化を制御すること、人為的に VASH2 の発現を阻害することによって癌悪性化の一端を抑制できることを新たに示唆している。今後は VASH2 の作用メカニズムの解析をさらに進めていき、VASH2 の発現や作用を阻害する特異的薬剤やその利用法の開発が望まれる。

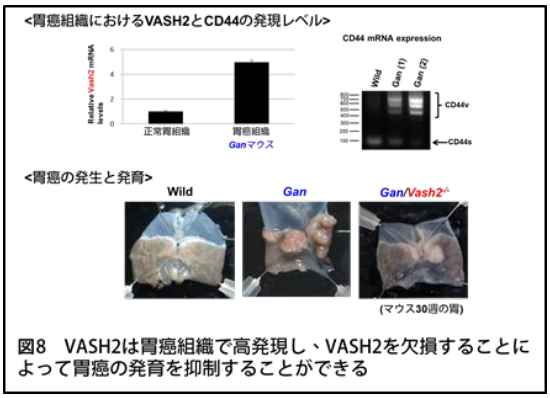

図8　VASH2は胃癌組織で高発現し、VASH2を欠損することによって胃癌の発育を抑制することができる

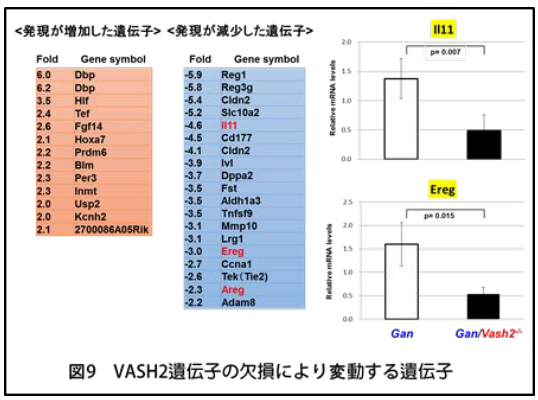

図9　VASH2遺伝子の欠損により変動する遺伝子

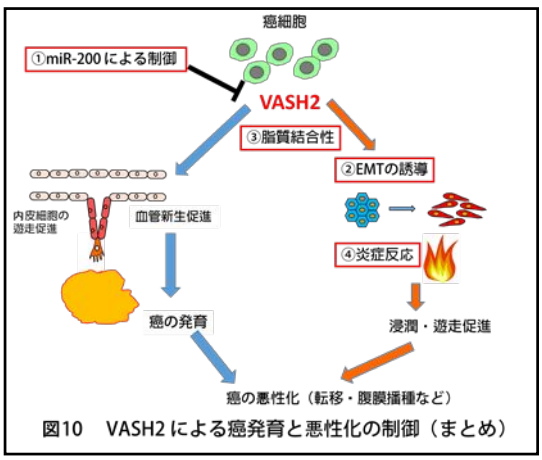

図10　VASH2 による癌発育と悪性化の制御（まとめ）

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 0 件）

〔学会発表〕（計 7 件）

① 鈴木康弘、Vasohibin を見つめ直すと…、第１回日本血管生物若手研究会、平成２７年２月 6－7 日、東京大学（東京）

② Yasuhiro Suzkuki, Yasufumi Sato、The role of Vasohibin-2 in gastriccancer and a new perspective of Vasohibin family、The 10th Vasohibin Meeting、平成 27 年 1 月 10-11 日、ラフォーレ蔵王リ

ゾート＆スパ（宮城）
③ Yasuhiro Suzkuki, Shuji Kitahara, Yasufumi Sato、The role of Vasohibin-2 in tumor growth and angiogenesis、The 9th International Symposium of the Institute Network、平成 26 年 6 月 19-20 日、大阪大学（大阪）
④ Yasuhiro Suzuki, Takahiro Koyanagi, Yoshifumi Takahashi, Yasushi Saga, Mitsuaki Suzuki, Yasufumi Sato 、Expression of pro-angiogenic VASH2 and its novel roles in cancer cells、 The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014)、平成 26 年 4 月 14-17 日、みやこめっせ（京都）
⑤ 小柳貴裕、鈴木康弘、小林美穂、宮下浩輝、嵯峨泰、鈴木光明、佐藤靖史、vasohibin-2 を標的とした悪性腫瘍に対する新規抗血管新生療法の開発、第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜（神奈川）
⑥ 北原秀治、鈴木康弘、森島正惠、吉井明日香、松居彩、佐藤靖史、江崎太一、Vasohibin-2 の抑制が消化管における自然発症腫瘍に影響を及ぼすか？第 21 回血管生物医学会学術集会、平成 25 年 9 月 26-28 日、千里阪急ホテル（大阪）
⑦ Yasuhiro Suzuki, Takahiro Koyanagi, Miho Kobayashi, Hiroki Miyashita, Yasushi Saga, Mitsuaki Suzuki, Yasufumi Sato、Regulation of VASH2 expression by miR-200 family and its role in cancer cells、The 20th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization、平成 24 年 12 月 5-7 日、あわぎんホール（徳島）
⑧

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/vascbio/

６．研究組織
(1)研究代表者
鈴木　康弘（Yasuhiro Suzuki）
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：60332277

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：