

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800003

研究課題名(和文) ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた Vasohibin 遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文) Development of a Vasohibin gene delivery system using nano/microbubbles and ultrasound

研究代表者

堀江 佐知子 (Horie, Sachiko)

東北大学・加齢医学研究所・研究支援者

研究者番号：90451640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：Vasohibin-1(VASH1)は血管新生抑制因子である。VASH1にはフルレングスのVASH1Aと選択的スプライシング産物のVASH1Bが存在する。本研究では、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた遺伝子導入法を用いてマウス固形腫瘍にVASH1AとVASH1B cDNAを導入し、抗腫瘍効果を評価した。本VASH1遺伝子導入法によって、VASH1AとVASH1Bはいずれも腫瘍血管新生を抑制するが、VASH1Aは新生血管の成熟化、VASH1Bは退縮と異なっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Vasohibin-1 (VASH1) is an angiogenesis inhibitor. There are two transcripts of VASH1: one is the full length VASH1A and the other is splicing variant VASH1B. In this study, the anti-tumor effects of VASH1A and VASH1B have been examined with a mouse solid tumor model using a tissue-specific gene delivery method using nano/microbubbles and ultrasound. Both VASH1A and VASH1B inhibited tumor growth exhibiting anti-angiogenic activity. However, more importantly, VASH1A stabilized neovessels while VASH1B pruned neovessels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：癌 Vasohibin 遺伝子 ナノ・マイクロバブル 超音波

1. 研究開始当初の背景

Vasohibi-1(VASH1)は血管内皮細胞に選択的に作用する生理活性物質である。VASH1は代表的な VEGF や FGF-2 によって誘導される血管新生を抑制する調節因子として作用している。VASH1は腫瘍血管新生を抑制することにより腫瘍の増大を抑えることから、がん治療への応用が期待されている。

VASH1にはフルレングスの VASH1A と選択的スプライシング産物の VASH1B が存在する。VASH1Aは、内皮細胞のストレス耐性を向上させ、生存を促進し、一方で、遊走能を抑制して血管新生を抑制する。VASH1Bは VASH1Aとは異なり、血管内皮細胞由来の vitro 実験から内皮細胞の細胞死を誘導することが確認されている。しかしながら、VASH1Bの生体への遺伝子導入による腫瘍組織に対する抗血管新生効果に関しては不明である。

これまでの VASH1 を用いた研究ではウイルスをベクターとした遺伝子導入法が主であるため、組織特異性が低く、免疫原性などの副作用の可能性が指摘されてきた。このため組織選択性に優れ、免疫原性をともなわない新しい遺伝子導入法の開発が求められている。

ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた分子導入法は非侵襲的に標的組織にプラスミド DNA などの高分子を導入することが可能である。加えて、免疫原性や細胞毒性がないため、腫瘍治療への応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた VASH1 cDNA の生体への非侵襲的かつ効率的な遺伝子導入法の開発を通して VASH1 遺伝子導入による抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とする。具体的には、腫瘍発育抑制効果として腫瘍サイズの減少と抗新生血管効果を評価する。抗血管新生効果は、腫瘍内の血管密度を定量化し、血管の正常化を評価する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入

ナノ・マイクロバブルと超音波を用いて VASH1A もしくは VASH1B cDNA をマウス固形腫瘍に局所導入し、抗腫瘍効果を評価する。これまでの生体への遺伝子導入実験で高い導入効率を示した超音波照射条件(周波数: 1 MHz; デューティ比: 20%; パルス数: 200; 照射時間: 1 分; バブルの添加濃度: 10% (v/v))を用いて、マウス側腹に作製したマウス乳がん固形腫瘍(EMT6-luc, ルシフェラーゼ発現マウス乳がん細胞)に VASH1A と VASH1B を繰り返し導入した(週 2 回, 2 週間)。ナノ・マイクロバブルは平均直径 200 nm の音響性リポソームを使用した。

(2) 腫瘍発育の評価

ノギスを使って腫瘍径を測定し、腫瘍体積の経時的変化を定量化した。加えて、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を用いることでルシフェラーゼ活性値の増減から、腫瘍サイズの変化を定量化した。生体発光画像診断法で測定した。

(3) 血管密度の定量化

抗 CD31 抗体を用いて腫瘍内の血管内皮細胞を免疫染色することで血管密度を定量化した。超音波造影剤(ソナゾイドマイクロバブル)と実験小動物用超高解像度超音波画像装置(周波数: 40 MHz)を用いた造影超音波診断法で VASH1 遺伝子導入による機能血管の密度変化を定量化した。

(4) 血管正常化の評価

抗 α -SMA 抗体を用いて腫瘍組織の壁細胞を染色し血管正常化効果を評価した。また、血管内皮細胞と結合するトマトレクチンを静注する機能血管系染色法を行い、腫瘍内の血流を評価した。加えて、血管の正常化による腫瘍内低酸素の改善を腫瘍組織のピモニダゾール免疫染色画像から評価した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍生育抑制効果

ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた VASH1 遺伝子導入による腫瘍組織への抗腫瘍効果を評価するために、腫瘍生育の変化を定量化した(Fig. 1)。腫瘍体積(Fig. 1A)および腫瘍細胞が発現するルシフェラーゼ活性値(Fig. 1B)はコントロール群と比較して VASH1A 導入群は 0.6 倍(ノギスによる測定: 0.58 倍; 生体発光による測定: 0.62 倍), VASH1B 導入群では 0.3 倍(ノギスによる測定: 0.29 倍; 生体発光による測定: 0.32 倍)になった。VASH1A と VASH1B はともに腫瘍生育抑制効果を誘導することが示された。

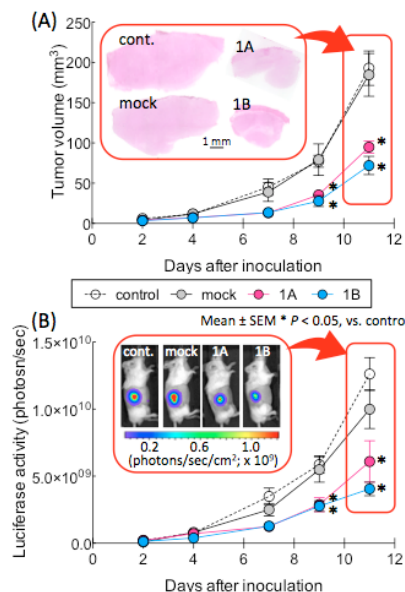


Fig. 1 腫瘍生育の定量化

(2) 抗血管新生効果

抗血管新生効果を評価するために、内皮細胞マーカーである CD31 の免疫染色 (Fig. 2A) と造影超音波画像診断法 (Fig. 2B) によって腫瘍内の血管密度を定量化した。免疫染色と造影超音波画像診断法から定量化した腫瘍内血管密度は共に Mock 導入群と比較して VASH1A 導入群では減少傾向があり、VASH1B 導入群では有意な減少が認められた。これらの結果から、VASH1B は強い抗新生血管効果を誘導することが示された。

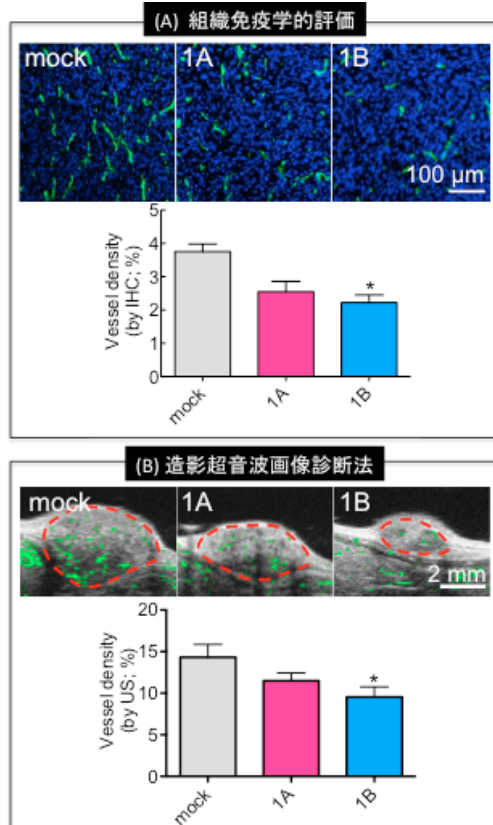


Fig. 2 腫瘍内血管密度の定量化

(3) 腫瘍血管の安定化

VASH1 遺伝子導入による腫瘍血管の安定化を評価するために、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と壁細胞のマーカーである α -SMA を免疫染色した (Fig. 3A)。VASH1A 遺伝子を導入した固形腫瘍の腫瘍中心部でのみ α -SMA 陽性内皮細胞が認められ (Fig. 3A)、VASH1A によって血管の正常化が誘導されたことが示唆された。トマトレクチンによる機能血管系染色法から VASH1A によって腫瘍内の血流が改善され (Fig. 3B)、低酸素マーカーであるピモニダゾールの免疫染色から低酸素が回避されていることが確認された (Fig. 3C)。VASH1A 導入腫瘍では血流が改善され、このため腫瘍内血管密度に有意な減少が認められなかった (Fig. 2) と示唆される。VASH1B 導入固形腫瘍では、内皮細胞の壁細胞による被覆は認められず (Fig. 3A)、血流は抑制され (Fig. 3B)、低酸素の改善は認められなかった (Fig. 3C)。

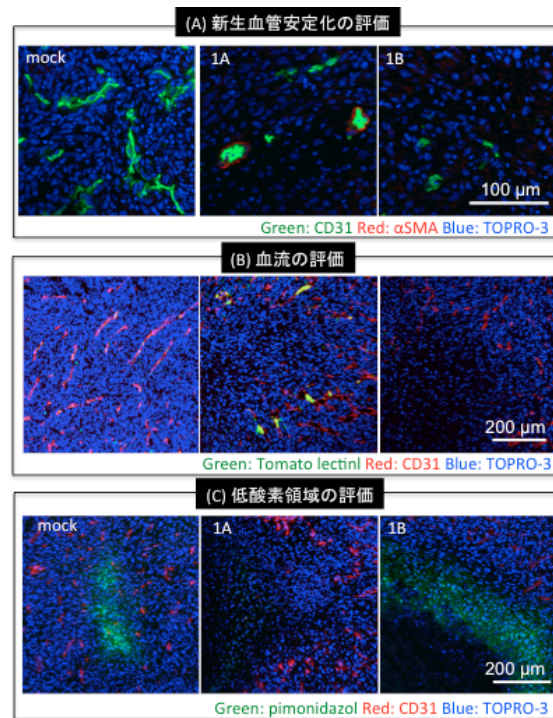


Fig. 3 腫瘍血管の安定化

以上のことから、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた非侵襲的かつ効率的な VASH1 遺伝子導入法の開発を通して、VASH1A と VASH1B は共に抗新生血管効果を誘導し、腫瘍生育を抑制することが示された。VASH1A と VASH1B はいずれも血管新生を抑制するが、その機能について、VASH1A と VASH1B は新生血管の正常化、VASH1B は新生血管の退縮と異なっていることが明らかとなった。

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)

- ① Sachiko Horie, Rui Chen, Li Li, Shiro Mori, Tetsuya Kodama, Contrast-enhanced high-frequency ultrasound imaging of early stage liver metastasis in a preclinical mouse model, *Cancer Letters*, 査読有, 339 巻, 2013 年, 208-213
DOI:10.1016/j.canlet.2013.06.006.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Sachiko Horie, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Yasufumi Sato, Distinctive roles of Vasohibin-1A and Vasohibin-1B in angiogenesis regulation, The International Vascular Biology Meeting, 2014 年 4 月 14 日-17 日, 京都
- ② Kaori Suenaga, Shuji Kitahara, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Sachiko Horie, Junichi Sugawara, Nobuo Yaegashi, Yasufumi Sato, Role of the

- vasohibin family in the regulation of placental morphogenesis, The International Vascular Biology Meeting, 2014年4月14日-17日, 京都
- ③ 堀江佐知子, 小林美穂, 鈴木康弘, 小玉哲也, 佐藤靖史, ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた Vasohibin1 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価, 日本機械学会第26回バイオエンジニアリング講演会, 2014年1月11日-12日, 仙台
 - ④ 堀江佐知子, 小林美穂, 鈴木康弘, 佐藤靖史, Vasohibin-1A と Vasohibin-1B 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価, 第9回バソヒビン研究会, 2014年1月11日-12日, 蔵王
 - ⑤ 堀江佐知子, 小林美穂, 鈴木康弘, 佐藤靖史, 腫瘍血管新生に対する Vasohibin-1A と Vasohibin-1B の役割, 第11回がんとハイポキシア研究会, 2013年12月13日-14日, 仙台
 - ⑥ Sachiko Horie, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Tetsuya Kodama, Yasufumi Sato, Evaluation of anti-tumor effects of Vasohibin-1A, a splicing variant of vasohibin-1, 2013年10月3日-5日, 第72回日本癌学術集会, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 佐知子 (HORIE, SACHIKO)
東北大学・加齢医学研究所・研究支援者
研究者番号: 90451640

(2) 研究協力者

佐藤 靖史 (SATO, YASUFUMI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 50178779

小玉 哲也 (KODAMA, TETSUYA)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号: 2040271986