

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290040

研究課題名(和文) 発癌と癌進展におけるvasohibin2の機能に関する研究

研究課題名(英文) Role of vasohibin-2 in cancer progression

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト卵巣癌細胞のVASH2ノックダウン細胞は敷石状のコロニーを形成してE-cadherinの発現が増強し、ZEB2, SNAI2, TWIST1の発現は顕著に低下、さらに細胞浸潤能の有意に低下した。胃癌を自然発症するGanマウスとGan・Vash2(-/-)マウスについて比較したところ、Gan・Vash2(-/-)マウスでは胃癌の発育と、血管新生およびがん随伴線維芽細胞が顕著に低下していた。His-VASH2カラムにマウス脳抽出物をapplyし、VASH2の結合する複数の膜蛋白をVASH受容体の候補として選出した。

研究成果の概要(英文)：We made VASH2 knockdown human ovarian cancer cells and compared their properties with those of parental cells. VASH2 knockdown cells showed cobblestone-like appearance with increased expression of E-cadherin. Moreover, the expression of ZEB2, SNAI2 and TWIST1 and the in vitro invasion activity were significantly decreased in VASH2 knockdown cells. Gan mouse is a model of spontaneous gastric cancer. We made Gan/Vash2(-/-) mice and compare their phenotype. The size of gastric cancer, the number of Ki-67 positive cancer cells, tumor angiogenesis, and the number of cancer-associated fibroblasts were significantly decreased in Gan/Vash2(-/-) mice. These results indicate that VASH2 promotes cancer progression via the pleiotropic effects on epithelial to mesenchymal transition of cancer cells, tumor angiogenesis and the activation of fibroblast. We made the His-VASH2 column, applied mouse brain extract and isolated several VASH2 binding membrane proteins as candidates of VASH receptor.

研究分野：実験病理

キーワード：vasohibin-2 上皮間葉転換 血管新生 がん随伴線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

**腫瘍血管新生**は、癌の Hallmark の1つとして癌の発育や転移と密接に関連することが知られており、多くの癌は VEGF を産生して腫瘍血管新生を促進すると考えられているが、腫瘍血管新生調節の全容は未だ明らかでない。

腫瘍血管は壁細胞の被覆が不完全な未熟な構造を呈し、透過性亢進の故に血漿成分が漏出して腫瘍間質圧が上昇するため、血流不全の状態にあり、VEGF の発現亢進の状態が持続して、さらに未熟な腫瘍血管が無秩序に新生されるといふ悪循環に陥っている。このような状況に対して、近年 VEGF シグナルを標的とした抗血管新生療法が臨床導入され、一定の効果を上げているが、VEGF は血管内皮細胞の生存因子としても機能しているため、正常な血管内皮細胞の障害に基づく副作用を引き起こす他に、腫瘍血管の退縮に基づく癌組織の低酸素の増強を来し、それが癌細胞の悪性を惹起するという可能性も懸念されていることから、従来とは異なる新たな治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

申請者は、血管内皮細胞が産生する血管新生の negative feedback 調節因子 vasohibin-1 (VASH1) と、そのホモログで VASH1 とは拮抗的に血管新生を促進する VASH2 という2つの新規分子を単離・同定し、これら Vasohibin ファミリー分子の研究を進めている。このうち VASH1 は腫瘍においても間質の血管内皮細胞に発現し、血管新生抑制作用に基づいて腫瘍の発育や転移を制御している。これに対して、VASH2 は種々の癌において癌細胞が発現し、paracrine 的に腫瘍血管新生を促進する。重要なことは、VASH2 の癌細胞における発現は、低酸素で誘導される VEGF とは異なっていることである。すなわち、VASH2 mRNA の 3' UTR には mir-200 ファミリーの microRNA の結合配列が cluster しており、特に mir-200b によってその発現は負に制御されており、mir-200b の発現が低下した癌細胞において恒常的に VASH2 の発現は上昇すること、しかも VASH2 阻害によって腫瘍血管新生は阻止され、その腫瘍血管は成熟・安定化することを見出した。このように、VASH2 の発現調節は VEGF とは異なっていることから、腫瘍血管新生の制御において、VASH2 は新たな分子標的となることが期待される。本研究では、癌細胞が発現する VASH2 の発癌から癌進展に至る機能の全容を明らかにし、癌の予後予測や新たな治療法の開発に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) がん細胞の上皮間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) に及ぼす

VASH2 の作用

がん細胞の EMT に及ぼす VASH2 の作用を、がん細胞の形態や運動性、さらに EMT 関連因子の発現から検討する。

(2) 胃癌自然発症 Gan マウスにおける VASH2 の機能

Gan マウスと Gan・Vash2<sup>lacZ/lacZ</sup> マウスの胃癌病変を比較検討する。

(3) VASH2 受容体に関する研究

プロテオミクス的手法で、マウス脳画分より単離した膜蛋白が受容体として機能するかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) がん細胞の EMT に及ぼす VASH2 の作用  
ヒト卵巣癌細胞の親株と VASH2 ノックダウン細胞を比較したところ、VASH2 ノックダウン細胞では敷石状のコロニーを形成して E-cadherin の発現が増強し、ZEB2, SNAI2, TWIST1 の発現は顕著に低下、さらに細胞浸潤能の有意に低下した。

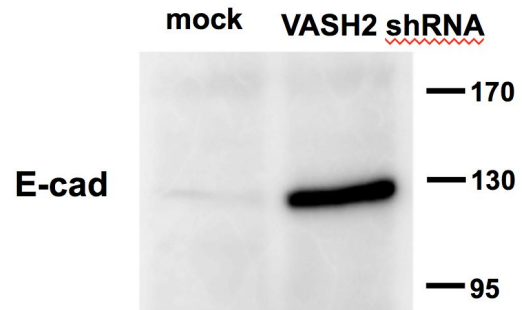


図1: VASH2 ノックダウン細胞における E-cadherin の発現増強

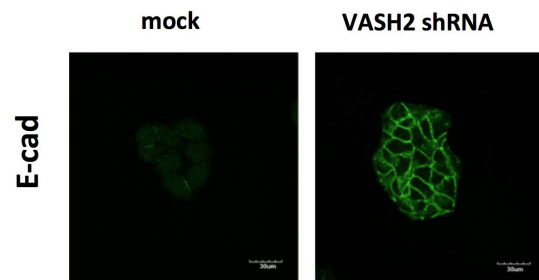


図2: VASH2 ノックダウン細胞の敷石状コロニー (E-cadherin 免疫染色像)



図3: EMT に関わる転写因子の発現変化

## (2) 胃癌自然発症 Gan マウスにおける VASH2 の機能

胃癌を自然発症する Gan マウスと Gan・Vash2<sup>lacZ/lacZ</sup> マウスについて胃癌組織を比較したところ、Gan・Vash2<sup>lacZ/lacZ</sup> マウスでは胃癌の発生・発育および胃癌細胞の Ki-67 陽性率は顕著に抑制されており、癌間質では血管新生が抑制されるとともに、SMA 陽性のがん随伴線維芽細胞の数が顕著に低下していた。

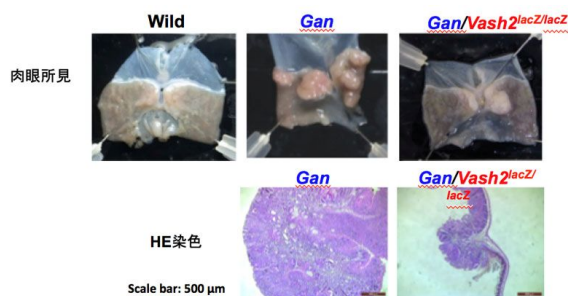


図1 : Gan・Vash2<sup>lacZ/lacZ</sup> マウスにおける胃癌の発生・発育の抑制

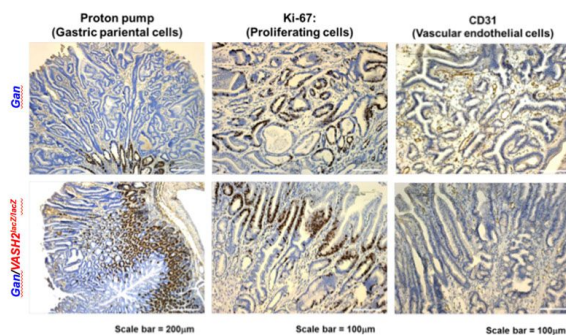
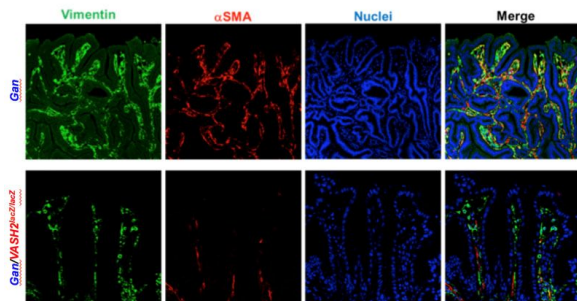


図2 : Gan・Vash2<sup>lacZ/lacZ</sup> マウスにおける胃癌細胞 Ki-67 陽性率と癌間質血管新生の抑制

図3 : Gan・Vash2<sup>lacZ/lacZ</sup> マウスにおけるが



ん随伴線維芽細胞の減少

## (3) Vasohibin 受容体の探索

His-VASH2 カラムを作成し、正常組織では脳に VASH2 が比較的発現していること

からマウス脳抽出物を apply、pull down 法によりそれぞれのカラムに結合する蛋白を単離し、MS 解析で蛋白を同定して、VASH2 のいずれにも結合する複数の膜蛋白を VASH 受容体の候補として選出した。

### 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. Kim JC, Kim KT, Park JT, Kim HJ, Sato Y, Kim HS. Expression of vasohibin-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma promotes tumor progression and is associated with a poor clinical outcome. *Hepatogastroenterology*. 62: 251-256, 2015. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. 鈴木康弘、佐藤靖史、大島正伸 胃がん発生における vasohibin-2 の役割 日本癌学会(2015年10月8-10日 名古屋)

2. 乗田理恵、鈴木康弘、堀江佐知子、佐藤靖史

Vasohibin2 は卵巣癌において上皮間葉転換を調節する 日本癌学会(2015年10月8-10日 名古屋)

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：