

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462606

研究課題名(和文)血管新生と免疫寛容を標的とした新しい卵巣癌治療法の開発に関する基礎研究

研究課題名(英文)Ovarian cancer treatment targeting angiogenesis and immune tolerance

研究代表者

嵯峨 泰 (Saga, Yasushi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70360071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：・VASHファミリーの中で、VASH1は強制発現によりVEGFのみならずPDGFなど他の血管新生因子を産生する卵巣がんの血管新生、腫瘍増殖、腹膜播種を抑制し、宿主の生存期間を延長させることが示された。一方、VASH2はsiRNAやモノクローナル抗体を用いた阻害により、卵巣がんの血管新生、腫瘍増殖を抑制可能だった。
・HGFのアンタゴニストであるNK4は免疫抑制因子IDOの産生阻害を介して、卵巣がんの免疫寛容を低下させ、腫瘍増殖を抑制した。その機序として、HGF受容体であるc-Metとその下流のシグナル経路のうち、PI3K-AKT経路が関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：・VASH1 expression inhibited tumor vascularization and growth, not only in high VEGF-producing ovarian cancer cells, but also in high PDGF-producing ovarian cancer cells, reduced their peritoneal dissemination and ascites, and prolonged host survival. These results suggest that VASH1 is an effective treatment for ovarian cancer.
・NK4 can inhibit ovarian cancer growth in vivo by inhibition of IDO expression via the c-Met-PI3K-AKT signaling pathway. These results suggest that NK4 represents a potentially useful immunotherapeutic anticancer agent for ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：VASH1 VASH2 VEGF PDGF NK4 IDO c-Met AKT

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の最も重要な進展様式は腹膜播種である。われわれはこれまでの研究、卵巣癌の腹膜播種形成には血管新生および免疫寛容が重要な役割を持つこと、さらにはこれらを阻害することにより腹膜播種形成を抑制できることを報告してきた。バソヒピンファミリーはバソヒピン 1(VASH1)とバソヒピン 2(VASH2)からなる。VASH1 は東北大学加齢医学研究所・腫瘍循環研究分野の佐藤靖史教授らによって発見され、2004 年に世界で初めて報告された血管新生のネガティブフィードバック調節因子である。VASH1 は生体内では VEGF などの血管新生因子の刺激により血管内皮自身から産生され、血管新生を調節する。VASH2 は VASH1 のホモログとして佐藤教授らによって発見され、マウス低酸素モデルにおいて血管内皮自体から産生される血管新生促進因子として 2006 年に報告された。その後われわれの基礎研究により、VASH2 は卵巣癌をはじめとした多くの腫瘍細胞自身が産生し血管新生を促進すること、VASH2 の発現を阻害することにより腫瘍増殖・腹膜播種形成を抑制できること、が明らかとなった。

インドール酸素添加酵素(IDO)は、必須アミノ酸であるトリプトファンをキヌレニンに代謝する律速酵素である。近年、様々な悪性腫瘍が IDO を高発現し、これが腫瘍免疫寛容に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。すなわち、腫瘍免疫においては細胞傷害性 T 細胞とナチュラルキラー(NK)細胞が主要な役割を担っているが、これらの細胞はトリプトファン欠乏に脆弱であり、このような環境では容易にその機能が抑制される。またトリプトファンの代謝物であるキヌレニンも NK 細胞機能を障害する。このため IDO を高発現する腫瘍はその周囲環境をトリプトファン欠乏及び高キヌレニン状態にすることによって、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の攻撃を回避し、免疫寛容を獲得する。われわれは IDO 高発現が卵巣癌の腹膜播種形成を促進すること、逆に IDO 発現を阻害することにより腹膜播種形成を抑制できることを報告した。現在、腫瘍細胞における IDO の発現機構に関しては、ほとんど解明されていない。

肝細胞増殖因子(HGF)は癌の増殖、遊走、浸潤、血管新生を促進する重要な因子である。NK4 は HGF の発見者である大阪大学の中村敏一教授らによって合成され、1997 年に発表された HGF のアンタゴニストである。NK4 は、HGF の受容体である c-Met に対し HGF と競合的に結合することにより HGF の機能を阻害する。われわれは以前に NK4 が卵巣癌の腹膜播種形成を抑制できることを報告した。最近、大腸癌細胞を用いた検討で NK4 は腫瘍への T 細胞の集積を促進し、腫瘍の増大を抑制することが報告された。

2. 研究の目的

血管新生調節因子 VASH1 と VASH2 に注目し、VASH1 を用いた、あるいは VASH2 を標的とした血管新生抑制卵巣がん治療の確立を目指して基礎研究を行う。また免疫抑制酵素 IDO に注目し、NK4 による IDO 抑制を介した免疫寛容を標的とした卵巣がん治療の確立を目指して基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1)VASH1 搭載アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる血管新生抑制卵巣がん治療

VASH1 搭載 1 型 AAV ベクター(AAV1-ASH1)を作成し、卵巣がんモデルマウスに筋肉内投与し、腫瘍増殖抑制効果を観察する。

(2)抗 VASH2 抗体による血管新生抑制卵巣がん治療

抗 VASH2 モノクローナル抗体を作成し、卵巣がんモデルマウスの腹腔内に投与し、腫瘍増殖抑制効果を観察する。

(3)NK4 による IDO を介した免疫寛容を標的とした卵巣がん治療

NK4 遺伝子導入卵巣がん細胞を作成し、マウス動物モデルでその効果を観察する。さらに NK4 遺伝子導入 NK 細胞を作成し、抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) AAV1-ASH1 による血管新生抑制卵巣がん治療

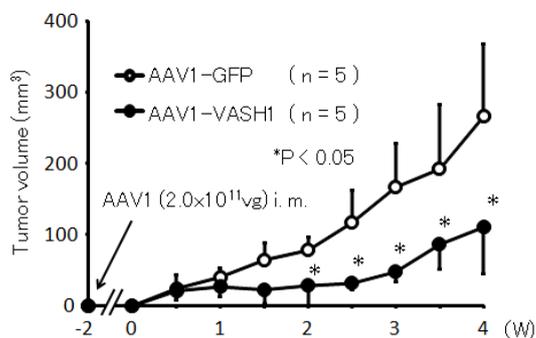
AAV1-VASH1 を作成した。このベクターを卵巣がんモデルマウスに筋肉内投与したところ、腫瘍増殖が抑制された(図 1)。

(2)抗 VASH2 抗体による血管新生抑制卵巣がん治療

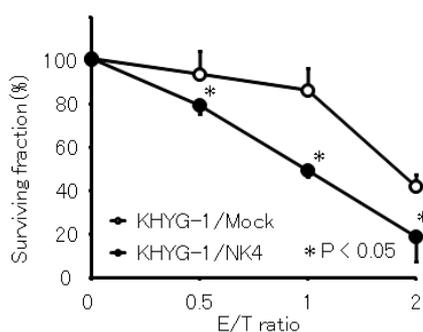
抗 VASH2 モノクローナル抗体を作成した。この抗体を卵巣がんモデルマウスの腹腔内に投与したところ、腫瘍増殖が抑制された。

(3)NK4 による IDO を介した免疫寛容を標的とした卵巣がん治療

NK4 遺伝子導入卵巣がん細胞を樹立した。この細胞をマウス動物モデルに接種したところ、腫瘍増殖の抑制がみられた。また NK4 遺伝子導入 NK 細胞を樹立した。この細胞は *in vitro* における卵巣がん細胞に対する殺細胞効果が増強した。



(図1) AAV1-VASH1 筋肉内投与による卵巣がんモデルマウス腫瘍増殖抑制効果



(図2) NK4 遺伝子導入 NK 細胞の in vitro に おける卵巣がん細胞に対する殺細胞効果

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 3 件)

Takahashi Y, Saga Y, Koyanagi T, Takei Y, Machida S, Taneichi A, Mizukami H, Sato Y, Matsubara S, Fujiwara H. The angiogenesis regulator vasohibin-1 inhibits ovarian cancer growth and peritoneal dissemination and prolongs host survival. *Int J Oncol* 47:2057-2063, 2015.

Wang D, Saga Y, Sato N, Nakamura T, Takikawa O, Mizukami H, Matsubara S, Fujiwara H. The hepatocyte growth factor antagonist NK4 inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase expression via the c-Met-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling pathway. *Int J Oncol* 48:2303-2309, 2016.

Takahashi Y, Saga Y, Koyanagi T, Takei Y, Machida S, Taneichi A, Mizukami H, Sato Y, Matsubara S, Fujiwara H. Vasohibin-1 expression inhibits advancement of ovarian cancer producing various angiogenic factors. *Cancer Sci* doi: 10.1111/cas.12911, 2016.

〔学会発表〕(計 5 件)

嵯峨 泰、佐藤尚人、高橋詳史、小柳貴裕、種市明代、町田静生、竹井裕二、藤原寛行、鈴木光明、肝細胞増殖因子(HGF)のアンタゴニスト HGF/NK4 は cMet-PI3K-AKT 経路を介してインドール酸素添加酵素 (IDO) の発現を抑制し卵巣癌の免疫寛容を低下させる、第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日、札幌

小柳貴裕、嵯峨 泰、高橋詳史、佐藤尚人、町田静生、種市明代、竹井裕二、藤原寛行、鈴木光明、新規血管新生調節因子バソヒピン 2 中和抗体の開発と卵巣癌治療応用へ向けた基礎研究、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 19 日、東京

嵯峨 泰、高橋詳史、小柳貴裕、鈴木光明、佐藤靖史、Vasohibin-1 は卵巣癌細胞のインドール酸素添加酵素発現の抑制を介して腫瘍免疫寛容を阻害する、第 9 回 Vasohibin 研究会 2014 年 1 月 11 日、蔵王

Yasushi Saga, Yoshifumi Takahashi, Takahiro Koyanagi, Mitsuaki Suzuki, Yasufumi Sato, Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of vasohibin-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector, 10th Vasohibin Meeting 2015 年 1 月 10 日、蔵王

嵯峨 泰、高橋詳史、小柳貴裕、藤原寛行、佐藤靖史、新しいゲノム編集技術 CRISPR/Cas による Vasohibin-2 ノックアウトの子宮頸癌に対する効果、第 11 回 Vasohibin 研究会 2016 年 1 月 10 日、蔵王

〔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
嵯峨 泰 (SAGA YASUSHI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70360071

研究者番号：

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：