

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20162

研究課題名(和文) 前立腺癌の癌微小環境における血管新生制御因子バソヒピンを標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文) A new strategy for the treatment of prostate cancer by targeting vasohibin family

研究代表者

宮崎 保匡 (Miyazaki, Yasumasa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：80445329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺全摘術を施行したヒト前立腺癌206例を対象としてVASH2の発現を免疫組織学的に検討した。

VASH2発現は腫瘍組織の間質の血管内皮細胞と癌細胞に発現していた。VASH2陽性癌細胞は、High Gleason scoreとHigh pT Stageの症例において有意に高い傾向を認めた($p < 0.05$)。PSA非再発生存解析では、単変量解析にてVASH2陽性癌細胞高発現群($p = 0.001$)、VASH2陽性血管高発現群($p < 0.001$)ともに有意に予後不良であった。多変量解析では術前PSA値高値、pT3以上とともにVASH2陽性癌細胞高発現が有意に予後不良であった($p = 0.006$)。

研究成果の概要(英文)：We retrospectively analyzed the clinical records of 206 patients with localized prostate cancer (Pca) performed radical prostatectomy and immunohistochemically analyzed the expression of VASH2. The expression of VASH2 was observed to vascular endothelial cells (ECs) of microvessels in the tumor stroma and Pca cells. We immunohistochemically examined the tumor cells with VASH2 as VASH2 score (proportion score x intensity score of tumor staining) and the microvessels with activated ECs as VASH2 density. Then, we analyzed the association between immunohistochemical expression and clinical outcomes.

VASH2 score was significantly associated with Gleason score and pathological T stage ($p < 0.05$). The 5-year PSA recurrence-free survival rates were significantly worse in high VASH2 score ($P < 0.05$). Multivariate analyses revealed that high VASH2 score was an independent prognostic indicator of PSA recurrence ($P = 0.006$).

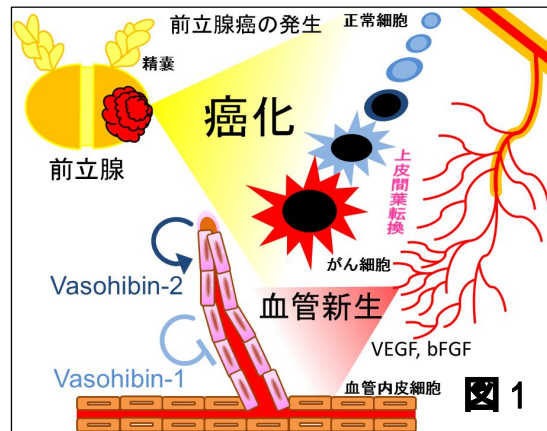
研究分野：血管新生

キーワード：血管新生 抗体療法 上皮間葉転換 バソヒピン 免疫療法 癌化 微小環境 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

血管新生阻害剤の臨床応用は他癌に先駆けて泌尿器科で開始されたが薬剤耐性が問題となっている。耐性獲得機序からも血管内皮細胞の異質性が重要であり、腫瘍進展における血管新生の制御機構や薬剤耐性獲得機序を解明することは、副作用や耐性出現を克服した新たな癌治療方法、次世代の新規血管新生阻害薬の開発につながると思っている。その中で我々は、VEGFの刺激によって活性化した血管内皮細胞で発現する遺伝子群の中から同定された Vasohibin-1 (VASH1) と Vasohibin-2 (VASH2) に着目して、Vasohibin を発見した東北大学加齢医学研究所腫瘍制御研究部門腫瘍循環研究分野の佐藤靖史教授らと平成 23 年より共同研究を開始した。特に VASH1 は外因性に投与すると血管内皮やリンパ管細胞の遊走能や増殖能を抑制する極めてユニークな蛋白質であり、血管・リンパ管新生は癌の遠隔転移、リンパ節転移に関与するため、Vasohibin の機能の解明は転移のメカニズムを解明し、「がん血管の異質性」を標的にした新たな治療につながる可能性がある(図1)。我々はすでに尿路上皮癌と前立腺癌において、VASH1 の高発現が再発や癌特異的生存率における予後因子として重要であることを報告してきた。当初、尿路上皮癌において VASH1 の発現に関する病態解明と予後予測のバイオマーカーとなるか明らかにすることを目的としてまず研究を開始した。その結果、上部尿路上皮癌において VASH1 の高発現は、術後再発の独立した危険因子であり、上部尿路上皮癌の進展への関与が示唆され、研究成果として論文発表した (Miyazaki Y, Kosaka T, et al. Clin Cancer Res. 2012.)。次に、前立腺癌の手術検体でも同様の検討を行い、VASH1 が予後を予測するバイオマーカーとなるか検討を行った。当院で診断され、根治的前立腺全摘除術が施行された限局性前立腺癌 (pT1-T3N0M0) 167 例を対象として、手術検体のパラフィン包埋切片を CD34 および VASH1 の免疫染色を行い、各種臨床的パラメータとの関連を検討した。VASH1 の発現は、High Gleason Score, High pT stage の症例において有意に高い傾向 ($p < 0.05$) を認めた。単変量解析で、VASH1 の高発現は、有意に ($p < 0.001$) 術後 PSA 再発に関連し、多変量解析でも、VASH1 の高発現 ($P = 0.007$) は、術後 PSA 再発に関連する独立した予後予測因子であった。前立腺癌においても VASH1 の高発現は、術後 PSA 再発の独立した危険因子であり、癌の進展への関与が示唆され、研究成果として論文発表した (Kosaka T, Miyazaki Y, et al. Br J Cancer. 2013.)。

以上の経過より尿路上皮癌、前立腺癌において VASH1 が疾患予後を予測する重要な因子であることが判明し、VASH1 の発現の重要性を報告してきたが VASH2 を含め、その発現制御については未だに未解明である。本研究は



VASH1, VASH2 の発現の意義とその制御機構を解明し、その調節因子を内包する癌微小環境を明らかにすることで、新しい予後診断方法やがん血管の異質性を標的とした治療薬への臨床応用に展開するための分子基盤の確立を目的として、さらなる研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、血管新生の際に特異的に発現する新規血管新生調節因子 VASH1 と VASH2 に着目し、未だに明らかになっていないその発現の制御機構を解明することにより、癌細胞によって活性化した血管内皮細胞だけを標的とした次世代の血管新生阻害薬の臨床応用に発展するための基盤となる基礎研究を行った。

3. 研究の方法

血管内皮細胞と前立腺癌の培養細胞株における細胞レベルでの Vasohibin 発現解析を行い、発現調節因子を特定する。細胞株、マウス担癌モデルへ候補治療薬の投与を行い、Vasohibin の発現変化を解析する。また、Vasohibin 遺伝子へのヒストン修飾による遺伝子発現の変化を解明し、ヒト前立腺癌検体を用いて生命予後との関連を解析して、Vasohibin のエピジェネティクス制御の関与の検討と発現制御機構を明らかにすることを目的とする。

4. 研究成果

(1) 前立腺全摘術を施行したヒト前立腺癌 206 例を対象として VASH2 の発現を免疫組織学的に検討し、各種臨床病理学的パラメータとの関連を検討した。

ヒト前立腺癌における免疫染色の検討では、VASH2 発現は腫瘍組織の間質の血管内皮細胞と癌細胞に発現していた。

VASH2 陽性癌細胞は、High Gleason score と High pT Stage の症例において、また、VASH2 陽性血管は High pT stage の症例において有意に高い傾向を認めた ($p < 0.05$)。

PSA 非再発生存解析では、単変量解析にて VASH2 陽性癌細胞高発現群 ($p = 0.001$)、VASH2 陽性血管高発現群 ($p < 0.001$) とともに有意に予後不良であった。多変量解析では術前 PSA 値高値、pT3 以上とともに VASH2 陽性癌細胞高

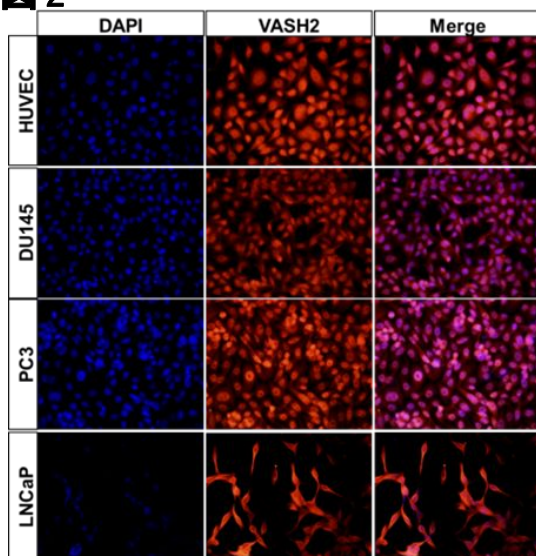
発現が有意に予後不良であった(p=0.006)。

(2)血管内皮細胞株 (HUVEC) や前立腺癌細胞株(DU145、PC3、LNCaP)における VASH1、VASH2 の発現をウェスタンブロット法、細胞蛍光免疫染色法にて検討した。

ウェスタンブロット法では、VASH1 は血管内皮細胞に発現していたが、前立腺癌細胞株 (DU145、PC3、LNCaP) では殆ど発現していなかった。VASH2 は血管内皮細胞 (HUVEC) と前立腺癌細胞株 (DU145) で強く発現を認めた。

細胞蛍光免疫染色法では、VASH1 は血管内皮細胞の細胞質に発現を確認できたが、前立腺癌細胞株では確認できなかった。VASH2 は血管内皮細胞 (HUVEC) と前立腺癌細胞株 (DU145、PC3、LNCaP) で細胞質内に発現を認めた (図 2)。

図 2



(3)VASH2 の強く発現を認めた HUVEC や DU145 に抗 VASH2 抗体を投与したところ、細胞増殖抑制効果を認めた。

以上の結果から、癌細胞や血管内皮細胞における VASH2 の発現は、前立腺癌の予後に関連していることが示唆された。今後、VASH2 を標的とした腫瘍治療効果の発現メカニズムを検討する予定である。

本研究は、前立腺癌における Vasohibin 発現の病態解明につながると期待され、学外研究者との交流が飛躍的に活性化し、血管新生を標的とした泌尿器科癌の病態解明を行う臨床研究プロジェクトにも発展しつつある。本研究で明らかになった Vasohibin の研究成果は、前立腺癌の進展予知に有用なバイオマーカーの開発という新しい研究領域の開拓 (萌芽的研究の発見) に結びつき、腫瘍における血管内皮の異質性、つまり VASH1、VASH2 を発現している血管内皮細胞をターゲットとした新規治療方法の開発の可能性への今後の発展が期待される。

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 14 件)

(1) Kobayashi H, Kosaka T, Mikami S, Miyazaki Y, Matsumoto K, Kikuchi E, Miyajima A, Kameyama K, Sato Y, Oya M. Vasohibin-1 as a novel microenvironmental biomarker for patient risk reclassification in low-risk prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 7;9(12):10203-10210. doi: 10.18632/oncotarget.23011. eCollection 2018 Feb 13. 査読有.

(2) Kosaka T, Hongo H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Miyajima A, Oya M. Reactive oxygen species induction by cabazitaxel through inhibiting Sestrin-3 in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep 21;8(50):87675-87683. doi: 10.18632/oncotarget.21147. eCollection 2017 Oct 20. 査読有.

(3) Hakozaki K, Kikuchi E, Fukumoto K, Shirotake S, Miyazaki Y, Maeda T, Kaneko G, Yoshimine S, Tanaka N, Kanai K, Oyama M, Nakajima Y, Momma T, Oya M. Significance of a frozen section analysis of the ureteral margin in bladder cancer patients treated with radical cystectomy and neoadjuvant chemotherapy. *Med Oncol*. 2017 Oct 23;34(12):187. doi: 10.1007/s12032-017-1048-5. 査読有.

(4) Tanaka N, Mizuno R, Ito K, Shirotake S, Yasumizu Y, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. External Validation of the MSKCC and IMDC Risk Models in Patients Treated with Targeted Therapy as a First-line and Subsequent Second-line Treatment: A Japanese Multi-institutional Study. *Eur Urol Focus*. 2016 Aug;2(3):303-309. doi: 10.1016/j.euf.2015.11.001. Epub 2015 Dec 2. 査読有.

(5) Daimon T, Kosaka T, Kikuchi E, Mikami S, Miyazaki Y, Hashimoto A, Hashimoto S, Mizuno R, Miyajima A, Okada Y, Sabe H, Oya M. Prognostic significance of erythrocyte protein band 4.1-like5 expression in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Urol Oncol*. 2017 Sep;35(9):543.e17-543.e24. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.04.008. Epub 2017 May 5. 査読有.

(6) Mikami S, Oya M, Kosaka T, Mizuno R, **Miyazaki Y**, Sato Y, Okada Y. Increased vasohibin-1 expression is associated with metastasis and poor prognosis of renal cell carcinoma patients. *Lab Invest*. 2017 Jul;97(7):854-862. doi: 10.1038/labinvest.2017.26. Epub 2017 Mar 13. 査読有.

(7) Tanaka N, Mizuno R, Yasumizu Y, Ito K, Shirotake S, Masunaga A, Ito Y, **Miyazaki Y**, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with first-line and subsequent second-line targeted therapy: A proposal of the modified-IMDC risk model. *Urol Oncol*. 2017 Feb;35(2):39.e19-39.e28. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.10.001. Epub 2016 Nov 4. 査読有.

(8) Tanaka N, Kosaka T, **Miyazaki Y**, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Uhlén P, Suematsu M, Oya M. Acquired platinum resistance involves epithelial to mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBX032 dysregulation. *JCI Insight*. 2016 Nov 3;1(18):e83654. 査読有.

(9) Shigeta K, Kosaka T, Kitano S, Yasumizu Y, **Miyazaki Y**, Mizuno R, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Tanoguchi H, Hasegawa S, Oya M. High Absolute Monocyte Count Predicts Poor Clinical Outcome in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Docetaxel Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2016 Nov;23(12):4115-4122. Epub 2016 Jun 30. 査読有.

(10) Shirotake S, Yasumizu Y, Ito K, Masunaga A, Ito Y, **Miyazaki Y**, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Tanaka N, Mizuno R, Oya M. Impact of Second-Line Targeted Therapy Dose Intensity on Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Dec;14(6):e575-e583. doi: 10.1016/j.clgc.2016.03.014. Epub 2016 Mar 24. 査読有.

(11) Kosaka T, Mikami S, Yoshimine S, **Miyazaki Y**, Daimon T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate

cancer. *Hum Pathol*. 2016 May;51:1-8. doi: 10.1016/j.humpath.2015.12.008. Epub 2015 Dec 30. 査読有.

(12) Tanaka N, Mizuno R, Shirotake S, Ito K, Yasumizu Y, Masunaga A, Ito Y, **Miyazaki Y**, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. Effect of reclassification of the IMDC model in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the first-line and second-line settings. *Urol Oncol*. 2016 Jul;34(7):293.e17-25. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.02.023. Epub 2016 Apr 1. 査読有.

(13) Kobayashi H, Kikuchi E, Tanaka N, Shirotake S, **Miyazaki Y**, Ide H, Obata J, Hoshino K, Matsumoto K, Kaneko G, Hagiwara M, Kosaka T, Oyama M, Nakajima Y, Oya M. Patient age was an independent predictor of cancer-specific survival in male patients with upper tract urothelial carcinoma treated by radical nephroureterectomy. *J Jpn J Clin Oncol*. 2016 Mar 9. pii: hyw028. 査読有.

(14) Hattori S, Kikuchi E, Kosaka T, **Miyazaki Y**, Tanaka N, Miyajima A, Mikami S, Oya M. Relationship Between Increased Expression of the Axl/Gas6 Signal Cascade and Prognosis of Patients with Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2016 Feb;23(2):663-70. doi: 10.1245/s10434-015-4848-x. Epub 2015 Sep 8. 査読有.

〔学会発表〕(計19件)

(1) Hongo H, Kosaka T, Yasumizu Y, **Miyazaki Y**, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Correlation between cabazitaxel resistance and EMT in metastatic castration resistant prostate cancer. American Urological Association annual meeting, 2017.

(2) **Miyazaki Y**, Kosaka T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Effects of sex hormones on cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells. American Urological Association annual meeting, 2017.

(3) Kosaka T, Hongo H, Yasumizu Y, **Miyazaki Y**, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Overcoming PI3K/MTOR inhibitor resistance by PIM1 inhibitor through regulation of tyrosine

kinase expression. American Urological Association annual meeting, 2017.

(4) Daimon T, Kosaka T, Kikuchi E, Mikami S, **Miyazaki Y**, Mizuno R, Miyajima A, Okada Y, Sabe H, Oya M. Prognostic significance of erythrocyte protein band 4.1-like5 expression in upper urinary tract urothelial carcinoma. American Urological Association annual meeting, 2017.

(5) Hongo H, Kosaka T, Yasumizu Y, **Miyazaki Y**, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Therapeutic targeting of transcriptional repressor BCL-6 in enzalutamide-resistant castration-resistant prostate cancer. American Urological Association annual meeting, 2017.

(6) Omura M, Kikuchi E, Ogihara K, Hakozaki K, Fukumoto K, Kaneko G, **Miyazaki Y**, Tanaka N, Shirotake S, Kanai K, Matsumoto K, Nagata H, Miyajima A, Oya M. Could adjuvant chemotherapy have therapeutic benefit after neoadjuvant chemotherapy in patients with equal to or greater than pT3 muscle invasive bladder cancer? American Urological Association annual meeting, 2017.

(7) Ito K, Masunaga A, Tanaka N, Mizuno R, Shirotake S, Yasumizu Y, Ito Y, **Miyazaki Y**, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Monma T, Nakagawa K, Masuda T, Oyama M, Asano T, Oya M. Usefulness of inflammatory marker dynamics one month after the first-line targeted therapy initiation for PFS prediction in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. American Urological Association annual meeting, 2017.

(8) **Miyazaki Y**, Kosaka T, Mikami S, Yasumizu Y, Tanaka N, Kikuchi E, Miyajima A, Sato Y, Oya M. A new strategy for the treatment of prostate cancer by targeting vasohibin-2. American Urological Association annual meeting, 2016.

(9) Hongo H, Kosaka T, Yasumizu Y, **Miyazaki Y**, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Bioinformatic analysis utilizing the androgenic suppressive effect identified promising candidate drugs for reprogramming docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. American Urological Association annual meeting, 2016.

(10) Kosaka T, Hongo H, **Miyazaki Y**, Kikuchi

E, Miyajima A, Oya M. Reactive oxygen species induction by Cabazitaxel via inhibition of the Sestrin family in castration-resistant prostate cancer. American Urological Association annual meeting, 2016.

(11) **Miyazaki Y**, Kikuchi E, Tanaka N, Shirotake S, Matsumoto K, Kobayashi H, Ide H, Obata J, Ishioka K, Kosaka T, Kanao K, Oyama M, Miyajima A, Momma T, Hasegawa S, Nakajima Y, Jinzaki M, Oya M. Impact of maximum tumor diameter adjusted by primary tumor location in patients with upper tract urothelial carcinoma managed by radical nephroureterectomy: The multi-institutional study. American Urological Association annual meeting, 2016.

(12) Kobayashi H, Kikuchi E, Tanaka N, Shirotake S, **Miyazaki Y**, Ide H, Obata J, Hoshino K, Matsumoto K, Kaneko G, Hagiwara M, Kosaka T, Hara S, Miyajima A, Momma T, Nakagawa K, Oya M. External validation of prognostic impact of patient age and gender in patients treated with radical nephroureterectomy: Proposed new perspective of gender-adjusted age in upper tract urothelial carcinoma. American Urological Association annual meeting, 2016.

(13) **Miyazaki Y**, Kosaka T, Mikami S, Yasumizu Y, Tanaka N, Kikuchi E, Miyajima A, Sato Y, Oya M. A new strategy for the treatment of prostate cancer by targeting vasohibin-2. Japanese Urological Association annual meeting Award Contest, 2017.

(14) 小林 裕章, 小坂 威雄, 三上 修治, **宮崎 保匡**, 松本 一宏, 菊地 栄次, 宮嶋 哲, 亀山 香織, 佐藤 靖史, 大家 基嗣. 低リスク限局性前立腺癌におけるがん微小環境マーカーとしてのVasohibin-1発現の臨床的意義. 第105回日本泌尿器科学会総会. 2017年.

(15) 本郷 周, 小坂 威雄, **宮崎 保匡**, 菊地 栄次, 大家 基嗣. BCL6を標的としたエンザルタミド耐性去勢抵抗性前立腺癌克服戦略. 第76回日本癌学会学術総会. 2017年.

(16) **宮崎 保匡**, 小坂 威雄, 三上 修治, 安水 洋太, 田中 伸之, 菊地 栄次, 佐藤 靖史, 大家 基嗣. 前立腺癌における予後因子としてのバソヒビン2発現の検討. 第76回日本癌学会学術総会. 2017年.

(17) 小坂 威雄, **宮崎 保匡**, 宮嶋 哲, 菊地 栄次, 大家 基嗣. CRPC におけるアンドロゲン受容体シグナル経路以外の臨床的に治療介入可能なシグナル経路. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年.

(18) **宮崎 保匡**, 小坂 威雄, 三上 修治, 安水 洋太, 田中 伸之, 菊地 栄次, 宮嶋 哲, 佐藤 靖史, 大家 基嗣. 前立腺癌に対する Vasohibin-2 を標的とした新規治療戦略. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年.

(19) **宮崎保匡**, 小坂 威雄, 三上 修治, 安水 洋太, 田中 伸之, 菊地 栄次, 宮嶋 哲, 佐藤 靖史, 大家 基嗣. 前立腺癌における Vasohibin-2 の発現の検討. 第 25 回泌尿器科分子細胞・細胞研究会. 2016 年.

〔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
<http://www.keio-urology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎保匡 (MIYAZAKI, Yasumasa)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 80445329