

平成22年5月14日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005年度 ～ 2009年度

課題番号：17014006

研究課題名（和文）がん組織における内因性血管新生抑制のシグナリング機構

研究課題名（英文）Signaling of intrinsic angiogenesis inhibition in cancer tissues

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

研究成果の概要（和文）：

血管内皮が産生する血管新生の negative feedback 調節因子 Vasohibin-1 (VASH-1) および VASH-1 と機能的に拮抗する Vasohibin-2 (VASH-2) の意義について研究し、病理組織において腫瘍血管内皮での VASH-1 の発現は、がん細胞の VEGF、がん組織のグレードやがん細胞の増殖等と相関することを示した。また、動物実験より、内因性 VASH-1 は腫瘍血管新生の抑制に機能するが、外因性 VASH-1 を補充することで、広いスペクトルで腫瘍血管新生・リンパ管新生は制御され、がんの発育とリンパ節転移が抑制されること、一方 VASH-2 は浸潤する単核球や癌細胞が発現し、腫瘍血管新生を介してがんの発育を促進すること、などの知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

The role of vasohibin-1 (VASH-1), a negative feedback regulator of angiogenesis synthesized by endothelial cells (ECs), and vasohibin-2 (VASH-2) which antagonizes VASH-1 was studied. Pathological analysis revealed that VASH-1 was present in ECs in tumor vessels, which was correlated with VEGF in cancer cells, pathological grading, and proliferation rate of cancer cells. Animal models revealed that endogenous VASH-1 regulates tumor angiogenesis, but exogenous supplementation of VASH-1 further exhibited anti-angiogenic and anti-lymphangiogenic activities and inhibited tumor growth and lymph node metastasis. VASH-2 was shown in mononuclear cells infiltrating in cancer stroma as well as in cancer cells, and VASH-2 promoted tumor growth by stimulating angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	11,300,000	0	11,300,000
2006年度	11,400,000	0	11,400,000
2007年度	11,400,000	0	11,400,000
2008年度	11,400,000	0	11,400,000
2009年度	11,400,000	0	11,400,000
総計	56,900,000	0	56,900,000

研究分野：血管生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍血管新生、内因性調節因子、vasohibin-1、vasohibin-2

1. 研究開始当初の背景

新しい血管網が形成される血管新生は、本来生理的現象であるが、癌の発育と転移に必要不可欠であることから、その効果的な制御法の確立が望まれている。しかし、癌における血管新生の内因性制御機構の全貌は未だ明らかとされていない。

血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによって調節されており、これまでにさまざまな抑制因子が報告されてきた。生体には刺激に対して反応が行き過ぎないための“ホメオスターシス機構”が備わっているが、血管新生における negative feedback 調節因子の存在は知られていなかった。

2. 研究の目的

申請者は、血管新生刺激に反応して血管内皮細胞が産生・分泌し、自らに作用して血管新生を制御するnegative feedback調節因子 VASH-1と、そのホモログのVASH-2を単離・同定した。本研究の目的は、血管新生の新しい調節系としてのVasohibinファミリー分子の腫瘍血管新生における意義や病態との関連を明らかにし、さらにVasohibinの治療応用の可能性について検討することで、独自の切り口からの癌研究の進展に貢献することである。

3. 研究の方法

- (1) 各種ヒト癌の病理標本について VASH-1とVASH-2の発現を解析する。
- (2) VasohibinのELISA系を構築し、ヒトがん患者における血中濃度を測定して病態との関連を検討する。
- (3) 野生型マウスや遺伝子改変マウスを用いてVASH-1とVASH-2の時間・空間的発現様式とそれぞれの機能を検討する。
- (4) ヒトVASH-1あるいはヒトVASH-2をコードするアデノウイルスベクターを尾静注して肝臓で過剰発現させ、血管新生や移植腫瘍の発育に対する外因性Vasohibinの作用を検討する。
- (5) リンパ管新生に対するVasohibinの役割を検討する。
- (6) Two-hybrid法によりVasohibin結合因子を単離し、その機能を解析する。
- (7) VASH-1による血管新生抑制のメカニズムを、培養内皮細胞を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) VASH-1 蛋白は腫瘍血管内皮に証明された。ヒト肺癌標本での検討では、腫瘍細胞のHIF-1 α およびVEGFの染色性と血管内皮細胞のvasohibin陽性率との間に有意の相関性を認め、VASH-1は主に壁細胞で被覆されている成熟した腫瘍血管の内皮細胞に発現していることが確かめられた。子宮体癌においてVASH-1は腫瘍血管内皮に証明され、その発現頻度は癌の組織分類が未分化のものほど高く、またVEGF 2型受容体の発現と相関することを示した。乳癌においても、VASH-1は腫瘍血管内皮に証明され、その発現は癌のVEGF発現や血管内皮のVEGF 2型受容体発現と相関し、さらに乳癌細胞の増殖の程度、癌の悪性のものほど腫瘍血管での発現率が高いことが判明した。

(2) VASH-1のELISAによるアッセイ系を構築し、がん患者の血中VASH-1濃度を測定したが、肺癌、子宮癌、卵巣癌の患者について血中VASH-1濃度を健常者との間で比較では、有意の変化は観察されなかった。

(3) マウス皮膚血管新生モデルでは、VASH-1は血管新生の先端部のPCNA陽性内皮細胞では陰性で、より後方のPCNA陰性内皮細胞に局在していたのに対し、VASH-2は血管新生の先端部に浸潤する骨髄由来単核球に発現していた。VASH-1遺伝子改変マウスでは血管新生は終息せず、未熟の状態のまま血管新生は遷延したのに対し、VASH-2遺伝子改変マウスでは血管新生が強く抑制されていた。以上より、VASH-1は血管新生の終息と新生血管の安定化に寄与するのに対し、VASH-2はVASH-1と拮抗して血管新生を促進すると考えられた。VASH-1遺伝子改変マウスにLewis肺癌細胞を移植したところ、移植腫瘍は腫瘍血管新生に富み、内因性VASH-1は腫瘍血管新生の抑制に寄与することが確認された。

(4) それぞれの遺伝子をコードするアデノウイルスベクターを用いた検討から、外因性VASH-1は内因性VASH-1の発現のない血管新生の先端部に作用して血管新生を抑制するのに対し、外因性VASH-2は血管新生は遷延させた。Lewis肺癌細胞をマウスに皮下移植し、アデノウイルスベクターを尾静注して外因性VASH-1の効果を検討ところ、VASH-1は腫瘍の発育を優位に抑制した。その際、血管構築は、壁細胞で被覆されていない、未熟な

拡張した腫瘍血管から、壁細胞によって被覆された成熟血管へと変換し、血管断面積も有意に減少した。

(5) リンパ管に関して、VASH-1、VASH-2は、いずれもリンパ管内皮での発現は認められないが、マウス角膜マイクポケット法で解析から、VASH-1は、VEGF-C、VEGF-A、FGF-2、PDGF-BBによって惹起されるリンパ管新生を、いずれも顕著に抑制することを見出した。さらに、抗リンパ節転移性ヒト肺癌細胞株をヌードマウスに同所移植し、アデノウイルスベクターを用いてヒトVASH-1を肝臓で高発現させると、癌辺縁部のリンパ管新生とリンパ節転移が有意に抑制された。

(6) VASH-1の結合因子を単離・同定し、SVBP (small vasohibin binding protein) と命名した。SVBPは内皮細胞に構成的に発現し、VASH-1が誘導性に内皮細胞に発現するとSVBPと結合して複合体を形成すること、VASH-1は、それ単独では吸着性が非常に高く、また分解を受け易いが、SVBPと結合して複合体を形成する可溶性と安定性が増し、VASH-1/SVBP複合体の型で細胞外に分泌されることが明らかとなった。また、SVBPはVASH-2とも結合することが確認された。

(7) VASH-1は内皮細胞の脱チロシン化 α -チューブリン (Glu-チューブリン)を増加させること、また内皮細胞に α -チューブリンのカルボキシル末端にチロシンを再付加するチューブリンチロシンリガーゼ (TTL)を過剰発現させておくと、Glu-チューブリンは増加せず、VASH-1による細胞遊走抑制も解除された。以上より、VASH-1は α -チューブリンの脱チロシン化を誘導することで微小管に作用し、細胞遊走を抑制すると考えられた。

(8) VASH-2の癌組織での発現について検討したところ、単核球だけでなく癌細胞もVASH-2を発現していることを観察した。そこでVASH-2発現陰性の腫瘍細胞にVASH-2を導入してマウスに移植すると、腫瘍血管新生と腫瘍発育が増強し、逆にVASH-2発現陽性の腫瘍細胞のVASH-2をノックダウンすると腫瘍血管新生と腫瘍発育が抑制されたことから、VASH-2は腫瘍血管新生を介してがんの発育を促進すると考えられた。

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 29件) 全て査読有

1. Heishi T, Hosaka T, Suzuki Y, Miyashita H, Oike Y, Takahashi T, Nakamura T, Arioka S,

Mitsuda Y, Takakura T, Hojo K, Matsumoto M, Yamauchi C, Ohta H, Sonoda H, Sato Y. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits a broad-spectrum anti-lymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. *Am. J. Pathol.* 176: 1950-1958, 2010.

2. Tamaki K, Sasano H, Maruo Y, Takahashi Y, Miyashita M, Moriya T, Sato Y, Hirakawa H, Tamaki N, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N. Vasohibin-1 as a potential predictor of aggressive behavior of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Sci.* 101: 1051-1058, 2010.

3. Yoshida T, Sato Y, Morita I, Abe M. Pigpen, a nuclear coiled body component protein is involved in angiogenesis. *Cancer Sci.* 101: 1170-1176, 2010.

4. Komi Y, Sogabe Y, Ishibashi N, Sato Y, Moriwaki H, Shimokado K, Kojima S. Acyclic retinoid inhibits angiogenesis via suppressing MAPK pathway. *Lab. Invest.* 90: 52-60, 2010.

5. Miura S, Mitsui K, Heishi T, Shukunami C, Sekiguchi K, Kondo J, Sato Y, Hiraki Y. Impairment of VEGF-A-stimulated lamellipodial extensions and motility of vascular endothelial cells by Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor. *Exp Cell Res.* 316: 775-788 2010.

6. Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, Ohuchi N, Sasano H. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci.* 100:88-94, 2009.

7. Lefter, L.P, Dima, S., Sunamura, M., Furukawa, T., Sato, Y., Abe, M., Chivu, M., Popescu, I. and Horii, A. Transcriptional silencing of ETS-1 efficiently suppresses angiogenesis of pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* 16:137-148, 2009.

8. Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y, and Nishida K. Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 52:359-361, 2009.

9. Nishida Y, Shibata K, Yamasaki M, Sato Y, and Abe M. A possible role of vimentin on the cell surface for the activation of latent transforming growth factor- β . *FEBS Lett.* 583: 308-312, 2009.

10. Naito H, Kidoya H, Sato Y, and Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J. Biochem.* 145: 653-659, 2009.

11. Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, Ohta H, Fujiwara T, Shimosegawa T and Sato Y. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 113:4810-4818, 2009.
12. Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Moriya T, Suzuki S, Kondo T, Sato Y. Vasohibin-1 expressed in endothelium of tumor vessels regulates angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 175:430-439, 2009.
13. Taniguchi K, Sasaki K, Watari K, Yasukawa H, Imaizumi T, Ayada T, Okamoto F, Ishizaki T, Kato R, Kohno R, Kimura H, Sato Y, Ono M, Yonemitsu Y, Yoshimura A. Suppression of Sproutys has a therapeutic effect for a mouse model of ischemia by enhancing angiogenesis. *PLoS ONE* 4:e5467, 2009.
14. Nasu T, Maeshima Y, Kinomura M, Hirokoshi-Kawahara K, Tanabe K, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y, Makino H. Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, ameliorates renal alterations in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes* 58: 2365-2375, 2009.
15. Suzuki H, Ohkuchi A, Matsubara S, Takei Y, Murakami M, Shibuya M, Suzuki M, Sato Y. The effect of recombinant PlGF-2 on hypertension induced by full-length mouse sFlt-1 adenoviral vector in pregnant mice. *Hypertension* 54:1129-1135, 2009.
16. Miyake K, Nishida K, Kadota Y, Yamasaki H, Nasu T, Saitou D, Tanabe K, Sonoda H, Sato Y, Maeshima Y, Makino H. Inflammatory Cytokine-induced Expression of Vasohibin-1 by Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Acta Medica Okayama* 63: 349-58, 2009.
17. Yoshinaga, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Yaegashi, N., and Sato, Y. Vasohibin, a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor: its expression on endometrial carcinoma in relation to tumor vascularity. *Cancer Sci.* 99: 914-919, 2008.
18. Wakusawa, R., Abe, T., Sato, H., Yoshida, M., Kunitaka, H., Sato, Y, and Nishida K. Expression of vasohibin, an antiangiogenic factor, in human choroidal neovascular membranes. *Am. J. Ophthalmol.* 146:235-243, 2008.
19. Suzuki, T., Abe, M., Miyashita, H., Kobayashi, T., and Sato, Y. Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) affects RhoA activation in endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 211: 708-715, 2007.
20. Shen, JK., Yang, XR., Sato, Y, and Campochiaro, PA. Vasohibin is Up-regulated by VEGF in the Retina and Suppresses VEGF receptor 2 and Retinal Neovascularization. *FASEB J.* 20: 723-725, 2006.
21. Shibuya, T., Watanabe, K., Yamashita, H., Shimizu, K., Miyashita, H., Abe, M., Moriya, T., Ohta, H., Sonoda, H., Shimosegawa, T., Tabayashi, K., and Sato, Y. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1051-1057, 2006.
22. Yamashita, H., Abe, M., Watanabe, K., Shimizu, K., Moriya, T., Sato, A., Satomi, S., Ohta, H., Sonoda, H., and Sato, Y. Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 919-925, 2006.
23. Koizumi, T., Abe, M., Yamakuni, T., Ohizumi, Y., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K., and Sato, Y. Metronomic scheduling of a cyclic hexapeptide RA-VII for anti-angiogenesis, tumor vessel maturation, and anti-tumor activity. *Cancer Sci.* 97: 665-674, 2006.
24. Abe M., and Sato, Y. Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is required for the development of vascular as well as hematopoietic system in embryoid bodies. *Genes Cells* 11: 719-729, 2006.
- など
- 〔学会発表〕(計 80 件)
- 国際学会・シンポジウム・招待講演
1. Sato Y. The Significance of Vasohibin, an Angiogenesis Inhibitor Expressed in Endothelium, in Cancers and Other Pathological Conditions. NHRI Conference Series 2009 International Conference on Vascular Biology. Zhunan, Taiwan, October 31, 2009.
2. Sato Y. The Role of Vasohibin in the Regulation of Angiogenesis. 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, June 5, 2008.
3. Sato Y. The Role of Vasohibin in the Regulation of Tumor Angiogenesis. 9th International Conference Angiogenesis: Basic Science and Clinical Applications. Patras, Greece, June 25, 2008.

4. Sato Y. Significance of Endothelium-derived Angiogenesis Inhibitors in Tumors. 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. Hawaii, USA, January 24, 2007.

5. Sato Y. The role of vasohibin family in the regulation of angiogenesis. Seventh ESH Euroconference on Angiogenesis. Albufeira, Portugal, May 12, 2007.

6. Sato Y. The role of vasohibin family in the regulation of angiogenesis. Angiogenesis & Microcirculation. Newport, USA, August 22, 2007.

7. Sato Y. The vasohibin family: novel regulators of angiogenesis and lymphangiogenesis. OLS/NUS-Tohoku/COE Joint Symposium. Singapore/Bintan, September 6, 2007.

8. Sato Y. Role of vasohibin family in the regulation of angiogenesis. The Joint Meeting of Vascular Biology Organizations in Asia Pacific Region. Tainan, Taiwan, October 21, 2007.

9. Sato Y. An endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin and its significance in tumor angiogenesis. The 10th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Tokyo, January 27, 2006.

10. Sato Y. An Endothelium-derived Angiogenesis Inhibitor Vasohibin and its Significance in Tumor Angiogenesis. 21th Bristol-myers Squibb Nagoya International Symposium on Cancer Chemotherapy. Nagoya, February 25, 2006.

11. Sato Y. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2006. Washington DC, USA, April 5, 2006.

12. Sato Y. Vasohibin, a Novel Angiogenesis Inhibitor in Vascular Endothelium. 5th Congress of Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. Jeju, Korea, April 13, 2006.

13. Sato Y. Significance of Endothelium-derived Angiogenesis Inhibitor Vasohibin in Tumors. The Thirty-seventh International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November 16, 2006.

14. Sato Y. Transcriptome of Vascular Endothelium in Angiogenesis: Isolation and Characterization of a Novel Endothelium-Derived Angiogenesis Inhibitor, Vasohibin. The International Society on Thrombosis &

Haemostasis XXth Congress. Sydney, Australia, August 9, 2005.

15. Sato Y. The Endothelium-Derived Angiogenesis Inhibitor Vasohibin and its Significance in Tumor Angiogenesis. 10th Japanese-German Workshop on Molecular and Cellular Aspects on Carcinogenesis. Essen, Germany, September 30, 2005.

16. Sato Y. An endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin and its significance in tumor angiogenesis. The Ascona Conference on Angiogenesis. Ascona, Switzerland, October 1-5, 2005.

国際学会・一般演題

17. Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Moriya T, Suzuki S, Kondo T, Sato Y. Vasohibin expressed in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. 7th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells. Vienna, Austria, September 2-5, 2009.

18. Heishi T, Miyashita H, Takahashi T, Oike Y, Sato Y. Vasohibin Suppresses Lymph Node Metastasis via the Inhibition of Lymphangiogenesis in Mice. 15th International Vascular Biology Meeting. Sydney, Australia, June 1-5, 2008.

19. Heishi T, Tamai T, Suzuki H, Hosaka T, Kimura H, Kobayashi M, Suzuki Y, Miyashita H, Takahashi T, Sato Y. Vasohibin inhibits lymphangiogenesis in mouse cornea and xenograft cancer model. OLS/NUS-Tohoku/COE Joint Symposium. Singapore/Bintan, September 5-6, 2007.

20. Kousuke Y, Takuya M, Satoru N, Tadao T, Hitoshi N, Kiyoshi I, Nobuo Y, Yasufumi S. Vasohibin, a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor: its expression on endometrial carcinoma in relation to tumor vascularity. 97th Annual Meeting American Association for Cancer Research 2006. Washington DC, USA, April 1-5, 2006.

21. Kimura H, Miyashita H, Ota H, Sonoda H, Shimosegawa T, Sato Y. Vasohibin, a VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor, may act as a terminator of angiogenesis. XIVth International Vascular Biology Meeting. Noordwijkerhout, Netherlands, June 6-10, 2006.

22. Yamashita H, Abe M, Shibuya T, Watanabe K, Shimizu K, Sato Y. Application of vasohibin for

prevention of adventitial angiogenesis and arterial neointimal formation. XIVth International Symposium on Atherosclerosis. Rome, Italy, June 18-22, 2006.

23. Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H, Shimizu K, Abe M, Moriya T, Ohta H, Sonoda H, Tabayashi K, Sato Y. A comparative study on the expression of vasohibin, an endothelium-derived negative-feedback angiogenesis regulator, and its sole homologue basohivin-2. Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, 2005. Doosan, Korea, August 11-12, 2005.
など

[図書] (計 6件)

1. Sato, Y. Endogenous inhibitors of angiogenesis. In "Angiogenesis. Basic Science and Clinical Applications" (Transworld Research Network) pp 1-14, 2007.
など

[産業財産権]

○出願状況 (計 5件)

名称: 抗バズヒビンモノクローナル抗体のセット

発明者: 佐藤靖史、近藤丘

権利者: 東北大学

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2009/64862

出願年月日: 平成 21 年 8 月 26 日

国内外の別: 国外

名称: 固形癌の存在の検出法

発明者: 佐藤靖史

権利者: 東北大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2009-190830

出願年月日: 平成 21 年 8 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 血管新生促進因子バズヒビン2

発明者: 佐藤靖史

権利者: 東北大学

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2009/051359

出願年月日: 平成 21 年 1 月 28 日

国内外の別: 国外

名称: バズヒビン修飾体

発明者: 佐藤靖史

権利者: 東北大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2008-328406

出願年月日: 平成 20 年 12 月 24 日

国内外の別: 国内

名称: リンパ管新生を抑制する蛋白質

発明者: 佐藤靖史

権利者: 東北大学

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2007/72838

出願年月日: 平成 19 年 11 月 27 日

国内外の別: 国外

○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

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/vascbio/>

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

なし

(3) 連携研究者

なし