

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2006~2008
 課題番号： 18791141
 研究課題名 (和文)
 新規血管新生阻害因子 Vasohibin の子宮内膜癌における臨床応用の検討
 研究課題名 (英文)
 Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer.
 研究代表者 吉永 浩介 (YOSHINAGA KOUSUKE)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号： 40343058

研究成果の概要：結果として正常内膜・分化度との比較において類内膜腺癌では低分化になるほど血管新生増殖に向かっていることが客観的に明らかになり、類内膜腺癌において Vasohibin を用いた血管新生阻害治療が有効である可能性を示した。このことは論文発表しており今後は血漿中の Vasohibin の ELISA 測定を行い、類内膜癌の腫瘍マーカーとしての可能性を検討し、将来的には vasohibin を用いて本邦オリジナルの血管新生阻害薬の開発につなげていきたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：vasohibin, VEGF, VEGFR-2, 子宮内膜癌、血管新生、血管密度、リンパ管密度

1. 研究開始当初の背景

成熟女性の正常子宮内膜はステロイドホルモンの周期的変化に伴い、ほぼ28日周期で増殖期、分泌期、月経期を繰り返している。それを血管新生の観点からなめると、増殖期に盛んに血管新生が行われていたものが、排卵を境として血管新生に急激ブレーキがかかるということである。このような血管新生能の急激な切り替えには、血管新生を正に制御する機構の消退のみでなく、血管新生に関す

る何らかの負の制御機構の作用を示唆させる。近年、子宮内膜から派生する種々の生理学的あるいは病理学的状況において、血管新生の制御機構の役割が注目されてきた。従来の血管新生に関する研究の中心は、血管新生に最も直接的な役割を果たす VEGF とその主受容体 VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (Flk-1) に関するものであった。またこのような正の制御機構とは別に、血管新生に関する負の制御機構として Thrombospondin-1 (TSP-1) やアンジオ

スタチンなどが研究されてきた。しかし、それらは血管内皮細胞にとって外的な要因に過ぎず、負に制御する血管内皮自身の内因性機構については全くわかっていなかった。

研究開始当時、血管内皮細胞の内因的な負の制御機構として、2種類の Vasohibin 分子が研究協力者の佐藤靖史博士の教室（東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野・教授）で分離同定された (Watanabe K, et al. *J Clin Invest* 2004; 114: 898-907)。Vasohibin は腫瘍血管の血管内皮細胞内に VEGF を添加することにより同細胞が発現する。さらに Vasohibin を肺癌細胞株において過剰発現させることで腫瘍血管新生を阻害し腫瘍増殖を抑える。特徴的なのは、Vasohibin を分泌するのは血管内皮細胞のみであること、また Vasohibin が抑制するのは血管内皮細胞の増殖に特異的であること、である。すなわち Vasohibin は血管内皮に特異的な内因性の血管新生抑制物質と言える (Shimazu K, et al. *BBRC* 2005; 327: 700-6)。このような性質から Vasohibin は今後の腫瘍循環学に臨床応用が期待される有望な血管新生阻害因子である。当時既に、研究代表者は佐藤博士との共同研究に着手しており、正常内膜の血管内皮における Vasohibin 蛋白の発現が増殖期ではほとんどみられないのに反し、分泌期で強く発現することを明らかとし (unpublished data)、分泌期から増殖期に移行するにあたり Vasohibin の発現が増殖期に盛んであった血管新生を急速に強く抑制するのであろうと推測していた。また正常子宮内膜の血管内皮で Vasohibin の発現が検出されたということは、異所性発育（子宮内膜症）や腫瘍化（子宮内膜癌）での本分子の役割についても非常に興味を持たれるところであった。

2. 研究の目的

我々の研究目的は正常子宮内膜、子宮内膜癌および子宮内膜症における Vasohibin 分子 (Vasohibin おとび Vasohibin II) の存在意義を明らかにすることであった。正常内膜の月経周期による血管新生の制御の乱れが、その腫瘍化（癌）や異所性増殖（内膜症）の発生進展に関連しているのではないか、という着想自体が独創的と言える。

本研究により、血管内皮に対して特異的に抑制効果を示す Vasohibin の発現時期、発現程度、発現場所が各子宮内膜組織で明らかになるであろう。さらに子宮内膜由来の各種培養細胞を用いた研究から Vasohibin の子宮内膜における機能・役割についても明らかになる。子宮内膜癌や子宮内膜症に対する Vasohibin による遺伝子治療の可能性を探索

することができるであろう。

Vasohibin および Vasohibin II は 2004 年、東北大学加齢医学研究科の佐藤靖史博士の教室で単離され機能解析が行われている遺伝子である (Watanabe K, et al. *J Clin Invest* 2004; 114: 898-907)。構造的に従来知られている分子との類似性が全くなく、また今まで機能がわかっていなかった。当教室では Vasohibin 分子に対する単クローン抗体もすでに作製を終え (Shimazu K, et al. *BBRC* 2005; 327: 700-6)、研究代表者は同教室との共同研究として正常子宮内膜の免疫染色やウエスタンブロットに使用している。この抗体はまだ市販されておらず婦人科腫瘍における検索は国際的にも皆無である。また Vasohibin の濃度を測定する ELISA 法も同教室ですでに確立している。このように本研究は国際的にもても先進的かつ独創的な研究であり、また研究代表者は本研究遂行に必要なマテリアルを世界に先駆けて優先的に使用することができる立場にある。

3. 研究の方法

正常子宮内膜増殖期を 6 例・分泌期 6 例と類内膜腺癌高分化型 27 例・中分化型 25 例・低分化型 26 例に関して間質の血管密度・リンパ管密度・VEGF レセプター II の発現頻度・Vasohibin の発現頻度を解析した。

各内膜組織のホルマリン固定後パラフィン包埋標本を用いて、Vasohibin をはじめとする血管新生関連遺伝子 (VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, TPH-1, TPH-2 など) の蛋白発現を検討する。正常子宮内膜（増殖期 6 例、分泌期 6 例）、子宮内膜癌 78 例。子宮内膜癌の組織型は高分化型類内膜腺癌 27 例、中分化型類内膜腺癌 25 例、低分化型類内膜腺癌 26 例を予定していた。

Vasohibin をはじめとする血管新生関連分子の発現を蛋白レベルでも確認を予定した。さらに免疫染色では、発現の局在も検討を予定した。これらより内膜腫瘍化に伴う血管新生因子の発現局在の変化から、癌発生や進展との関連性を検討する。抗 Vasohibin 単クローン抗体は研究協力者の佐藤靖史博士より供与を受ける。他の抗体は市販のものを使用した。

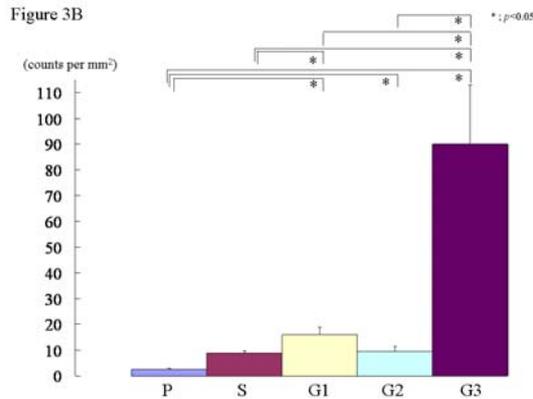
子宮内膜癌や子宮内膜症で手術を受けた患者の手術前血清を用いて血中 Vasohibin 濃度の測定を行う。測定は研究協力者である佐藤教授の教室で開発した Vasohibin 濃度を測定する ELISA 法を用いる。子宮内膜癌の患者血清 200 検体、子宮内膜症の患者血清 100 検体はすでに研究代表者の教室で保存してある。血中 Vasohibin 濃度と病理データおよび臨床

データとをつきあわせて検討する。これにより Vasohibin の血中濃度測定が子宮内膜癌の腫瘍マーカーとしての可能性、予後因子としての可能性を探索する。

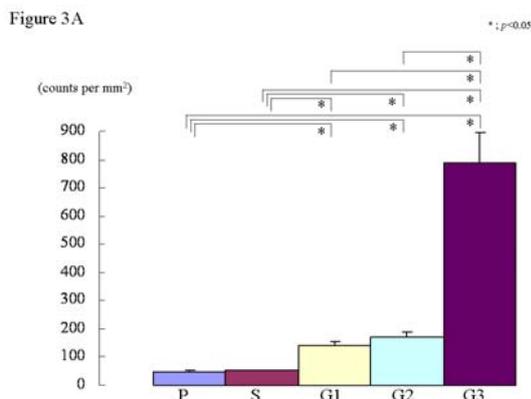
子宮体癌細胞株 (Ishikawa, Sawano, 他、数種類をすでに保有) をラット角膜に移植することで、各細胞株の血管新生能を観察する。さらに Vasohibin 遺伝子の発現ベクターを製作し、細胞株に遺伝子導入する。予想では Vasohibin 遺伝子が導入された細胞では血管新生能が抑制されると思われる。

4. 研究成果

子宮内膜癌において間質の血管密度は有意差をもって正常内膜間質よりも類内膜腺癌の間質で高く、かつ低分化なほど血管密度は高くなっていった。(下図; P 増殖期、S 分泌期、G1 高分化型類内膜腺癌、G2 中分化型類内膜腺癌、G3 低分化型類内膜腺癌)

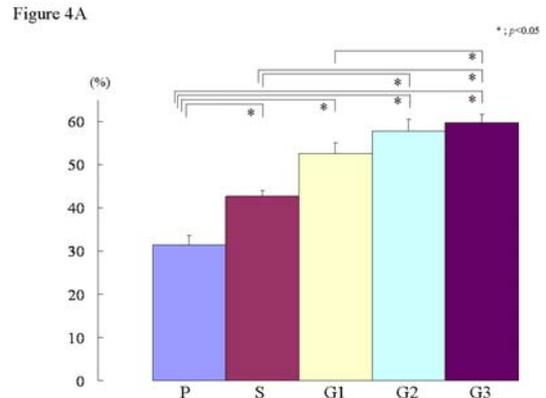


リンパ管密度では有意差をもって正常内膜間質よりも類内膜腺癌の間質で高く、かつ高分化型よりも低分化型で高くなっていった。(下図; P 増殖期、S 分泌期、G1 高分化型類内膜腺癌、G2 中分化型類内膜腺癌、G3 低分化型類内膜腺癌)

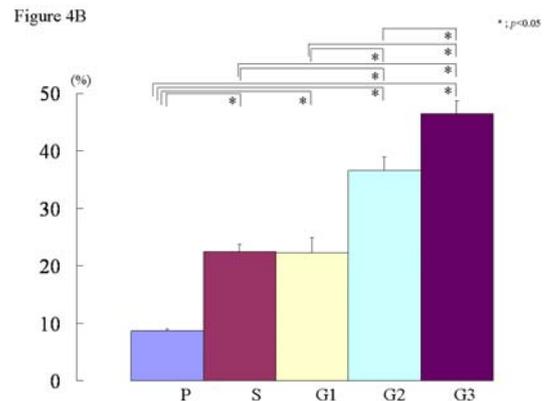


Vasohibin の間質での発現頻度は増殖期よりも有意差をもって分泌期、類内膜腺癌で高くかつ高分化型よりも低分化型で発現頻度

が高くなっていった。(下図; P 増殖期、S 分泌期、G1 高分化型類内膜腺癌、G2 中分化型類内膜腺癌、G3 低分化型類内膜腺癌)

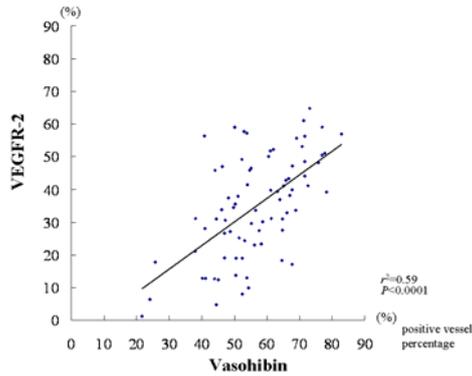


VEGF レセプターII の発現頻度は増殖期よりも有意差をもって分泌期、類内膜腺癌で高くかつ低分化なほど発現頻度が高くなっていった。(下図; P 増殖期、S 分泌期、G1 高分化型類内膜腺癌、G2 中分化型類内膜腺癌、G3 低分化型類内膜腺癌)



また子宮内膜癌における Vasohibin と VEGF レセプターII の発現頻度は有意に正の相関を示した。

Figure 6



以上の結果を踏まえ、子宮内膜癌において癌間質の腫瘍循環においてVasohibinとVEGFレセプターIIとの発現に関連を認め、今後Vasohibinが子宮内膜癌の血管新生を有意に抑制し、将来的な血管新生阻害剤となる可能性を示唆した。

尚、この成果は論文にて発表した。今後、血中のVasohibin濃度に関する検討に関しては、すでにELISAの測定は終了しており、臨床背景を含めた解析を行っているところである。また、in vivoでの子宮内膜癌細胞株を用いたVasohibinの添加実験を積極的に展開していく予定である。

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1件)

①Kousuke Yoshinaga, et al. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Sci.* 99, 2008, 914-919. 査読有

[学会発表] (計1件)

①Kousuke Yoshinaga. Vasohibin, a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor: its expression on endometrial carcinoma in relation to tumor vascularity. 98th Association of American Cancer Research. 4/5/2008 Washington D, C

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 浩介 (YOSHINAGA KOUSUKE)
東北大学・病院・助教
研究者番号：40343058

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし