

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300323

研究課題名（和文）

バゾヒビンファミリーと腫瘍血管・がん幹細胞連関

研究課題名（英文）

Correlation between vasohibin family and tumor angiogenesis/cancer stem cell

研究代表者

佐藤 靖史 (Yasufumi Sato)

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）：

バゾヒビンファミリーメンバーにはバゾヒビン1 (vasohibin-1: VASH1)とバゾヒビン2 (vasohibin-2: VASH2)がある。VASH1は、血管内皮細胞が血管新生刺激に反応して誘導性に発現する血管新生抑制因子である。これまでの研究で、内因性VASH1は血管新生抑制作用を介して原発性腫瘍の発育を制御することを明らかにしてきたが、今回の研究において、血管内皮細胞が発現する内因性VASH1は、がんの血行性転移やリンパ行性転移を制御していることを明らかにした。一方、VASH2はVASH1とは拮抗的に血管新生を促進する因子であるが、今回の研究において、がん組織ではがん細胞がVASH2を主に発現し、血管新生促進作用を介して腫瘍の発育を促進することを明らかにした。以上より、がん組織におけるVASH1とVASH2のバランスは、がんの進展を規定する1つの要因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Vasohibin family is composed with 2 proteins, vasohibin-1 (VASH1) and vasohibin-2 (VASH2). VASH1 is an angiogenesis inhibitor induced in endothelial cells (ECs) by pro-angiogenic stimuli. Our recent analysis revealed that VASH1 is expressed in ECs of tumor vessels, and this endogenous VASH1 inhibits tumor growth by its anti-angiogenic activity. In the present study, we showed that endogenous VASH1 is also responsible for the inhibition of cancer metastasis. In contrast to VASH1, our present study revealed that VASH2 is expressed in cancer cells. This cancer cell-produced VASH2 augments cancer growth by stimulating angiogenesis. From these results, we proposed that the balance between VASH1 and VASH2 is critical for cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：VASH1、VASH2、血管内皮細胞、がん細胞、血管新生、がん転移

1. 研究開始当初の背景

がんの増殖にはこれを取りまく微小環境 (tumor microenvironment) が極めて重要であることが指摘されて来た。がんの間質は線維芽細胞をはじめ、炎症細胞、免疫担当細胞、脈管 (血管、リンパ管) や結合組織が存在して特徴的な微小環境を構築している。これらの中でも腫瘍血管は、がんの発育を促進するばかりか、血管透過性の亢進した未熟な構造の故に、癌細胞の血管内への侵入が容易であることから、遠隔転移のルートとなっている。このため腫瘍血管の新生と腫瘍血管の構築異常の機序を理解することは、がん制圧の観点からも極めて重要である。

血管新生を促進する代表的な因子として血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, vascular endothelial growth factor) が 1989 年にクローニングされ、これを分子標的とした治療薬が開発され、がん治療において一定の効果を得られるものの、その効果は一過性でがんは時間が経つとともに耐性を獲得することから、新たな抗血管新生療法の開拓が望まれている。

研究代表者は、血管新生の調節に関わる新規分子の探索を行い、血管内皮細胞が VEGF などの血管新生刺激に反応して誘導性に発現する血管新生抑制因子バゾヒビン 1 (vasohibin-1: VASH1) と、VASH1 のホモログで、アミノ酸配列上約 50% 相同であるが、機能的には VASH1 とは拮抗的に血管新生を促進するバゾヒビン 2 (vasohibin-2: VASH2) を単離・同定し、さまざまな病態における機能の解析を進めているが、特にがんにおける研究が、これら分子を応用した新しい診断法や治療法に資することが期待されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、血管新生の調節に関わる分子の探索を行い、新規のファミリー分子として Vasohibin-1 (VASH1) および Vasohibin-2 (VASH2) を単離・同定している。本研究の目的は、オリジナルな分子である VASH1 と VASH2 の腫瘍血管新生、血管構築異常、がん幹細胞、がん転移における機能を包括的に研究することで、Vasohibin ファミリーのがんにおける意義を明らかにし、がんに対する本邦発の新しい診断法や治療法開発に資することである。

3. 研究の方法

(1) VASH1 に関する研究

① VASH1 (-/-) マウスにルイス肺癌 (LLC) 細胞を移植し、がん細胞の肺転移を野生型マウスに移植した場合と比較する。その際、足底部に移植して腫瘍を形成した後、腫瘍を切除し、

一定期間後に転移を観察する自然転移モデルと、尾静脈に癌細胞を注入して肺転移を観察する実験転移モデルを実施する。

② VASH1 をノックダウンした場合の血管内皮細胞の形態を観察する。

(2) VASH2 に関する研究

① VASH2 を発現することが判明しているヒト卵巣癌細胞について shRNA で VASH2 をノックダウンしたのち免疫不全マウスに移植して、ノックダウンしていない卵巣癌細胞と腫瘍の発育や腹膜播種の程度を比較する。

② VASH2 の卵巣癌細胞における発現上昇の機序を、低酸素や microRNA との関連で検索する。

4. 研究成果

(1) VASH1 に関する研究成果

LCC 細胞を足底部に移植して腫瘍を形成した後の転移を観察する VASH1 (-/-) マウスでは、VASH1 (-/-) マウスにおいて肺転移と鼠リンパ節転移が優位に多く認められた (図 1、2)。

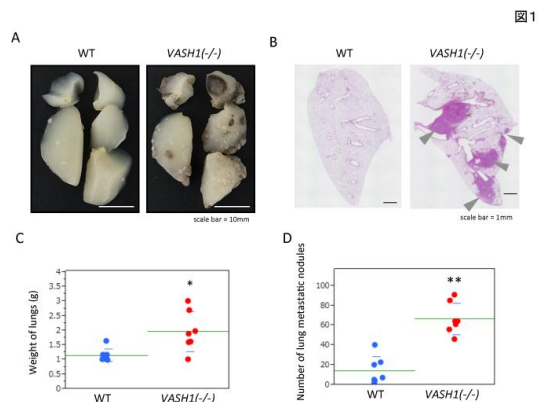


図1

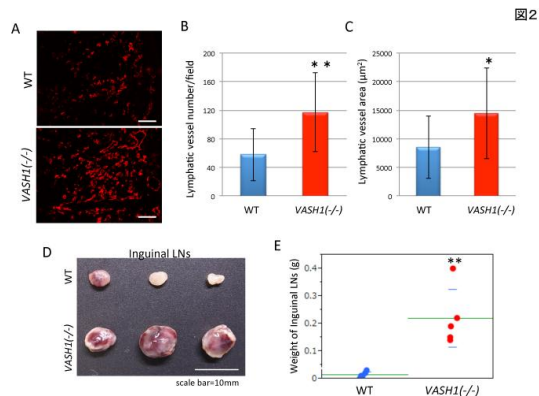


図2

一方、尾静脈に癌細胞を注入する実験転移モデルでは、肺転移の程度は VASH1 (-/-) マウスと野生型マウスに差は認めなかった。

以上このことから、自然転移モデルにおける VASH1 (-/-) マウスの転移の増加は原発巣における癌細胞の血管侵入に差が大きな要

因と考えられた。

VASH1 をノックダウンすると血管内皮細胞間を通り抜ける癌細胞の transmigration は顕著に増加し、その要因として VASH1 をノックダウンすると tight junction の形成が障害されること (ZO-1 の消失) が明らかとなった。

(2) VASH2 に関する研究成果

①VASH2 をノックダウンしても卵巣癌細胞の in vitro での増殖には大きな変化は認められなかったが、マウスに移植すると増殖は顕著に抑制されていた (図3)。

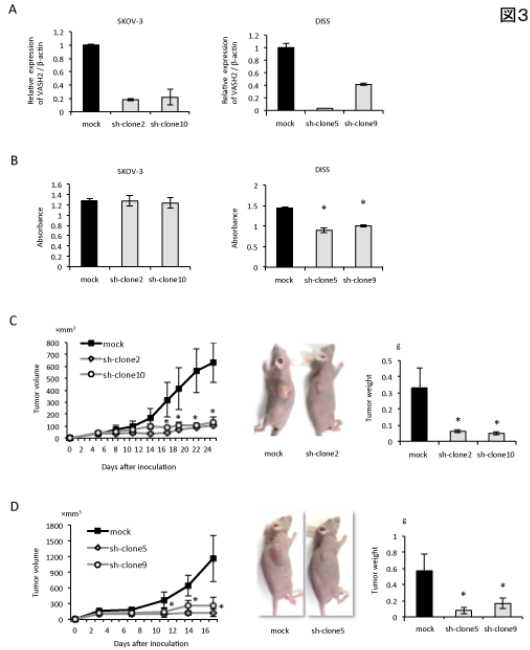


図3

また、その腫瘍の血管新生は有意に抑制されていた (図4)。

②VASH2 の癌細胞における発現のメカニズム

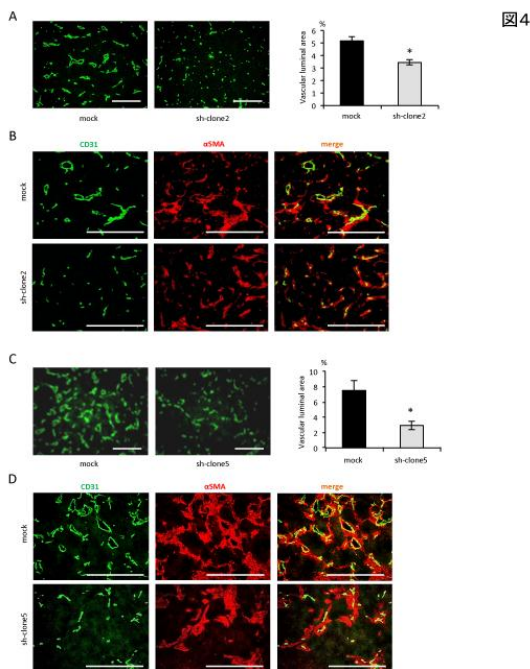


図4

について解析した結果、VEGF の発現を誘導する低酸素は VASH2 の発現には促進効果は認めなかった。

そこで microRNA について解析した結果、VASH2 の発現は mir-200b によって負によって制御されているが、癌細胞ではこの mir-200b の発現が減少するために VASH2 の発現が構成的に上昇していることが明らかとなった (図5)。

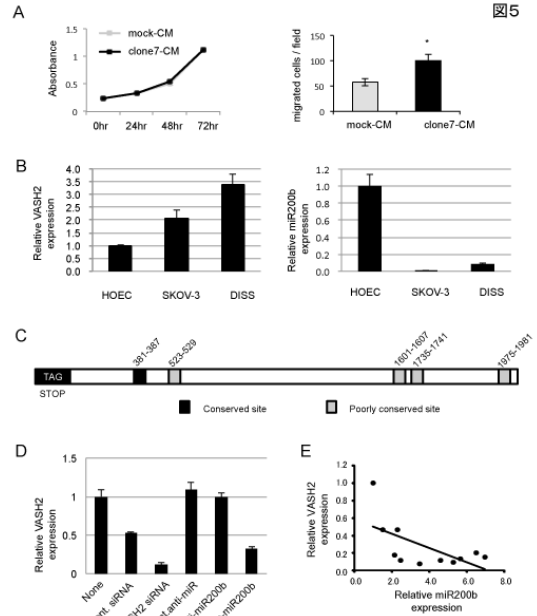


図5

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1.Xue X, Gao W, Sun B, Xu Y, Han B, Wang F, Zhang Y, Sun J, Wei J, Lu Z, Zhu Y, Sato Y, Sekido Y, Miao Y, Kondo Y. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 32, 1724-1734, 2013. doi: 10.1038/onc.2012.177. (査読あり)

2.Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, Suzuki Y, Suzuki M, Sato Y. Downregulation of vasohibin-2, a novel angiogenesis regulator, suppresses tumor growth by inhibiting angiogenesis in endometrial cancer cells. *Oncol Lett*. 5, 1058-1062, 2013. (査読あり)

3.Sato T. The Vasohibin Family: A Novel family for Angiogenesis Regulation. *J Biochem*. 153: 5-11, 2013. doi: 10.1093/jb/mvs128. (査読あり)

4.Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract

urothelial carcinoma. Clin Cancer Res. 18, 4145-4153, 2012. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0073. (査読あり)

5. Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Kanomata N, Moriya T, Suzuki M, Sato Y. Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis. Mol. Cancer Res. 10, 1135-1146, 2012. (査読あり)

6. Sato Y. The Vasohibin Family: Novel Regulators of Angiogenesis. Vascul Pharmacol 56, 262-266, 2012. doi: 10.1016/j.vph.2012.01.002. (査読あり)

7. Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. Cancer Sci. 102, 446-51. 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01812.x. (査読あり)

8. Sato Y. Persistent vascular normalization as an alternative goal of anti-angiogenic cancer therapy. Cancer Sci. 102, 1253-1256, 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01929.x. (査読あり)

9. Sato, Y. The vasohibin family. Pharmaceuticals 3, 433-440, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. 小柳貴裕、鈴木康弘、小林美穂、宮下浩輝、嵯峨泰、鈴木光明、佐藤靖史 : Development of a novel molecular-targeted therapy against vasohibin-2; Antitumor effect of siRNA and search for the active center of vasohibin-2. 第 20 回日本血管生物医学会学術集会, 徳島, 2012, 12. 7.

2. 鈴木康弘、小柳貴裕、小林美穂、宮下浩輝、嵯峨泰、鈴木光明、佐藤靖史 : Regulation of VASH2 expression by miR-200 family and its role in cancer cells. 第 20 回日本血管生物医学会学術集会, 徳島, 2012, 12. 6.

3. 佐藤靖史 : 血管新生制御の分子基盤. 第 44 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 高知, 2012, 9. 28.

4. 佐藤靖史 : The role of vasohibin family in cancers. 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌, 2012, 9. 21.

5. 伊藤想一、宮下浩輝、鈴木康弘、小林美穂、大内憲明、佐藤靖史 : 内因性 Vasohibin-1 は癌細胞の血管内侵入に対する血管内皮の抵抗性を

を維持し、転移を抑制する. 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌, 2012, 9. 20.

6. Sato Y : The role of vasohibin family in tumor angiogenesis. AVBS 20th Annual Scientific Meeting 2012. Gold Coast, Australia, 2012, 9. 16.

7. 佐藤靖史 : Vasohibin ファミリー分子と腫瘍血管新生. 第 11 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会. 栃木, 2012, 6. 23.

8. Sato Y : The role of vasohibin family in tumor angiogenesis. 17th International Vascular Biology Meeting 2012. Wiesbaden, Germany, 2012, 6. 4.

9. Koyanagi T, Takahashi Y, Suzuki Y, Saga Y, Kanomata N, Moriya T, Tabata Y, Suzuki M and Sato Y : Vasohibin-2 expressed in human ovarian serous adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis. 17th International Vascular Biology Meeting 2012. Wiesbaden, Germany, 2012, 6. 4

10. 伊藤想一、小林美穂、鈴木康弘、宮下浩輝、佐藤靖史 : Vasohibin-1 normalizes tumor vessels and inhibits cancer metastasis. 第 19 回日本血管生物医学会学術集会. 東京, 2011, 12. 9.

11. 佐藤靖史 : がんを脈管から治療する. 第 70 回日本癌学会学術集会. 名古屋, 2011, 10. 4.

12. Sato Y : The role of vasohibin family in the regulation of tumor angiogenesis. 6th European Meeting for Vascular Biology and Medicine. Krakow, Poland, 2011, 9. 23.

[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.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/vascular_biology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 靖史 (Yasufumi Sato)

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

宮下 浩輝 (Hiroki Miyashita)

東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：80302222
鈴木 康弘(Yasuhiro Suzuki)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：60332277