

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860205

研究課題名(和文) Vasohibin-2アンチセンスオリゴヌクレオチドによる肝臓がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of liver cancer treatment using Vasohibin-2 targeting antisense oligonucleotide

研究代表者

堀江 佐知子(Horie, Sachiko)

東北大学・加齢医学研究所・産学官連携研究員

研究者番号：90451640

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)：血管新生制御因子であるVasohibin-2(VASH2)はがん細胞が発現し、腫瘍生育を促進する。本研究では、ヒトVASH2標的BNA修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを原発性ヒト肝がんマウスモデルおよびヒト大腸がん肝転移マウスモデルに腹腔投与すると、肝臓組織の腫瘍内VASH2遺伝子発現が減少し、腫瘍生育が抑制されることを示した。この腫瘍生育抑制効果は上皮間葉転換(EMT)の抑制と腫瘍組織への免疫細胞の浸潤が関与することが確認された。本研究から、VASH2標的BNA修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが原発臓器の違いとは関係なく肝臓がんに対して有効な治療法であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Vasohibin-2 (VASH2), a pro-angiogenic factor, is expressed in cancer cells and promotes tumor growth. This study has shown that the systemic administration of bridged nucleic acids (BNA)-based antisense oligonucleotide targeting VASH2 accumulated in the liver and exhibited anti-tumor effects on the orthotopic inoculation of a human hepatocellular carcinoma cell line and a metastatic liver cancer model with a splenic inoculation of a human colon carcinoma cell line. Our findings will provide new information and strategy that can be exploited for the development of primary and metastatic liver cancer treatment targeting VASH2.

研究分野：DDS

キーワード：Vasohibin BNA修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド 抗腫瘍効果 肝臓がん

1. 研究開始当初の背景

肝臓がんには原発性肝臓がんと転移性肝臓がんが大別される。肝細胞由来の原発性肝臓がんと他臓器細胞由来の転移性肝臓がんでは腫瘍としての性質が異なり原発臓器の性質を有する。従来のがん剤を用いた肝臓がんの治療では、特定のがん細胞を標的とするため、がん細胞の性質によって治療効果が得られないなどの問題が指摘されてきた。本申請では幅広い抗がんスペクトラムを有する治療法の開発を目指し、栄養血管に着目した。

腫瘍血管新生抑制は、近年、新しいがん治療のターゲットとして注目されている。現在、血管新生促成因子である VEGF を標的とした抗がん剤が上市されている。VEGF を標的とした抗がん剤は、腫瘍血管新生だけではなく正常血管の透過性を亢進するため、副作用が問題となっている。また、VEGF 活性が抑制されると VEGF 以外の血管新生制御因子を刺激して薬剤耐性を誘導する。

新規血管新生促進因子 Vasohibin-2 (VASH2) はがん細胞に発現し、VEGF 非依存的に血管新生を制御する。また、血管内皮細胞にも発現していることが示唆されており、従来の VEGF を標的とした抗血管新生療法とは異なり、VASH2 遺伝子発現の抑制は薬剤耐性を克服し、副作用が少ない新しい抗血管新生療法に応用できるものとして期待されている。これまでの研究で、特に肝臓がんにおいてがん細胞が VASH2 を発現し、腫瘍血管新生を介してがんの進行を促進していることを明らかにしている。

遺伝子発現制御を目的とした核酸薬の開発が進められているが、siRNA は体内での不安定性が問題となっている。新規機能性核酸薬として 2'4'BNA 修飾アンチセンスヌクレオチドは、従来のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、ヌクレアーゼ耐性を有しているため体内での安定性が高い。また、標的 RNA との結合親和性が高く、特異的かつ強力な効果を発揮する。さらに腹腔内に投与すると腹膜から効率的に吸収されて肝臓に集積する。本申請では、肝臓がんを治療対象に VASH2 を分子標的とした修飾アンチセンスオリゴ腹腔内投与の有用性を示すことで、新たな治療法を確立することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、原発臓器に関係のない幅広い抗がんスペクトラムを有する治療法を開発することを目的とする。そのために、血管新生制御因子である VASH2 のアンチセンスオリゴヌクレオチドをマウス肝臓がんモデルに遺伝子導入し、VASH2 遺伝子発現の抑制による抗腫瘍効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝臓がんマウスモデルの作製

原発性肝臓がんマウスモデルの作製

ルシフェラーゼ発現ヒト肝臓がん細胞

(HepG2-luc) を同所移植し、原発性肝臓がんマウスモデルを作製した。

転移性肝臓がんマウスモデルの作製

ルシフェラーゼ発現ヒト大腸がん細胞 (HT29-luc) を脾臓に接種し、経門脈的にがん細胞を移植することで、大腸がん肝転移マウスモデルを作製した。

(2) BNA 修飾 VASH2 アンチセンスオリゴヌクレオチドの導入による抗腫瘍効果と抗がんスペクトラムの評価

VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの導入

ヒト VASH2 遺伝子を標的とした BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用した。腫瘍接種後 3 日もしくは腫瘍が発現するルシフェラーゼ活性が 5×10^8 photons/sec に達してから 3 日ごとに計 6 回ないし 7 回、腹腔内投与で 10 mg/kg の濃度で肝臓がんマウスモデルに投与した。コントロールとしてスクランブル BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを治療群と同日に同濃度で投与した。

腫瘍生着・生育・他肝臓への転移抑制効果の評価

生体内および生体外発光画像法を用いてルシフェラーゼ活性を定量化した。

抗血管新生効果の評価

肝臓組織切片の血管内皮細胞を免疫染色し、定量化した。

腫瘍内 VASH2 発現の定量化

肝臓組織の VASH2 発現を定量 PCR 法で定量化した。

変動遺伝子群の評価

VASH2 発現変動による遺伝子発現群を定量 PCR 法で探知した。上皮間葉転換 (EMT) マーカーを標的とした。

がん組織への免疫細胞の浸潤

免疫細胞 (マクロファージおよび好中球) の浸潤を組織免疫学および定量 PCR で評価した。

生体への毒性評価

体重変動の評価および、血清の生化学検査を行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍生着抑制効果の評価

VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの肝臓内の腫瘍細胞の生着を評価するために、腫瘍接種後から 3 日目におアンチセンスの投与を行った。原発性肝臓がんマウスモデル (Fig.1A) と転移性肝臓がんマウスモデル (Fig.1B) を用いて評価した。どちらのマウスモデルにおいても腫瘍生着が抑制されることが示された。

(2) 腫瘍生育と他肝臓への転移抑制効果の評価

腫瘍が一定の大きさに達してから治療を開始した場合、がん細胞が発現するルシフェラーゼ活性が有意に減少したことから腫瘍の生育を抑制することが示された。また、

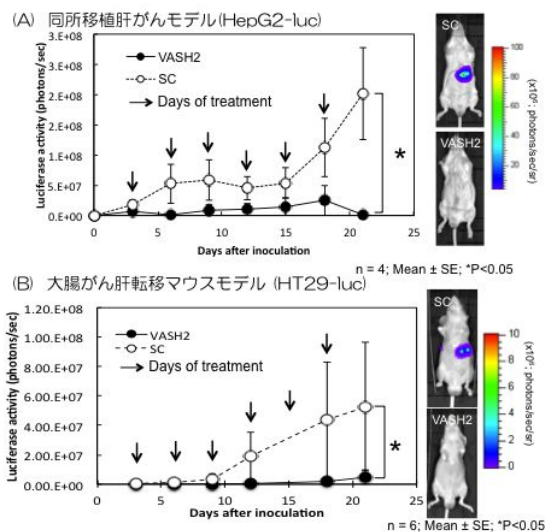


Fig. 1 腫瘍生着抑制効果の評価

VASH2 標的アンチセンスオリゴヌクレオチド投与群では腫瘍塊の数が有意に減少した。

(3) 抗新生血管効果の評価

血管内皮細胞である CD31 を標的として免疫染色を行った。腫瘍内の血管密度および血管の数はコントロール群であるスクランブルアンチセンスオリゴヌクレオチド投与群と比較して VASH2 標的アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した治療群と有意な差は認められなかった。

(4) mRNA レベルでの VASH2 および上皮間葉転換(EMT) マーカー遺伝子発現の定量化

VASH2 標的 BAN 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与後 2 日目にヒト VASH2 遺伝子発現が一過的に減少し、その発現は 3 日目以降にはバックグラウンドレベルに戻ることが示された。同時に、EMT マーカーであるトランスフォーミング増殖因子(TGF- β) 発現減少が投与後 2 日目に VASH2 の発現減少とともに確認された。また、VASH2 遺伝子発現減少が確認されないアンチセンス投与後 4 日目においても、TGF- β ($R^2 = 0.50$) だけではなく、E-カドヘリン ($R^2 = 0.96$)、フィブロネクチン ($R^2 = 0.62$)、スネイル(スネイル 1: $R^2=0.75$, スネイル 2: $R^2 = 0.49$) などの EMT マーカー遺伝子発現は VASH2 の発現と高い正の相関を示した。

(5) 免疫細胞の腫瘍組織への浸潤

EMT はがん免疫を回避する作用があることから、免疫細胞(マクロファージと好中球)を組織免疫学的に評価した。VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドで治療すると、腫瘍組織内の F4/80 発現マクロファージと Ly6G 発現好中球の割合が有意に増加した。腫瘍組織を定量 PCR で腫瘍増殖抑制に関わる M1 マクロファージマーカーの発現が有意に増加した。

(6) 細胞毒性の評価

VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドによって腫瘍生育による体重減少が抑制された。また血清を用いた生化学検査から、VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオ

リゴヌクレオチドおよびそのスクランブルによる LDH, AST, ALT 等肝機能障害を示す因子の有意な増減は認められなかった。

本研究で、VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドによって肝臓内のがん細胞の VASH2 遺伝子発現が制御され、その結果 EMT の抑制と腫瘍組織への免疫細胞の浸潤によって肝臓での腫瘍細胞の生着と生育が抑制されたことが示された。これらの結果から、VASH2 標的 BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが原発臓器の違いとは関係なく肝臓がんに対して有効な治療法であることが示された。本研究結果から、新しい創薬ターゲットを社会に提供することが可能となる。本研究はがん克服にとって重要な意義を持つ。

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)

Sachiko Horie, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kondoh, Tetsuya Kodama, Yasufumi Sato, Distinctive role of vasohibin-1A and its splicing variant vasohibin-1B in tumor angiogenesis, Cancer Gene Therapy, 査読有, in press DOI: 10.1038/ctg.2016.13

Yoshinobu Miura, Mamoru Mikada, Tomoki Ouchi, Sachiko Horie, Kazu Takeda, Teppei Yamaki, Maya Sakamoto, Shiro Mori, Tetsuya Kodama, Early diagnosis of lymph node metastasis: Importance of intranodal pressure, Cancer Science, 査読有, 107 巻, 2016, 224-232

DOI: 10.1111/cas.12873.

Kaori Suenaga, Shuji Kitahara, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Sachiko Horie, Junichi Sugawara, Nobuo Yaegashi, Yasufumi Sato, Role of the vasohibin family in the regulation of fetoplacental vascularization and synchytiotrophoblast formation, PLoS One, 査読有, 9 巻, 2014, e104728 DOI:10.1371/journal.pone.0104728

〔学会発表〕(計 13 件)

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 小比賀聡, 佐藤靖史, 肝臓癌に対する Vasohibin-2 標的 BNA(LNA)修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの抗腫瘍効果の評価, 2016 年 3 月 4 日-5 日, 第 2 回血管生物若手研究会, 東北大学加齢医学研究所スマートエージング国際共同研究センター, 仙台

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 小比賀聡, 佐藤靖史, Vasohibin-2 標的性BNA アンチセンスの肝がんに対する抗腫瘍効果の評価, 2016年1月23日-24日, 第11回バソヒピン研究会, 蔵王ラフォーレ, 蔵王
伊藤拓哉, 堀江佐知子, 鈴木康弘, 佐藤尚明, 佐藤靖史, 木村芳孝, マウス心臓発生における vasohibin family の時間的発現制御, 2016年1月23日-24日, 第11回バソヒピン研究会, 蔵王ラフォーレ, 蔵王

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 小比賀聡, 佐藤靖史, Vasohibin-2 標的性BNA 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドによる肝がん治療の開発, 第23回血管生物医学会, 2015年12月10日-12日, 神戸国際会議場, 神戸

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 佐藤靖史, A novel molecular target therapy against hepatocellular carcinoma with the bridged nucleic acids-based antisense oligonucleotide targeting human vasohibin-2, 2015年10月8日-10日, 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 名古屋

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小比賀聡, 佐藤靖史, Application of vasohibin-1 and its splicing variant to anti-angiogenic cancer therapy, 2015年7月23日-24日, 第10回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 北海道大学医学部 学友会館「フラテ」, 札幌

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 佐藤靖史, ソノポレーションを利用した Vasohibin-1 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価, 2015年3月8日, 日本超音波東北地方会第49回学術集会, 仙台情報・産業プラザ, 仙台

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 佐藤靖史, 組織標的性 Vasohibin 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価, 2015年2月6日-7日, 第1回血管生物若手研究会, 東京大学医学部教育研究棟第1・2セミナー室, 東京

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 佐藤靖史, Anti-angiogenic roles of Vasohibin-1A and Vasohibin-1B, 2015年1月30日, 第143回東北大学加齢医学研究所集談会, 東北大学加齢医学研究所スマートエイジング国際共同研究センター, 仙台

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 佐藤靖史, Anti-angiogenic roles of Vasohibin-1A and Vasohibin-1B, 2015年1月10日-11日, 第10回 Vasohibin 研究会, 蔵王ラフォーレ, 蔵王

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 佐藤靖史, 音響性リボソームと超音波を用いた Vasohibin-1 遺伝子導入による抗血管新生効果の評価, 2014年11月15日, 第13回日本超音波治療研究会(JSTU 2014), 仙台情報・産業プラザ, 仙台

堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 佐藤靖史, 抗血管新生効果における Vasohibin-1A と Vasohibin-1B の役割, 2014年9月25日-27日, 第73回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 横浜

Sachiko Horie, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Yasufumi Sato, Distinctive roles of Vasohibin-1A and Vasohibin-1B in angiogenesis regulation, 2014年4月14日-17日, The 18th International Vascular Biology Meeting, みやこめっせ, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 佐知子 (HORIE, SACHIKO)
東北大学・加齢医学研究所・産学官連携研究員
研究者番号: 90451640

(3) 研究協力者

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

小比賀 聡 (OBIKA, SATORU)
大阪大学・薬学研究所・教授
研究者番号: 80243252