

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861300

研究課題名(和文) 尿路上皮癌での新規血管新生調節因子バソヒビンとエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the expression of vasohibin regulated by the epigenetic mechanism in urothelial carcinoma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌におけるVasohibin-1(VASH1)とVasohibin-2(VASH2)について研究した。VASH1は癌組織の間質の血管内皮細胞に特異的に発現していた。遺伝子の転写抑制するEZH2が、Histon H3コア蛋白の27番目のlysine (H3K27) をメチル化(H3K27me3)してVASH1遺伝子の発現を制御する可能性があるため、ヒト尿路上皮癌の検体においてEZH2とH3K27me3の免疫染色を行い、検討した。EZH2とH3K27me3の発現は、癌の核異型度と病期に関連し、H3K27me3とVASH1の発現には関連を認め、エピジェネティクスな制御を受ける可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of vasohibin-1(VASH1) and vasohibin-2(VASH2) in urothelial carcinoma. VASH1 was especially expressed in the endothelial cells of the tumor stroma. Enhancer of zeste (EZH) 2, a methyltransferase and component of the polycomb repressive complex 2 (PRC2), plays an essential role in the epigenetic maintenance of the Histone H3 trimethyl Lys27 (H3K27me3) repressive chromatin mark. Because EZH2 associated the expression of vasohibin in the previous reports, we evaluated the immunohistochemical staining of EZH2, H3K27me3, and VASH1 in patients with urothelial carcinoma. EZH2 and H3K27me3 associated the grade of tumor, pathological T stage, and vasohibin-1 expression. These results suggested that the VASH1 associated with H3K27me3 and could be regulated by the epigenetic mechanism.

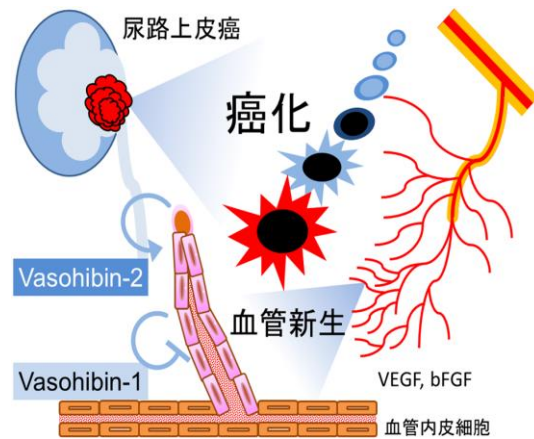
研究分野：血管新生

キーワード：尿路上皮癌 血管新生 エピジェネティクス 血管内皮細胞 血管新生阻害剤 上皮間葉転換 メチル化 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は、転移・浸潤に対してシスプラチンを中心とした抗癌化学治療が広く行われているが、奏効率は40~50%程度に留まり、転移すると5年生存率は10~40%以下で予後不良の癌である。また、近年登場した血管新生阻害剤は、腎細胞癌において他癌に先駆けて泌尿器科で臨床応用されたが、薬剤耐性が問題となっている。尿路上皮癌に対する治療効果は、従来の抗癌剤を凌ぐ効果が得られないか、あるいは効果が得られても強い副作用のために臨床応用まで至っていない。このような耐性獲得機序や副作用の克服において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考えている。その中で我々は、VEGFの刺激によって血管内皮細胞で発現する遺伝子の中から血管新生調節因子として同定されたVasohibinに着目し、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。VasohibinはVasohibin-1(VASH1)とVasohibin-2(VASH2)の存在が同定されており、VASH1は血管管腔を成熟させ、VASH2は血管新生を進行させることが判明している。(図1)(Kimura H et al. Blood, 2009)。

当初研究は、尿路上皮癌におけるVASH1の発現に関する病態解明と予後を予測する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検討を開始した。当院で診断、手術治療された限局性上部尿路上皮癌(pTa-T3N0M0)171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、臨床的パラメータとの関連を検討した。VASH1の発現は、High Stage, High Gradeの症例において有意に高い傾向( $p < 0.05$ )を認め、単変量解析で、有意に術後再発( $p = 0.017$ )や病死( $P = 0.042$ )に関連することが明らかになった。多変量解析では、VASH1の高発現は、術後再発( $P = 0.024$ )や病死( $P = 0.031$ )に関連する独立した予後予測因子であることが明らかになった。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、論文発表した(Miyazaki Y, Kosaka T, et al. Clin Cancer Res. 2012.)。さら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、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、本研究は尿路上皮癌(腎盂尿管癌、膀胱癌)におけるVASH1、VASH2免疫染色の検討、細胞株を用いた検討を行った。

## 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エピジェネティクス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

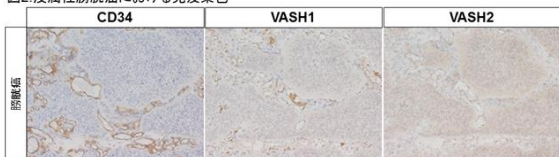
血管内皮細胞と尿路上皮癌の培養細胞株における細胞レベルでのバソヒビン発現解析を行い、発現調節因子を特定する。また、バソヒビン遺伝子へのヒストン修飾による遺伝子発現の変化を解明し、ヒト尿路上皮癌検体を用いて生命予後との関連を解析して、バソヒビンのエピジェネティクス制御機構の解明とその意義を明らかにすることを目的とする。

## 4. 研究成果

①膀胱癌において初回の経尿道的腫瘍切除術で膀胱筋層へ癌浸潤を認めた場合、術前補助化学療法を施行して膀胱全摘術を行う治療方法がある。この手術検体を解析することで同一のヒト手術検体におけるVASH1、VASH2発現に対する化学療法の影響を比較検討できると考えられ、膀胱癌における免疫染色を行った。VASH1は、血管内皮細胞に特異的に

染色がみられ、VASH2 は、血管内皮細胞と腫瘍細胞に染色がみられた (図2)。

図2. 浸潤性膀胱癌における免疫染色



VASH1は血管内皮細胞、VASH2は血管内皮細胞と腫瘍細胞が染色された。

②各種膀胱癌細胞株、各種前立腺癌細胞株、血管内皮細胞株 (HUVEC) における VASH1, VASH2 の発現をウェスタンブロット、細胞蛍光免疫染色にて検討した。

VASH1 は血管内皮細胞に発現していたが、癌細胞では殆ど発現していなかった。VASH2 は血管内皮細胞と各種癌細胞株で発現を認めた。

③VASH1 の発現調節因子として、遺伝子の転写を抑制する EZH2 が、Histon H3 コア蛋白の 27 番目の lysine (H3K27) をメチル化 (H3K27me3) して VASH1 遺伝子の発現を不活化し、血管新生および癌の進行に関係していたとの報告がされていたため (Lu C, et al. Cancer Cell. 2010)、ヒト上部尿路上皮癌の検体において EZH2 と H3K27me3 の免疫染色を行い、VASH1 の発現との関連を検討した (図3、図4)。

図3. 免疫染色 (腫瘍部 表在性癌)

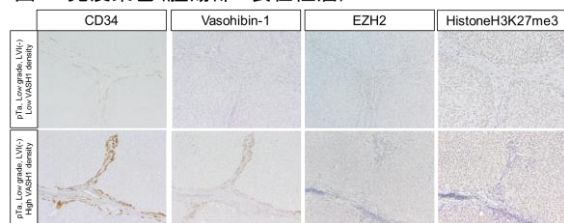
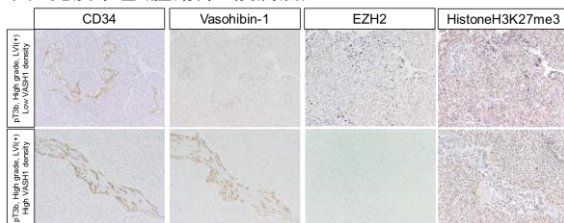


図4. 免疫染色 (腫瘍部 浸潤癌)



EZH2 と H3K27me3 の発現は、癌の核異型度と病期、Lymphovascular invasion に関連し、その発現は互いに相関していた。H3K27me3 と VASH1 の発現には関連を認めており、エピジェネティックな制御を受ける可能性が示唆された。今後、引き続き、尿路上皮癌の難治性打開に向けて、血管新生調節因子バソヒビンとエピジェネティック制御機構の関連について検討を進めて行きたい。

本研究は、尿路上皮癌における Vasohibin 発現の病態解明につながるものと期待され、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、予後因子について検討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 VASH1 の予後因子としての研究成

果は、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 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 10 件)

(1) 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. 51:1-8. doi: 10.1016/j.humpath.2015.12.008. 2016 May. 査読有.

(2) 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. doi: 10.1016/j.clgc.2016.03.014. 2016 Mar. 査読有.

(3) 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. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.02.023. 2016 Mar. 査読有.

(4) 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. Jpn J Clin Oncol. 2016 Mar. 査読有.

(5) 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*. 23(2):663-70. doi: 10.1245/s10434-015-4848-x. 2016 Feb. 査読有.

(6)Maeda T, Kikuchi E, Hasegawa M, Ishioka K, Hagiwara M, Miyazaki Y, Shinojima T, Miyajima A, Oya M. Solifenacin or mirabegron could improve persistent overactive bladder symptoms after dutasteride treatment in patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 85(5):1151-5. doi: 10.1016/j.urology.2015.01.028. 2015 May. 査読有.

(7)Shirotake S, Kikuchi E, Tanaka N, Matsumoto K, Miyazaki Y, Kobayashi H, Ide H, Obata J, Hoshino K, Kaneko G, Hagiwara M, Kosaka T, Kanao K, Kodaira K, Hara S, Oyama M, Momma T, Miyajima A, Nakagawa K, Hasegawa S, Nakajima Y, Oya M. Impact of an adjuvant chemotherapeutic regimen on the clinical outcome in high risk patients with upper tract urothelial carcinoma: a Japanese multi-institution experience. *J Urol*. 193(4):1122-8. doi: 10.1016/j.juro.2014.10.022. 2015 Apr. 査読有.

(8)Tanaka N, Kikuchi E, Kanao K, Matsumoto K, Shirotake S, Miyazaki Y, Kobayashi H, Kaneko G, Hagiwara M, Ide H, Obata J, Hoshino K, Hayakawa N, Kosaka T, Hara S, Oyama M, Momma T, Nakajima Y, Jinzaki M, Oya M. A multi-institutional validation of the prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio for upper tract urothelial carcinoma treated with radical nephroureterectomy. *Ann Surg Oncol*. 21(12):4041-8. doi: 10.1245/s10434-014-3830-3. 2014 Nov. 査読有.

(9)Tanaka N, Kikuchi E, Kanao K, Matsumoto K, Shirotake S, Kobayashi H, Miyazaki Y, Ide H, Obata J, Hoshino K, Hayakawa N, Hagiwara M, Kosaka T, Oyama M, Miyajima A, Momma T, Nakagawa K, Jinzaki M, Hasegawa S, Nakajima Y, Oya M. Independent predictors for bladder outcomes after treatment of intravesical recurrence following radical nephroureterectomy in patients with primary upper tract urothelial carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 21(9):3151-8. doi: 10.1245/s10434-014-3657-y. 2014 Sep. 査読有.

(10)Kosaka T, Yasumizu Y, Miyazaki Y,

Miyajima A, Kikuchi E, Oya M. Potent increased risk of the initiation of DNA replication in human prostate cancer with the use of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors. *Am J Clin Exp Urol*. 12;2(2):136-44. 2014 Jul. 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

(1)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, May 10, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(2)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, May 10, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(3)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, May 10, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(4)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, May 7, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(5)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, May 7, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(6) **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 2 月 27 日。ATC コンベンションルーム (大阪府大阪市)。

(7) **宮崎保匡**、小坂威雄、三上修治、菊地栄次、田中伸之、安水洋太、宮嶋哲、岡田保典、大家基嗣。上部尿路上皮癌における EZH2 によるヒストン H3K27 トリメチル化修飾と予後についての検討。第 74 回日本癌学会学術総会。2015 年 10 月 10 日。名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)。

(8) 大門達明、小坂威雄、菊地栄次、三上修治、**宮崎保匡**、橋本あり、橋本茂、水野隆一、宮嶋哲、岡田保典、佐邊壽孝、大家基嗣。腎盂尿管癌における EPB4.1L5 発現の意義。第 74 回日本癌学会学術総会。2015 年 10 月 10 日。名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)。

(9) **Miyazaki Y**, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Yasumizu Y, Miyajima A, Okada Y, Oya M. The prognostic impact of Histone H3K27 trimethylation regulated by EZH2 in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. American Urological Association annual meeting, May 15, 2015, New Orleans Ernest N. Morial Convention Center (USA).

(10) **宮崎保匡**、小坂威雄、菊地栄次、三上修治、宮嶋哲、佐藤靖史、大家基嗣。尿路上皮癌における血管新生調節因子バソヒビンとエピジェネティクス制御機構の解明。第 103 回日本泌尿器科学会総会。2015 年 4 月 18 日。石川県立音楽堂 (石川県金沢市)。

(11) 小坂威雄、**宮崎保匡**、宮嶋哲、菊地栄次、田中伸之、岡田保典、佐藤靖史、大家基嗣。前立腺がんにおける新規血管新生関連マーカーの発現の検討。第 73 回日本癌学会学術総会。2014 年 9 月 25 日。パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。

(12) 田中伸之、小坂威雄、**宮崎保匡**、水野隆一、菊地栄次、大家基嗣。尿路上皮癌におけるシスプラチン耐性獲得とがん微小環境としての上皮間葉転換誘導。第 73 回日本癌学会学術総会。2014 年 9 月 25 日。パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。

(13) **宮崎保匡**、小坂威雄、宮嶋哲、三上修治、林雄一郎、田中伸之、長田浩彦、菊地栄次、

中川健、岡田保典、佐藤靖史、大家基嗣。前立腺癌における新規血管新生調節因子 Vasohibin-1 発現の臨床的意義。第 52 回日本癌治療学会学術集会。2014 年 8 月 28 日。パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。

[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  
<http://www.keio-urolgy.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