

氏名	小柳 貴裕
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 446 号
学位授与年月日	平成 26年 3月 19日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	Vasohibin-2 の婦人科悪性腫瘍血管新生における役割の解明およびこれを標的とした治療法の開発
論文審査委員	(委員長) 教授 屋代 隆 (委員) 准教授 水上 浩明 講師 森 政樹

論文内容の要旨

1 研究目的

2004年に東北大学加齢医学研究所・佐藤靖史教授らより、新規の血管新生ネガティブフィードバック調節因子として Vasohibin-1 (VASH1)が同定され、後にアミノ酸配列約50%の相同性をもつ Vasohibin-2 (VASH2)が同定された。VASH1はVEGF等の血管新生刺激因子で刺激を受けた血管内皮細胞において発現誘導され、細胞外へ分泌されると内皮細胞の遊走・増殖を抑制し血管新生を終息させることから、血管新生のネガティブフィードバック調節因子として機能する。一方、VASH2は血管内皮細胞に加え骨髄由来の単球・マクロファージに発現し、新生血管の出芽領域でVASH1とは逆に血管新生を促進する。VASH2は種々の悪性腫瘍細胞においても発現していることが近年報告されてきている。婦人科悪性腫瘍においても高頻度にVASH2の発現がみられることから、VASH2は婦人科悪性腫瘍の血管新生、腫瘍増殖・進展に重要な役割を果たしている可能性が高いと推察され、VASH2が新たな血管新生抑制療法の有用な標的となりうると考えられる。また、VASH2は低酸素では誘導されないこと、microRNA-200bの発現によって負に制御されること、VASH2発現の変動はVEGFR2の発現には影響しないこと等も明らかとなり、主要な血管新生因子であるVEGF-Aとはその発現様式が異なることも明らかにされた。

本研究では、VASH2の分子細胞生物学的な機能を詳細に解析し、特に婦人科悪性腫瘍血管新生における役割を解明するとともに、抗体療法や遺伝子治療等、VASH2を標的とした新たな血管新生抑制療法の開発の基礎を築くことを目的とする。

2 研究方法

近年、VASH2と腫瘍血管新生との関係についての報告は散見されるが、治療応用に関する報告は皆無である。本研究では、まず、ヒト卵巣癌におけるVASH2の発現を確認し、培養細胞株においてショートヘアピン型RNA (shRNA) ベクター導入により内因性VASH2をノックダウンしてVASH2の腫瘍血管新生や腫瘍増殖における役割について検討した。次に、外因性にVASH2に対するsiRNA (siVASH2)を投与しVASH2発現を抑制する治療モデルを作成した。siRNA投与に際しては、siRNAの腫瘍内滞留性向上およびヌクレアーゼによる分解から保護するために、

アテロコラーゲンと混合して局所投与を行った。

さらに、VASH2 の生物活性中心を VASH1 の構造・生物活性中心との類似性より予測し、同部位を抗原決定基としてマウスハイブリドーマを用いてヒト VASH2 に対する中和モノクローナル抗体 (hVASH2 mAb) を樹立した。本研究では、これら抗体の中和活性について *in vitro* で内皮細胞の遊走能や血管形成能を指標として評価し、最も中和活性の高いクローンを選択して卵巣癌皮下移植モデルを用いて *in vivo* における抗腫瘍効果を評価した。

3 研究成果

ヒト卵巣癌組織において、VASH2 タンパク質は種々の組織型のうち漿液性腺癌で高頻度に発現していた。卵巣漿液性腺癌培養細胞株において内因性 VASH2 を shRNA 発現ベクターの遺伝子導入により安定的にノックダウンすると、血管新生抑制を介した腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、卵巣漿液性腺癌皮下移植モデルで外因性に siVASH2 をアテロコラーゲンと混合して局所投与したところ、内因性 VASH2 のノックダウン効果および腫瘍内血管新生の抑制を介した腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、siVASH2 は腫瘍内新生血管の成熟化(ペリサイト被覆)を促進した。

VASH2 の活性中心のスクリーニングにおいて、変異型 VASH2 発現株の培養上清を添加すると、野生型 VASH2 発現株の培養上清を添加した時にみられる血管内皮細胞の遊走・血管形成促進作用が観察されなくなった。このことから、予測されたアミノ酸配列に VASH2 の活性中心が存在することが考えられたため、当該変異部位を含むアミノ酸配列をエピトープとする中和抗体の作製を試みた。血管内皮細胞を用いて *in vitro* の実験系で VASH2 に対する中和活性のスクリーニングを行い、hVASH2 mAb クローン 1760 を樹立することに成功した。さらに、*in vivo* 実験系における検討では、hVASH2 mAb の全身投与により DISS および SKOV-3 の皮下腫瘍増殖・腫瘍内血管新生が有意に抑制された。

4 考察

卵巣漿液性腺癌培養細胞株において、shRNA 発現ベクター導入による内因性 VASH2 の発現抑制は、腫瘍血管新生を抑制し、腫瘍増殖抑制効果を示した。このことから、VASH2 が卵巣癌治療における有用な分子標的となり得ることが考えられたため、治療応用に関する研究として、本研究では VASH2 標的 siRNA 投与と抗ヒト VASH2 中和モノクローナル抗体投与の 2 つの方法に着目し、それらの抗腫瘍効果を検討した。

卵巣漿液性腺癌皮下移植モデルにおいて、siVASH2・アテロコラーゲン混合液の局所投与は内因性 VASH2 発現を抑制し、腫瘍内血管新生を抑制して腫瘍増殖抑制効果を示した。また、siVASH2 投与は腫瘍内新生血管の成熟化を促進した。このことから、siVASH2 は腫瘍内における血流改善、間質圧の低下、低酸素状態の改善といった腫瘍微小環境を改善することが期待され、化学療法剤の腫瘍組織への到達を改善し、相乗効果が得られる可能性が考えられた。

次に、抗体療法モデルとして、最も中和活性の強い hVASH2 mAb クローン 1760 を樹立し、hVASH2 mAb の卵巣癌皮下移植モデルにおける腫瘍増殖抑制効果を確認した。VEGF に対する中和抗体であるベバシズマブは、生理的な血管内皮機能をも抑制してしまうため、消化管穿孔、高血圧、蛋白尿などの副作用を起こす危険性がある。一方、VASH2 は血管内皮における発現が

低く、VASH2 抑制により VEGF や VEGFR の発現低下も認めない。さらに、VASH2 はマウス生体内においては胎児、胎盤、脳、生殖器などで強い発現が認められるものの、その他のほとんどの臓器では発現しておらず、また、VASH2 ノックアウトマウスの表現型にも明らかな異常はみられない。このことから、VASH2 はより腫瘍に特異的に発現し、生理的血管新生への関与は少ないことが推測される。したがって、VASH2 は腫瘍血管新生抑制療法の有用な分子標的であり、正常組織への影響が少なく副作用のリスクが低い、より安全な治療法の開発が期待できるものと考えられる。さらに、VASH1 は腫瘍血管新生を抑制するが、血管の退縮は起こらず血管機能を維持させることが報告されている。よって、VASH2 の抑制と VASH1 の発現増加の併用療法が可能となれば、癌治療においてより魅力的な治療戦略となるかもしれない。

5 結論

本研究により、婦人科悪性腫瘍の進展・血管新生において VASH2 は促進的に機能しており、内因性 VASH2 の抑制実験から VASH2 が婦人科悪性腫瘍治療の新たな分子標的となりうることが示唆された。また、抗ヒト VASH2 中和モノクローナル抗体を樹立することに成功し、*in vitro*、*in vivo* で VASH2 に対する有意な中和活性を認めたことから、VASH2 を標的とした新規抗体療法の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

婦人科悪性腫瘍、特に卵巣癌は女性の癌死亡の主要な原因の一つとなっている。手術療法や化学療法が行われるが、その効果は一時的で高率に再発するため予後を改善するための新たな治療法の開発が必要である。血管新生関連の分子標的治療として、近年抗 VEGF 療法が臨床応用されつつあるが、婦人科悪性腫瘍における効果は不十分であり薬剤耐性・薬剤不応性の問題や、消化管穿孔、高血圧、蛋白尿などの副作用も報告され、これらを克服するための新たな治療法の開発が必要である。

本研究では、新規血管新生調節因子である vasohibin ファミリー、特に vasohibin-2 (VASH2) に注目し、VASH2 を標的とした新たな血管新生抑制療法の開発を目指した検討が行われた。今回の研究では、主に卵巣癌の培養細胞株を用いた検討がなされた。卵巣癌細胞において VASH2 が高発現していることを確認した後、治療応用に関する基礎研究として、VASH2 標的 siRNA 投与と抗ヒト VASH2 中和モノクローナル抗体投与の 2 つの方法に着目し、それらの抗腫瘍効果を検討した。いずれの方法においても、腫瘍内血管新生を抑制することで抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。VASH2 標的 siRNA 投与の実験では、腫瘍血管成熟化や他の血管新生関連因子の発現について検討され、興味深い研究結果となった。

本研究において、婦人科悪性腫瘍の進展・血管新生において VASH2 は促進的に機能しており、VASH2 を標的とした新規分子標的療法の可能性が示唆された。学位論文中には若干の修正箇所が認められ、既存の抗 VEGF 療法との差異などの検討課題は残るものの、本研究の一部は既に国際誌に発表されており、学位に値する研究であると全員一致して判断し合格とした。

最終試験の結果の要旨

最終試験における口頭発表は研究背景、研究方法、結果、考察ともいずれも適切に行われた。研究目的は明瞭であり、目的達成のための筋道も理論的で妥当なものであった。プレゼンテーションはわかりやすく工夫されていた。本研究の意義について過不足のない考察が行われていた。

周辺の臨床的事項も含めて研究全般について質問がなされたが、特に研究結果、考察、臨床応用に向けた今後の検討課題については概ね良好な回答が示された。

医学研究者として独創性に優れ、高度な研究遂行能力と論理的思考を有すると判断され、最終試験に合格とした。