

## 尿路上皮癌における VASH1, VASH2 の発現とその機能解析

### [1] 組織

代表者：大家 基嗣  
(慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室)

対応者：佐藤 靖史  
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：小坂 威雄  
(慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室)  
宮崎 保匡  
(慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室)

研究費：物件費30万円，旅費0万円



### [2] 研究経過

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)。

本共同研究は、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研究を開始した。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、研究成果として論文発表した(成果資料1)。

平成24-25年度は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再発に関連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、研究成果として論文発表した(成果資料2)。

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、平成 25 年度は、尿路上皮癌のうちの膀胱癌と前立腺癌における VASH1/VASH2 免疫染色の検討、細胞株を用いた検討を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。平成 25 年 4 月 25 日札幌にて行われた第 101 回日本泌尿器科学会総会、平成 25 年 5 月 5 日サンディエゴにて行われた米国泌尿器科学会 (AUA2013)、平成 25 年 10 月 24 日京都にて行われた第 51 回日本癌治療学会学術集会以研究成果の発表を行った。平成 26 年 1 月 11 日～12 日に蔵王にて行われた第 9 回 Vasohibin 研究会に参加し、学外研究者との交流を行った。平成 26 年 1 月 29 日東京にて佐藤教授と打ち合わせを行い、進捗状況報告と今後の研究の協議を行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

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)。膀胱全摘除術を施行した約 20 例の症例を解析中であり、今後さらに症例数を増やして予後との関連を検討する予定である。

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。

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。

今後、マウス皮下腫瘍モデルを作成し、VASH1, VASH2 を標的とする薬剤や既存の治療薬を投与して癌細胞における血管新生と腫瘍治療効果を検討する予定である。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、尿路上皮癌や前立腺癌における 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。本共同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。

### [4] 成果資料

(1) The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. Yasumasa Miyazaki, Takeo Kosaka, Shuji Mikami, Eiji Kikuchi, Nobuyuki Tanaka, Takahiro Maeda, Masaru Ishida, Akira Miyajima, Ken Nakagawa, Yasunori Okada, Yasufumi Sato, Mototsugu Oya. **Clinical Cancer Research.** 2012. August. 1;18(15):4145-53.

(2) The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer. Takeo Kosaka, Yasumasa Miyazaki, Akira Miyajima, Shuji Mikami, Yuichiro Hayashi, Nobuyuki Tanaka, Hirohiko Nagata, Eiji Kikuchi, Ken Nakagawa, Yasunori Okada, Yasufumi Sato, Mototsugu Oya. **British Journal of Cancer.** 2013. May 28;108(10):2123-9.