

課題番号 45

## 前立腺癌における VASH1, VASH2 の発現とその機能解析

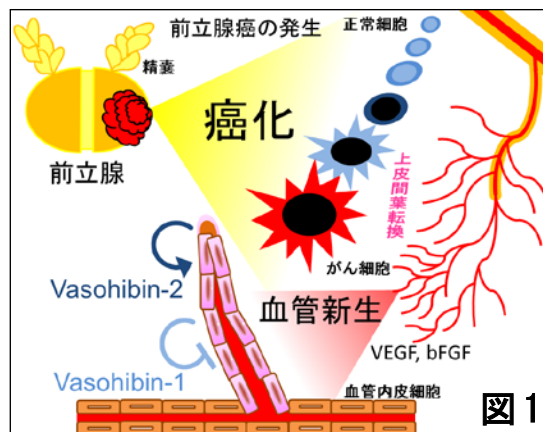
[1] 組織

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 45 万円，旅費 0 万円

[2] 研究経過

血管新生阻害剤の臨床応用は他癌に先駆けて泌尿器科で開始されたが薬剤耐性が問題となっている。耐性獲得機序からも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、活性化した血管内皮細胞で発現する遺伝子群の中から同定された Vasohibin-1(VASH1)と Vasohibin-2(VASH2)に着目して、平成 23 年より共同研究を開始した。特に VASH1 は外因性に投与すると血管内皮やリンパ管細胞の遊走能や増殖能を抑制する極めてユニークな蛋白質であり、血管やリンパ管新生に対して活性を持つ因子は VASH1 の他に報告がない。血管・リンパ管新生は癌の遠隔転移、リンパ節転移に関与するため、Vasohibin の機能の解明は転移のメカニズムを解明し、「がん血管の異質性」を標的とした新たな治療につながる可能性がある (図 1)。我々はすでに尿路上皮癌と前立腺癌において、VASH1 の高発現が再発や癌特異的生存率における予後因子として重要であることを報告してきた。尿路上皮癌において VASH1 の発現に関する病態解明と予後予測のバイオマーカーとなるか明らかにかすることを目的とせず研究を開始した。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)。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、手術検体の CD34 および VASH1 の免疫染色を行い、各種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)。VASH1 の発現の重要性を報告してきたが VASH2 を含め、その発現制御については未だに未解明である。本研究は VASH1, VASH2 の発現の意義とその制御機構を解明し、その調節因子を内包する癌微小環境を明らかにすることで、新しい予後診断方法やがん血管の異質性を標的とした治療薬への臨床応用に展開するための分子基盤の確立を目的としてさらなる研究を開始した。平成 27 年度は、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 28 年 1 月 23 日～24 日に蔵王にて行われた第 11 回 Vasohibin 研究会に参加し、学外研究者との交流を行った。平成 28 年 2 月 9 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。平成 28 年 2 月 27 日大阪にて行われた第 25 回泌尿器科分子細胞・細胞研究会で研究成果の発表を行った。また、アメリカ泌尿器科学会総会 (AUA2016) に演題採択され、平成 28 年 5 月 10 日に San Diego で研究成果を発表予定である。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

以下に示す研究成果を得た。

①ヒト癌組織び VASH2 の意義について検討するために、限局性前立腺癌に対して前立腺全摘術を施行した 50 例 (pT1-3, N0 M0) において抗 VASH2 抗体を用いて、免疫組織学的に VASH2 発現を評価した。評価方法として 腫瘍細胞の染色状態を強さ (0～3 段階)、及び、分布 (0～4 段階) を考慮した Remmele スコア (0～12 点) を用いた。腫瘍組織において血管内皮細胞も VASH2 抗体で染色されたため、陽性血管数/mm<sup>2</sup> を VASH2 density として評価した。免疫染色では、腫瘍細胞と血管内皮細胞の VASH2 染色性は癌組織によって異なり、両者ともに陰性であったり、陽性であったりと癌組織によって違いが認められた。染色性を点数化し、臨床学的データとの関連を評価した。前立腺癌の腫瘍細胞の Remmele Score (染色スコア) と、腫瘍部位における VASH2 陽性血管の密度 (VASH2 density) を評価した。VASH2 の発現は、腫瘍細胞と腫瘍の血管内皮細胞に認められた。単変量解析では pT stage と共に、血管内皮細胞での VASH2 の高発現が有意に (p=0.019) 術後 PSA 再発に関連した (図 2)。血管内皮細胞での VASH2 の高発現は、術前 PSA 値、pT stage、腫瘍細胞での VASH2 の高発現と関連していた。50 例の検討ではあるが、VASH2 の発現が腫瘍の再発に関与する可能性があることから、今後 300 例まで検体を増やしてさらに検討する予定である。

②各種前立腺癌細胞株 (DU145、PC3、LNCaP)、

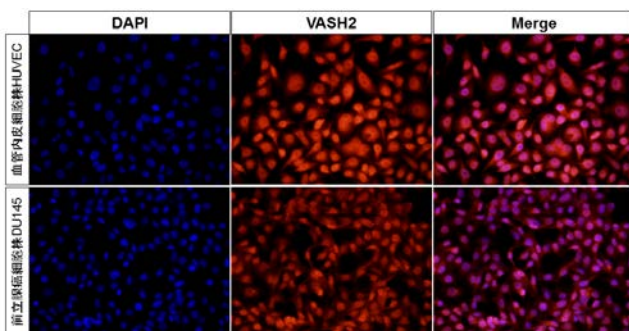


図 2. 細胞蛍光免疫染色

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 は血管内皮細胞と前立腺癌細胞株 (DU145) で強く発現を認めた (図 2)。強く発現を認めた HUVEC や DU145 に抗 VASH2 抗体を投与したところ細胞増殖抑制効果を認めた。今後、マウス皮下腫瘍モデルを作成し、VASH1 や VASH2 を標的とする薬剤や既存治療薬を投与して血管新生や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、前立腺癌における Vasohibin 発現の病態解明につながると期待され、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 Vasohibin 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, VASH2 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.

(3) 前立腺癌における新規血管新生関連マーカーの発現の検討. 小坂 威雄, 宮崎 保匡, 宮嶋 哲, 三上 修治, 安水 洋太, 菊地 栄次, 中川 健, 岡田 保典, 佐藤 靖史, 大家 基嗣. **泌尿器外科** 27 巻 8 号 Page1203-1206(2014.08)

(4) 前立腺癌における微小環境 特に血管新生に着目して. 小坂 威雄, 宮崎 保匡, 宮嶋 哲, 大家 基嗣. **排尿障害プラクティス** 22 巻 3 号 Page261-267(2014.09)