

課題番号 59

## vasohibin family を対象とした 婦人性器がん分子標的・遺伝子治療の開発

### [1] 組織

代表者：嵯峨 泰

(自治医科大学産科婦人科)

対応者：佐藤 靖史

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

高橋 詳史 (自治医科大学産科婦人科)

小柳 貴裕 (自治医科大学産科婦人科)

葭葉 貴弘 (自治医科大学産科婦人科)

研究費：物件費 30 万円

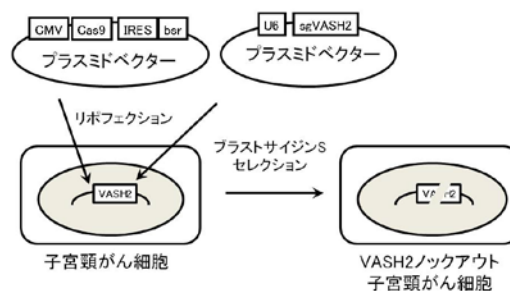


図:CRISPR/Cas を用いたバソヒビン 2 ノックアウト子宮頸がん細胞の樹立

### [2] 研究経過

がん治療において抗 VEGF 抗体による血管新生抑制療法の臨床応用が始まった。しかしながら抵抗性や副障害などの問題から、本治療に応用可能な因子の研究・開発は、近年ますますその重要性を増している。本研究ではがん細胞自体が産生し、一方正常組織ではほとんど発現がみられない新規血管新生調節因子バソヒビン 2 の婦人性器がん治療への臨床応用の可能性を明らかにする目的で研究を行った。以下、研究活動状況の概要を記す。CRISPR/Cas は近年注目されているゲノム編集技術のひとつで、その簡便さから世界中に急速に広まっている手法である。CRISPR/Cas を用いて婦人科悪性腫瘍細胞のバソヒビン 2 をノックアウト後形質の変化を観察、ひいては治療標的としての可能性を探った。バソヒビン 2 は 7 つのスプライシングバリエントが報告されている。このうち 6 つに共通のエクソン 4 に標的配列を設定した。CRISPR DESIGN (<http://crispr.mit.edu/>) を利用しエクソン 4 の標的候補配列から高いスコアの配列を選択した。この配列を含む sgRNA 発現ベクターと Cas9 発現ベクターをリポフェクション法で子宮頸がん細胞に遺伝子導入、ブラストサイジン S 塩酸塩を含む培地で選択し、耐性株を樹立した(図)。これらの細胞株を用いてバソヒビン 2 遺伝子変異、発現、細胞増殖、血管新生、腫瘍増殖、を観察した。これらの成果は東北大学加齢医学研究所の共同研究者に主に電子メールで報告し今後の方針を討論した。

### [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。まず第 1 に、サンガーシーケンスを用いた検討により耐性株には標的配列付近に塩基の挿入や欠失など、さまざまな遺伝子変異が認められた。またバソヒビン 2 の mRNA 発現の低下が観察された。in vitro における細胞増殖には変化はみられなかった。第 2 に、バソヒビン 2 ノックアウト細胞の培養上清はヒト臍帯静脈内皮細胞の in vitro における増殖を促進できなかった。さらにヌードマウス背部皮下に接種し形成させた腫瘍の増殖能も著明に低下した。これらの結果から、バソヒビン 2 ノックアウトは子宮頸がん細胞自体の増殖には影響を与えず、一方、血管新生を抑制し腫瘍増殖を低下させることが示された。以上よりバソヒビン 2 を標的とした子宮頸がん治療の可能性が示唆された。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、CRISPR/Cas によるバソヒビン 2 ノックアウトは子宮頸がんの血管新生を抑制し腫瘍増殖を低下させることが示され、バソヒビン 2 を標的とした子宮頸がん治療の可能性が示唆された。これらの知見が臨床応用されれば、近年ほとんど改善のみられない進行子宮頸がん症例の予後に対して、大きなインパクトをもたらす可能性がある。

[4] 成果資料

(1) Norita R, Suzuki Y, Furutani Y, Takahashi K, Yoshimatsu Y, Podyma-Inoue KA, Watabe T, Sato Y. Vasohibin-2 is required for epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by modulating TGF- $\beta$  signaling. *Cancer Sci* doi: 10.1111/cas.13157,2017.

(2) Takei Y, Takahashi Y, Machida S, Taneichi A, Takahashi S, Nagashima T, Morisawa H, Saga Y, Matsubara S, Fujiwara H. Response to and toxicity of gemcitabine for recurrent ovarian cancer according to number of previous chemotherapy regimens. *J Obstet Gynaecol Res* 43:358-364,2017.

(3) Kadonosono T, Yimchuen W, Tsubaki T, Shiozawa T, Suzuki Y, Kuchimaru T, Sato Y, Kizaka-Kondoh S. Domain architecture of vasohibins required for their chaperone-dependent unconventional extracellular release. *Protein Sci* doi: 10.1002/pro.3089,2016.

(4) Takeda E, Suzuki Y, Sato Y. Age-associated downregulation of vasohibin-1 in vascular endothelial cells. *Aging Cell* :885-892,2016.

(5) Saito M, Suzuki Y, Yano S, Miyazaki T, Sato Y. Proteolytic inactivation of anti-angiogenic vasohibin-1 by cancer cells. *J Biochem* 160:227-232,2016.

(6) Yoshida T, Takei Y, Machida S, Taneichi A, Sato N, Takahashi S, Takahashi Y, Saga Y, Matsubara S, Fujiwara H. Prognosis of endometrial cancer patients with and without symptoms at recurrence. *J Obstet Gynaecol Res* 42:1814-182,2016.

(7) Sakamoto Y, Takei Y, Saga Y, Machida S, Takahashi Y, Fujiwara H. Immature ovarian teratoma with hyponatremia and low serum vasopressin level. *J Obstet Gynaecol Res* 42:1400-1404,2016.

(8) Koyanagi T, Suzuki Y, Komori K, Saga Y, Matsubara S, Fujiwara H, Sato Y. Targeting human vasohibin-2 by a neutralizing monoclonal antibody for anti-cancer treatment. *Cancer Sci* doi: 10.1111/cas.13149,2016.

(9) Koyanagi T, Fujiwara H, Usui H, Ariga H, Machida S, Takei Y, Saga Y, Shozu M, Fukushima N, Niki T, Matsubara S, Suzuki M. Ovarian nongestational choriocarcinoma and associated adenocarcinoma with the same germ cell origin determined by a molecular genetic approach: A case report. *Pathol Int* 66:529-534,2016.

(10) Wang D, Saga Y, Sato N, Nakamura T, Takikawa O, Mizukami H, Matsubara S, Fujiwara H. The hepatocyte growth factor antagonist NK4 inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase expression via the c-Met-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling pathway. *Int J Oncol*: 48:2303-2309,2016

(11) Takahashi Y, Saga Y, Koyanagi T, Takei Y, Machida S, Taneichi A, Mizukami H, Sato Y, Matsubara S, Fujiwara H. Vasohibin-1 expression inhibits advancement of ovarian cancer producing various angiogenic factors. *Cancer Sci* 107:629-637,2016

(12) Horie S, Suzuki Y, Kobayashi M, Kadonosono T, Kondoh S, Kodama T, Sato Y. Distinctive role of vasohibin-1A and its splicing variant vasohibin-1B in tumor angiogenesis. *Cancer Gene Ther* 23:133-141,2016.