

20118023A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移と
がん幹細胞制御法の確立に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 靖史

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移とがん幹細胞制御法の確立に関する研究	-----	1
佐藤靖史		
II. 分担研究報告		
1. 腫瘍周囲組織における血管新生抑制剤による血管成熟化の誘導	-----	3
高倉伸幸		
2. 腫瘍血管細胞によるEML4-ALK肺癌の分子標的薬耐性機構の検討	-----	4
矢野聖二		
3. BMP9を標的とした腫瘍血管新生制御に関する研究	-----	7
渡部徹郎		
4. リンパ管新生に関わるLYVE-1のプロセッシングに関する研究	-----	8
平川聡史		
5. 腫瘍血管の安定化に関する研究	-----	9
望月直樹		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	17

腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移とがん幹細胞制御法の確立に関する研究

研究代表者 佐藤 靖史 東北大学加齢医学研究所教授

研究要旨

当該研究者の発見したvasohibinファミリー分子のうち、内皮細胞の産生する血管新生抑制因子vasohibin-1は、癌細胞のcalpainによって分解・不活性化されることを示した。一方、癌細胞の産生する血管新生促進因子vasohibin-2は、mir200によって負に発現調節されており、癌細胞でのmir200の低下がvasohibin-2の産生増加に繋がる可能性を示した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名
高倉伸幸・大阪大学 教授
矢野聖二・金沢大学 教授
渡部徹郎・東京大学 准教授
平川聡史・浜松医科大学 准教授
望月直樹・国立循環器病センター研究所 部長

A. 研究目的

本研究の目的は、当該研究者が発見したvasohibinファミリー分子の特性を明らかにし、その成果を基に、本邦発の革新的ながん治療法を確立することである。

B. 研究方法

vasohibinファミリー分子の癌組織における発現様式や機能を解析する。特に内皮細胞が産生するvasohibin-1の癌組織における不活性化と、癌細胞が産生するvasohibin-2の発現調節を明らかにする。

（倫理面への配慮）

全ての動物実験は所属施設での審査を受けた後に行う。

C. 研究結果

内皮細胞と各種癌細胞との共培養でvasohibin-1は高率に分解・不活性化されること、この不活性化はcystein proteaseに依存し、特にがcalpain阻害剤によって完全に阻害できることを明らかにした。

癌細胞は構成的にvasohibin-2を発現している。vasohibin-2 mRNAの3' UTR領域にはmicroRNAのmir200結合配列が

存在し、mir200によってその発現は負に調節され、癌細胞におけるmir200の低下vasohibin-2を招来することが判明した。

D. 考察

内皮が産生する血管新生抑制因子vasohibin-1は癌によって分解・不活性化され、十分に機能していない可能性が高く、その対策としてcalpain阻害が有効である可能性が示された。一方、癌細胞が産生する血管新生促進因子vasohibin-2の発現亢進はmir200の発現低下に起因すると考えられた。

E. 結論

Vasohibin-1は癌間質の血管内皮細胞で産生されるが、分解・不活性化されて、十分に機能していない可能性が高い。一方、vasohibin-2は多くの癌細胞で発現し、腫瘍血管新生促進に寄与するが、その発現亢進はmir200の低下に起因すると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

Miyashita H, Suzuki H, Ohkuchi A, Sato Y. Mutual Balance between Vasohibin-1 and Soluble VEGFR-1 in Endothelial Cells. *Pharmaceuticals* 4, 1551-1577, 2011.

Sato Y. The Vasohibin Family: Novel Regulators of Angiogenesis. *Vascular Pharmacology* 2012 [Epub ahead of print].

2. 学会発表

佐藤靖史：腫瘍血管新生の内因性調節機構. がん微小環境ネットワークの統合的研究 第一回公開ワークショップ. 東京, 2011, 6, 17.

佐藤靖史：がんを脈管から治療する. 第70回日本癌学会学術集会モーニングレクチャー. 名古屋, 2011, 10, 3-5.

中村崇宣、佐藤靖史：癌細胞へのVasohibin-1 遺伝子一過性導入によるparadoxical な血管新生促進. 第70回日本癌学会学術集会. 名古屋, 2011, 10, 3-5.

佐藤靖史：血管新生抑制因子 Vasohibin の新展開. 第38回日本臓器保存生物医学会学術集会. 仙台, 2011, 11, 25-26.

佐藤靖史：A system that prevents angiogenesis and vascular aging. 第19回日本血管生物医学会学術集会. 東京, 2011, 12, 8-10.

齋藤恵、鈴木康弘、佐藤靖史：Proteolytic cleavage of secreted Vasohibin-1 by cancer cells. 第19回日本血管生物医学会学術集会. 東京, 2011, 12, 8-10.

伊藤想一、小林美穂、鈴木康弘、宮下浩輝、佐藤靖史：Vasohibin-1 normalizes tumor vessels and inhibits cancer metastasis. 第19回日本血管生物医学会学術集会. 東京, 2011, 12, 8-10.

佐藤靖史：がんを血管から治療する. 平成23年度北海道大学公開シンポジウム. 札幌, 2012, 1, 12.

佐藤靖史：Vasohibin ファミリーを応用したがん治療法の開発研究. 第3次対がん10か年総合戦略(平成16年～25年度)文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」合同公開シンポジウム. 東京, 2012, 1, 30-31.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
該当なし。

腫瘍周囲組織における血管新生抑制剤による血管成熟化の誘導

研究分担者 高倉 伸幸 大阪大学微生物病研究所情報伝達分野教授

研究要旨

腫瘍周囲組織の血管は、腫瘍内部と同様未成熟であり、血管新生抑制剤により正常化されることが解明された。本機構ががん細胞のがん周囲組織からの浸潤に関与することが示唆された。

A. 研究目的

近年、がん組織の血管の正常化を誘導し、抗がん剤の効果を高める治療法の開発が進められてきた。しかし、血管新生抑制剤を使用することで、腫瘍内部の低酸素が誘導され、悪性化を増したがん細胞の周囲組織への浸潤が誘導されることが指摘されている。そこで本研究では、血管新生抑制剤投与後、がん細胞浸潤のルートとして考えられる腫瘍周囲の血管についてどのように変化しているのかを解明することを目的として解析した。

B. 研究方法

ヒト腫瘍細胞をヌードマウスの皮下に移植した。腫瘍組織からがん細胞が周囲に浸潤していく際に通過する、腫瘍と正常組織の間に形成されるfibrous cap (FC)において、どのような血管が形成され、そしてVEGF阻害によりどう影響を受けるかを検討した。

(倫理面への配慮)

大阪大学の定める遺伝子組換えに関する取り決めに従い研究を遂行した。

C. 研究結果

FC内の血管も腫瘍内の血管と同様、血管内皮細胞に壁細胞の裏打ちを伴わない未成熟な血管が優勢であった。VEGFを阻害すると、未熟な血管は退縮し、壁細胞化を伴う成熟血管が優勢となった。

D. 考察

成熟血管は細胞外マトリックスで十分に包囲されることが知られており、がん細胞はマトリックスを足場として浸潤することから、血管新生抑制後のFCの血管成熟部からがん細胞の浸潤が誘導される可能性が示唆された。

E. 結論

腫瘍血管の正常化により、腫瘍周囲の血管が正常化することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naito H, et al. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J*.31, 842-855, 2011 他11件

2. 学会発表

Takakura N. Cancer stem cell and their vascular niche. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日 名古屋 他7件

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

腫瘍血管細胞によるEML4-ALK肺癌の分子標的薬耐性機構の検討

研究分担者 矢野 聖二 金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究要旨

EMK4-ALK 融合遺伝子を有する肺癌は、ALK 阻害薬であるクリゾチニブが著効する。しかし、奏効例もほぼ例外なく 1～数年以内に耐性を獲得し再燃することが次なる問題となっている。

宿主の間質細胞は癌細胞の機能を修飾することが知られているが、我々は間質の線維芽細胞が産生する HGF を産生し肺癌の EGFR 阻害薬耐性を誘導することを報告しているが、ALK 阻害薬に対する間質細胞の及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では EML4-ALK 変異を有する肺癌細胞の ALK 阻害薬感受性において血管内皮細胞が果たす役割を検討した。

EML4-ALK変異を有する肺癌細胞株（H2228とH3122）はALK阻害薬であるクリゾチニブと選択的ALK阻害薬TAE684に高い感受性を示した。血管内皮細胞はEGF, TGF- α , HB-EGFなどのEGFRリガンドを産生し、共培養することにより癌細胞のALK阻害薬耐性を誘導した。これらの結果は、宿主間質細胞との相互作用は癌細胞のALK感受性において非常に重要な役割を果たしており、腫瘍血管が産生する液性因子が耐性克服の治療標的となることが示唆された。

A. 研究目的

肺癌はわが国における悪性新生物による死亡原因の第1位であるが、肺腺癌の3-5%にEMK4-ALK融合遺伝子を有することが2007年に報告された。EML4-ALK変異肺癌は、ALK阻害薬であるクリゾチニブが著効する。しかし、奏効例もほぼ例外なく1～数年以内に耐性を獲得し再燃することが次なる問題となっている。

クリゾチニブ耐性の分子機構としては、ALKのクリゾチニブ結合部位に相当する部位に生じる遺伝子変異（ゲートキーパー変異）やALK遺伝子増幅が知られている。近年、ゲートキーパー変異やALK遺伝子増幅による耐性を克服する薬剤として、クリゾチニブよりもALK阻害活性の高い選択的ALK阻害薬（TAE684, CH5424802, ASP-3026）が開発されている。しかし、これら選択的ALK阻害薬に対しても耐性が生じることは容易に想像される。

宿主の間質細胞は癌細胞の機能を修飾することが知られているが、我々は間質の線維芽細胞が産生するHGFを産生

し肺癌のEGFR阻害薬耐性を誘導することを報告しているが、ALK阻害薬に対する血管内皮細胞や線維芽細胞の及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではEML4-ALK変異を有する肺癌細胞のALK阻害薬感受性において血管内皮細胞が果たす役割を検討した。

B. 研究方法

EML4-ALK変異を有するヒト肺癌細胞株（H2228, H3122）とヒト血管内皮細胞株（HUVEC, HMVEC）を使用した。ALK阻害薬として、ALKとMet阻害活性を併せ持つクリゾチニブと、ALK選択的阻害薬TAE684を使用した。癌細胞単独あるいはdouble chamberで血管内皮細胞と共培養し、*in vitro*におけるALK阻害薬感受性をMTT法で検討した。細胞内シグナル伝達をWestern blotで検討した。EGFRリガンドやHGF産生はELISA法で測定した。

（倫理面への配慮）

全ての動物実験は所属施設での審査を受けた後に行う。

C. 研究結果

EML4-ALK 肺癌細胞株 H2228 および H3122 は、エルロチニブや WZ4002 などの EGFR-TKI に感受性を示さなかったが、クリゾチニブおよび TAE684 に高い感受性を示した(図 1)。EGFR リガンドである EGF, TGF- α , HB-EGF は EML4-ALK 肺癌細胞株のクリゾチニブ耐性を誘導したが、IGF-1, PDGF-AA, HGF はクリゾチニブ耐性を誘導しなかった。一方、TAE684 耐性は EGFR リガンドのみならず HGF によっても誘導された(図 2)。これは、クリゾチニブが ALK 以外にも HGF の受容体である Met の阻害活性も併せ持っているため、HGF はクリゾチニブ耐性を阻害できず、TAE684 耐性のみを誘導したと考えられた。

血管内皮細胞は EGF, TGF- α , HB-EGF などの EGFR リガンドを産生していた。さらに、EML4-ALK 肺癌細胞株は血管内皮細胞株である HMVEC と共培養することでクリゾチニブ耐性を示し、その耐性は抗 EGFR 抗体により解除された(図 3)。

以上より、血管内皮細胞は EGFR リガンドを産生することにより EML4-ALK 肺癌細胞の ALK 阻害薬耐性を誘導することが明らかとなった。

図 1

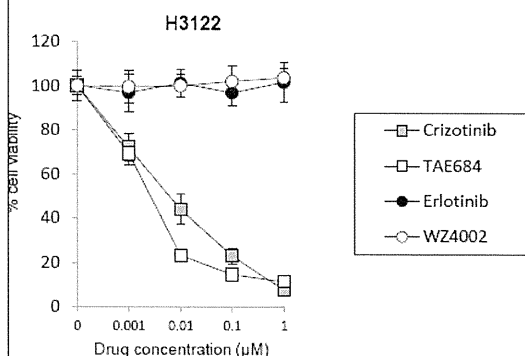


図 2

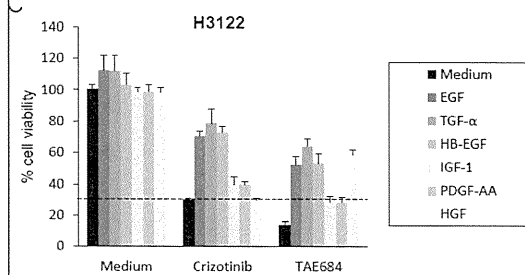
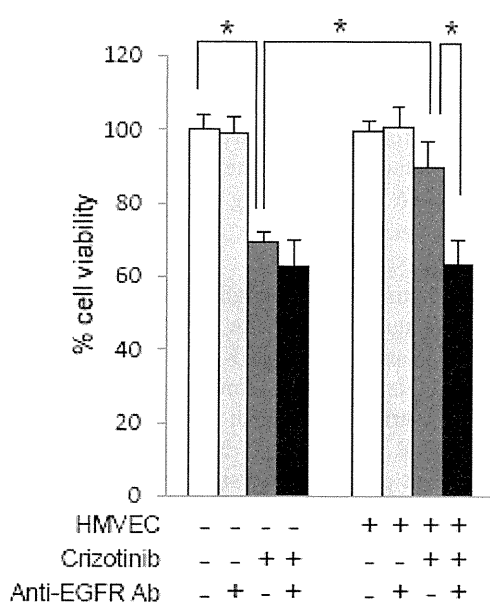


図 3



D. 考察

これらの結果は、宿主間質細胞との相互作用は癌細胞の ALK 阻害薬感受性において非常に重要な役割を果たしており、腫瘍血管が産生する液性因子が耐性克服の治療標的となることが示唆された。

E. 結論

宿主間質細胞との相互作用は癌細胞の ALK 阻害薬感受性において非常に重要な役割を果たしており、腫瘍血管が産生する液性因子が耐性克服の治療標的となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Yano S. Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor-resistance in EML4-ALK lung cancer cells. **Clin Cancer Res** (査読有) 2012 May 2. [Epub ahead of print].
2. Yano S, Takeuchi S, Nakagawa T, Yamada T. Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of HGF and EGFR ligands. **Cancer Sci** (査読有) 2012 Mar 21. [Epub ahead of print].

3. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S. E7050, a Met kinase inhibitor, reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer cells. **Clin Cancer Res** (査読有) 2012;18:1663-71.
 4. Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Yano S. Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis. **J Thorac Oncol** (査読有) in press.
 5. Uramoto T, Yano S, Tanaka F. T790M is associated with a favorable prognosis in Japanese patients treated with an EGFR-TKI. **Lung Cancer** (査読有) 2012 ;76: 129-30.
 6. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer. **J Thorac Oncol** (査読有) 2012; 7:272-80.
 7. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto U, Yasumoto Y, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. **J Thorac Oncol** (査読有) 2011; 6:2011-7.
 8. Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K. Reaction of plasma hepatocyte growth factor level in lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. **Int J Cancer** (査読有) 2011;126: 1410-6.
 9. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** (査読有) 2011 ; 17:2260-9.
 10. Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Takeuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K, Yano S. The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXCR4-expressing gastric cancer. **Clin Cancer Res** (査読有) 2011;17:3619-30.
 11. Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung Van The, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, Sone S. E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. **Mol Cancer Ther** (査読有) 2011;10:1218 -28.
 12. Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yano S. Pleural mesothelioma instigates tumor associated fibroblasts to promote progression via malignant cytokine network. **Am J Pathol** (査読有) 2011; 179:1483-93.
 13. Yamada T, Bando H, Takeuchi S, Kita K, Li Q, Wang W, Akinaga S, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 antibody against multiple organ metastasis produced by GM2 expressing small cell lung cancer. **Cancer Sci** (査読有) 2011; 102:2157- 63.
2. 学会発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
（分担）研究報告書

BMP9を標的とした腫瘍血管新生制御に関する研究

研究分担者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨 骨形成因子(BMP)9が属するTGF- β ファミリーのメンバーであるTGF- β 2が内皮間葉移行を介してがん関連線維芽細胞の形成を誘導する新規の分子機構を明らかにした。TGF- β 2シグナルを標的としたがんの治療を行うための新たな方法の開発が期待される。

A. 研究目的

BMP9が属するTGF- β ファミリーのメンバーであるTGF- β 2は内皮間葉移行を介してがん関連線維芽細胞の形成を誘導することが示されているため、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

膵臓癌由来のMS1血管内皮細胞を用いて内皮間葉移行を観察し、分子生物学的・生化学的手法を用いて、その分子機構を解明した。

（倫理面への配慮）

ヒトの遺伝子解析ならびに相手方の同意を得る研究は含まれていない。

C. 研究結果

MS1血管内皮細胞にTGF- β 2を加えたところ内皮間葉移行が観察された。また阻害剤ならびにsiRNAを用いた解析により、RhoシグナルならびにMRTF転写因子が重要な役割を果たしていることが示された。

D. 考察

内皮間葉移行はがんの進行させるがん関連線維芽細胞の形成を誘導することが知られているが、その分子機序として新たなシグナル経路と転写因子の関与が本研究により明らかになったことはがん治療法の開発において意義が大きい。

E. 結論

TGF- β 2はRhoシグナルとMRTF転写因子を介して内皮間葉移行を誘導した。これらのシグナルは新たながん治療法のための標的として期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, Watabe T. (2012) TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *Journal of Biochemistry*. 151: 145-156.

2. 学会発表

渡部徹郎
Roles of TGF- β -superfamily signals during formation of blood and lymphatic vessels from embryonic stem cells 第19回日本血管生物医学会（東京）2011年12月8～10日（シンポジウム）

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
（分担）研究報告書

リンパ管新生に関わるLYVE-1のプロセッシングに関する研究

研究分担者 平川 聡史 浜松医科大学医学部皮膚科学講座・准教授

研究要旨 ヒアルロン酸受容体LYVE-1は、VEGF-Aによりectodomain sheddingを受ける。このプロセスは、ヒアルロン酸に対するリンパ管内皮細胞の接着を解除し、細胞遊走を誘導することにより、リンパ管新生が促進されることを示唆するものである。

A. 研究目的

ヒアルロン酸受容体LYVE-1が、VEGF-Aシグナルによりectodomain sheddingを受け、このプロセスがリンパ管新生における細胞遊走に関わることを同定する。

B. 研究方法

切断型及び非切断型LYVE-1を発現するアデノウイルスベクターを作成し、トランスウェルを用いた細胞遊走試験を行う。使用する細胞はヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞である。試験は、VEGF-A存在下あるいは非存在下で行う。細胞外マトリックスにはヒアルロン酸を用いる。

（倫理面への配慮）
組換えDNA実験委員会の承認に基づく。

C. 研究結果

VEGF-A刺激は、1. LYVE-1のectodomain sheddingを誘導する、2. ヒアルロン酸を細胞外マトリックスとする細胞遊走を促進する。3. 切断型LYVE-1発現時に見られた細胞遊走は、非切断型LYVE-1を発現することをにより抑制される。以上より、LYVE-1のectodomain sheddingが、リンパ管内皮細胞の遊走を促進することが示唆される。

D. 考察

リンパ管新生のプロセスにおいて、増殖因子とリンパ管内皮細胞の遊走は不可欠である。本研究は、VEGF-Aによるリンパ管新生の分子機構の一端を明らかにするものである。

E. 結論

LYVE-1のectodomain sheddingは、VEGF-A存在下で、リンパ管内皮細胞の遊走を促進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okazaki H et al. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultra-violet B. *J Dermatol.* 2012; 39:366-74.

2. 学会発表

Hirakawa S. Pathological lymphangiogenesis requires VEGF-A for endothelial proliferation and migration. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology. Busan, South Korea. August 25-26, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特許願
国立大学法人浜松医科大学
識別番号：504300181
発明等の名称：マイクロニードルアレイ装置

2. 実用新案登録

なし。

3. その他 なし。

腫瘍血管の安定化に関する研究

研究分担者 望月直樹 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨

腫瘍細胞と腫瘍血管におけるSHP2の増殖制御機構について検討した。Hepatocyto growth factor、VEGF刺激による乳腺細胞、内皮細胞の増殖が、EphA2受容体によるSHP2のカルボキシ末端のリン酸化によってErkが活性化されることが重要であることを突き止めた。

A. 研究目的

腫瘍血管は、血管の脆弱性のために抗腫瘍薬が血流にしたがって腫瘍まで到達しないという弱点がある。また、リンパ管内皮への腫瘍の浸潤が容易に起きやすくするリンパ管の細胞情報伝達系によりリンパ節転移が容易に生じることも臨床的には特に問題となっている。本研究では、血管内皮細胞の透過性調節機構と内皮細胞の安定化機構を解明する。さらに腫瘍血管安定化による癌治療の至適化を目指した向血管薬の開発に資する研究を目指す。本年度は、腫瘍の増殖を促進するSrc homology 2-containing tyrosine phosphatase (SHP2)の腫瘍の増殖メカニズムと血管内皮細胞の増殖メカニズムを検討した。

B. 研究方法

- ・ 乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞は、通常のDMEM/10%FCSで培養した。HEK293細胞も同mediumで培養した。
- ・ 血管内皮細胞培養
HUMEDIA-EG2(クラボウ)培養液で、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を維持してこれを使用した。
- ・ Immunoblotの抗体は、anti-phosphoERK < anti-Erk, anti-EphA2, anti-SHP2, anti-phospho Tyrosin, anti-phospho Tyr542 (SHP2) anti-phospho Tyr580 (SHP2) を用いた。
- ・ Hepatocyto growth factor (HGF)によるNMuMG細胞、Vascular endothelial growth factor (VEGF)によるHUVEC細胞の刺激は血清飢餓6時間後に行った。
- ・ 細胞へのplasmidのtransfectionは、Lipofectamin 2000を用いた。

- (1) NMuMG細胞をHGF刺激した際の、Erkのリン酸化の時間経過を調べた
- (2) HUVEC細胞をVEGF刺激した際のErkのリン酸化の時間経過を調べた。
- (3) EphA2によるSHP2のリン酸化を検討した。
- (4) SHP2の非リン酸化変異体SH2P2-Y542/580Fによる増殖因子刺激依存性のErkのリン酸化への効果の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト臨床サンプルは用いていない。DNAの変異体作製などの遺伝子組換え実験の申請を行い承認後に実施した(承認番号11-36-2)。

C. 研究結果

- (1) HGF刺激によるNMuMG細胞のERKの活性化はEphA2-SHP2依存的
NMuMG細胞をHGFで刺激してErkの活性化を時間経過で調べたところ刺激後5-10分で活性化のPEAKがあり、150分まで活性化を認めた。しかし、SHP2をノックダウンすると、この持続的なErkの活性化は減弱した。また、EphA2をノックダウンしても同様に、持続的なErkの活性化が弱くなった。
- (2) HGF刺激でEphA2によるSHP2のリン酸化がErkの持続的活性化に不可欠
HGF刺激によって、SHP2のTyr542, Tyr580がリン酸化されるが、EphA2をノックダウンするとこの二つのTyr残基のリン酸化が低下することがわかった。またHEK293細胞を用いてEphA2とSHP2の過剰発現系でTyr542, 580のリン酸化を調べたところ、二つのアミノ酸の著明なリン酸化の増加を認めた。さらに、免疫沈降したEphA2を用いてGST-SHP2のリン酸化をin vitroで

調べたところ、Tyr542, Tyr580のリン酸化が亢進していた。以上から、EphA2が直接EphA2のTyr542/580のリン酸化を誘導することがわかった。

(3) VEGF 刺激による HUVEC の ERK の持続的リン酸化には SHP2 のリン酸化が重要 HUVEC を VEGF で刺激すると 3 分を PEAK にして 30 分まで ERK のリン酸化が観察できるが、EphA2 をノックダウンするとこの持続性の Erk の活性化は減弱した。

(4) SHP2 のフォスファターゼ活性は EphA2 による SHP2 リン酸化依存性の ERK の持続性活性化には不要である。

SHP2 は遺伝子変異体が LEOPARD 症候群の原因遺伝子 (SHP2-T468M) となることが知られている。しかし、この変異は、SHP2 のチロシンフォスファターゼ活性が消失している。SHP2 と EphA2 の共発現による Erk の活性化を比べたところ、野生型と比較して、SHP2-T468M 変異体と EphA2 の共発現のほうが、より ERK が活性化されることがわかった。これは、SHP2 の脱リン酸化活性非依存的に ERK のリン酸化に SHP2 が関わることを示している。

D. 考察

チロシンリン酸化は通常増殖に関しては促進的に作用するカスケードであり、SHP2 はこのチロシンの脱リン酸化酵素なので、抑制に機能すると考えられるが、反対に ERK 活性化に促進的に作用することが報告されていた。しかし、如何に SHP2 が ERK の活性化に関与するかは不明であった。

本研究により、growth factor 刺激依存性の細胞増殖のマーカーである ERK 持続的に活性化するためには、EphA2 による SHP2 のリン酸化が重要であることを突き止めた。従来から、SHP2 Tyr542, 580 のリン酸化がおきることは明らかにされていたが、どのキナーゼが重要であるかは不明であった。本研究により、EphA2 が SHP2 リン酸化キナーゼであることを示した。リン酸化 Ty542/Tyr580 には Grb2 が結合することが報告されており、Grb2/Sos を介した Ras の活性化、引き続く ERK の活性化がおきることが予想された。

乳腺細胞の増殖調節だけでなく、VEGF による ERK の持続活性にも SHP2 が関わることを証明できたことで、腫瘍細胞の増殖、ならびに腫瘍血管の新生のための内皮細胞の増殖に SHP2 が重要であることを示すことができた。

腫瘍の退縮のための一つの標的として、SHP2 が候補となりうると考えた。

E. 結論

SHP2 が EphA2 によりリン酸化されることが乳腺上皮細胞と血管内皮細胞の増殖に重要であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Wakayama Y, Miura K, Hisataka S, Mochizuki N. EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of MDCK cells by inactivating ezrin through negative regulation of RhoA. *J. Biol. Chem.* 286: 44243-53, 2011

(2) Minami M, Koyama T, Wakayama Y, Fukuhara S, Mochizuki N. EphrinA/EphA signal facilitates insulin-like growth factor-I-induced myogenic differentiation through suppression of the Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in myoblast cell lines. *Mol. Biol. Cell* 22:2,011508-3519, 2011

2. 学会発表

(1) Mochizuki N. Function of Spns2, a sphingosine 1-phosphate transporter, in zebrafish and mammals. The IInd Pacific Symposium on Vascular Biology. Oct30-Nov 2, 2011, Jeju Island Korea

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
平川聡史	がん転移とリンパ管ニッチ	須田年生	がん幹細胞	羊土社	東京	2011	167-172

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyashita H, Suzuki H, Ohkuchi A, Sato Y.	Mutual Balance between Vasohibin-1 and Soluble VEGFR-1 in Endothelial Cells.	Pharmaceuticals	4	1551-1577	2011
Sato Y.	The Vasohibin Family: Novel Regulators of Angiogenesis.	Vascular Pharmacology	Epub ahead of print		2012
Naito H. et al	Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels.	EMBO J.	31	842-855	2011
Naito H. et al	Changes in blood vessel maturation in the fibrous cap of the tumor rim.	Cancer Sci.	103	433-438	2011
Takakura N.	Role of intimate interactions between endothelial cells and the surrounding accessory cells in the maturation of blood vessels.	J Thromb Haemost.	9	144-150	2011
Sawane M. et al	Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function.	Am J Pathol.	179	2691-2697	2011
Yamakawa D. et al	2-Methoxycinnamaldehyde inhibits tumor angiogenesis by suppressing Tie2 activation.	Biochem Biophys Res Commun.	415	174-180	2011
Kajiya K. et al	Promotion of Lymphatic Integrity by Angiopoietin-1/Tie2 Signaling during Inflammation.	Am J Pathol.	180	1273-1282	2012

Takakura N.	Guest editorial: mutual relationship between vascular biology and hematology.	Int J Hematol.	95	117-118	2012
Takakura N.	Involvement of non-vascular stem cells in blood vessel formation.	Int J Hematol.	95	138-142	2012
Takakura N.	Formation and regulation of the cancer stem cell niche.	Cancer Sci.			In press
Sakimoto S. et al	A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice.	Development			In press
Kido H. et al	The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy.	Oncogene			In press
Muramatsu F. et al	microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin.	Oncogene			In press
Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Yano S.	Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor-resistance in EML4-ALK lung cancer cells.	Clin Cancer Res	Epub ahead of print		2012
Yano S, Takeuchi S, Nakagawa T, Yamada T.	Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of HGF and EGFR ligands.	Cancer Sci	Epub ahead of print		2012
Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S.	E7050, a Met kinase inhibitor, reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer cells.	Clin Cancer Res	18	1663-1671	2012

Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Yano S.	Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis.	J Thorac Oncol			In press
Uramoto T, Yano S, Tanaka F.	T790M is associated with a favorable prognosis in Japanese patients treated with an EGFR -TKI.	Lung Cancer	76	129-130	2012
Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S.	Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer.	J Thorac Oncol	7	272-280	2012
Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto U, Yasumoto Y, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M.	Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort.	J Thorac Oncol	6	2011-2017	2011
Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K.	Reaction of plasma hepatocyte growth factor level in lung cancer patients treated with EGFR-TKIs.	Int J Cancer	126	1410-1416	2011

Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, <u>Yano S.</u>	Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer.	Clin Cancer Res	17	2260-2269	2011
Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Takeuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K, <u>Yano S.</u>	The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXC R4-expressing gastric cancer.	Clin Cancer Res	17	3619-3630	2011
Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung Van The, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, <u>Yano S.</u> Nishioka Y, Sone S.	E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor.	Mol Cancer Ther	10	2128-1228	2011
Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, <u>Yano S.</u>	Pleural mesothelioma instigates tumor associated fibroblasts to promote progression via malignant cytokine network.	Am J Pathol	179	1483-1493	2011
Yamada T, Bando H, Takeuchi S, Kita K, Li Q, Wang W, Akinaga S, Nishioka Y, Sone S, <u>Yano S.</u>	Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 antibody against multiple organ metastasis produced by GM2 expressing small cell lung cancer.	Cancer Sci	102	2157-2163	2011
Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, Watabe T.	TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A.	Journal of Biochemistry	151	145-156	2012

Okazaki H et al.	Targeted overexpression of Angptl6 in response to UVB.	J Dermatol.	39	366-374	2012
Aoi J et al.	Angptl2 in carcinogenesis and metastasis.	Cancer Res.	71	7502-7512	2011
Kerjaschki D et al.	Lipoxygenase mediates metastasis.	J Clin Invest.	121	2000-2012	2011
Wakayama Y, Miura K, Hisataka S, Mochizuki N.	EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of MDCK cells by inactivating ezrin through negative regulation of RhoA.	J. Biol. Chem.	286	44243-44253	2011
Minami M, Koyama T, Wakayama Y, Fukuhara S, Mochizuki N.	EphrinA/EphA signal facilitates insulin-like growth factor-I-induced myogenic differentiation through suppression of the Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in myoblast cell lines.	Mol. Biol. Cell	22:2	011508-3519	2011

Article

Mutual Balance between Vasohibin-1 and Soluble VEGFR-1 in Endothelial Cells

Hiroki Miyashita ¹, Hirotada Suzuki ^{1,2}, Akihide Ohkuchi ² and Yasufumi Sato ^{1,*}

¹ Department of Vascular Biology, Institute of Development Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

² Department of Obstetrics and Gynecology, Jichi Medical University School of Medicine, Japan

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: y-sato@idac.tohoku.ac.jp; Tel.: +81-22-717-8528; Fax: +81-22-717-8533.

Received: 25 April 2011; in revised form: 23 May 2011 / Accepted: 30 May 2011 /

Published: 31 May 2011

Abstract: Vasohibin-1 (VASH1) is a VEGF-inducible gene of endothelial cells (ECs) that acts as a negative feedback regulator of angiogenesis. To further characterize the function of VASH1, we transfected human VASH1 gene into the mouse EC line MS1, established stable VASH1 expressing clones, and determined gene alteration by cDNA microarray analysis. Among the various angiogenesis-related genes, vascular endothelial growth factor type 1 receptor (VEGFR-1) and its alternative spliced form, soluble VEGFR1 (sVEGFR-1), were found to be the most significantly down-regulated genes. Transient overexpression of VASH1 in human umbilical vein endothelial cells confirmed the down-regulation of VEGFR-1 and sVEGFR-1. sVEGFR-1 is a decoy receptor for VEGF and inhibits angiogenesis. Interestingly, when sVEGFR-1 was overexpressed in ECs, it inhibited the expression of VASH1 in turn. These results suggest that VASH1 and sVEGFR-1, two angiogenesis inhibitors, mutually balance their expressions in ECs.

Keywords: angiogenesis inhibitor; endothelial cell; VASH1; sVEGFR-1

1. Introduction

Angiogenesis, the formation of neovessels, is involved in both physiological and pathological conditions. Angiogenesis is regulated by a local balance between stimulators and inhibitors. Angiogenesis stimulators include vascular endothelial growth factor (VEGF), whereas angiogenesis inhibitors include

thrombospondins, pigment epithelium derived factor, angiostatin, endostatin, and so forth [1].

The VEGF family consists of five members; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and placenta growth factor (PlGF). There are also three VEGF receptor (VEGFR) tyrosine kinases; VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3. Members of the VEGF family show different affinities for the receptors. VEGFR-1 is able to bind VEGF-A, VEGF-B and PlGF. VEGFR-2 is activated primarily by VEGF-A, but cleaved forms of VEGF-C and VEGF-D can also activate VEGFR-2. VEGFR-3 is activated by VEGF-C and VEGF-D. Vascular endothelial cells (ECs) express mainly VEGFR-1 and VEGFR-2, whereas lymphatic ECs mainly express VEGFR-3 in adults. VEGFR-2 is the major mediator of VEGF-A driven responses for angiogenesis. The binding-affinity of VEGFR-1 for VEGF-A is one order of magnitude higher than that of VEGFR2, whereas the kinase activity of VEGFR-1 is about 10-fold weaker than that of VEGFR-2 [2]. *VEGFR-1* (-/-) mice died in utero because of overgrowth of ECs, but mice lacking the tyrosine kinase domain of VEGFR-1 remain healthy and have a normal vasculature [3,4]. Thus, the ligand binding domain of VEGFR-1 are sufficient for normal vascular development in embryo, most likely by sequestering VEGF-A from VEGFR-2.

We recently isolated vasohibin-1 (VASH1) from VEGF-A inducible genes in ECs that inhibits migration and proliferation of ECs in culture, and exhibits anti-angiogenic activity *in vivo* [5]. The expression of VASH1 in ECs is induced not only by VEGF-A but also by fibroblast growth factor 2 (FGF-2), another potent angiogenic factor [5,6]. Thus, VASH1 is thought to be a negative-feedback regulator of angiogenesis. Immunohistochemical analysis revealed that VASH1 protein is expressed selectively in ECs in the developing human or mouse embryo, is reduced in expression in the post-neonate, but is induced in ECs at the site of angiogenesis [7]. Analysis of the spatiotemporal expression and function of VASH1 during angiogenesis revealed that VASH1 is expressed not in ECs at the sprouting front but in ECs of newly formed blood vessels behind the sprouting front where angiogenesis is terminated [8]. The expression of VASH1 is evident in various pathological processes such as cancers [9-13], atherosclerosis [14], age-dependent macular degeneration (AMD) [15], diabetic retinopathy [16], and so forth. Moreover, when applied exogenously, VASH1 shows anti-angiogenic activity under various pathological conditions such as in tumors, arterial intimal thickening and retinal neovascularization [9,14,17]. However, the molecular mechanisms underlying angiogenesis inhibition by VASH1 remain to be characterized. Here we intended to characterize the target genes of VASH1 in ECs. Using cDNA microarray analysis of stable VASH1 expressing EC clones, we identified both full-length and soluble forms of VEGFR-1 as the target genes of VASH1 in ECs.

2. Materials and Methods

2.1. Cells

MS1, an immortalized cell line with a SV40 large T antigen from mouse pancreatic ECs [18], was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells were cultured in α MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, JRHBiosciences, San Antonio, TX, USA). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from KURABO (Osaka, Japan) and were cultured on type I collagen-coated dishes (IWAKI,

Tokyo, Japan) containing endothelial basal medium-2 (EBM-2; Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) supplemented with EC growth supplements and 2% FBS.

2.2. Establishment of VASH1 Expressing MS1 Clones

To improve the activity of transcription, we placed the CMV promoter of the pcDNA3.1/Hygro plasmid (Invitrogen) with the chicken β -actin promoter derived from pCALL2 [19]. This vector, pCALL2-pcDNA3.1/Hygro, was used for the transfection in this study. For the production of the VASH1 expression vector, the human VASH1 gene (5481 bp) containing the complete open reading frame (386 n.t.-1483 n.t.) [5] was cloned into the pCALL2-pcDNA3.1/Hygro vector at multiple cloning sites (Xho-I and Not-I). MS1 cells were transfected with the VASH1 expression vector by using Effectene transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. After the transfection, the cells were selected by hygromycin (500 μ g/mL, Invitrogen). Following the selection, the cells were seeded at 0.3 cells per well in 96 well plates with 100 μ L of culture medium in each well. The cells were later expanded into larger wells.

2.3. Gene Transfer in HUVECs

A replication-defective adenovirus vector encoding the human VASH1 (AdVASH1) or the β -gal gene (AdLacZ) was prepared as described previously [5]. The replication-defective adenovirus vector encoding the human VEGFR-1 gene (AdVEGFR-1) was a generous gift from Masabumi Shibuya (Tokyo Medical and Dental University). The HUVECs were infected with the adenovirus vectors at a multiplicity of infection (MOI) of 10 to 100. After the infection, RNAs and proteins were extracted at 24 and 36 hours, respectively.

2.4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted by the acid guanidinium-phenol-chloroform method using ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan). RT-PCR was performed by using a one step RT-PCR kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The following primer pairs were synthesized and used for amplification: the respective sense (S) and the antisense (AS) primer pairs used were as follows: mouse and human VASH1, 5'-ATGGACCTGGCCAAGGAAAT-3' and 5'-CATCCTTCTTCCGGTCTTG-3'; mouse VEGFR-1, 5'-GCGCATGACGGTCATAGAAG-3' and 5'-CAGGTGTGGCGCTTCCGAAT-3'; human VEGFR-1, 5'-ATGGTCAGCTACTGGGACAC-3' and 5'-GAATGACGAGCTCCCTTCCTT-3'; mouse sVEGFR-1, 5'-ACTCTCAGACCCCTGGAATC-3' and 5'-GATCCGAGAGAAATGGCCT-3'; human sVEGFR-1, 5'-CATCACTCAGCGCATGGCAA-3' and 5'-CAGCCTTTTTGTTGCGTGC-3'; mouse and human G3PDH, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. The PCR consisted of 27 cycles of 94 °C for 15 s, at 58 °C for 30 s, and finally at 68 °C for 30 s. The PCR products were electrophoresed through a 2% agarose gel containing 0.5 mg/mL ethidium bromide and visualized.

2.5. Western Blot Analysis

Western blot analysis was performed as described previously [20]. Briefly, extracted protein was separated by SDS-PAGE on a 7.5-10% separating gel and transferred to a Hybond-ECL membrane