

201220007A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 靖史

平成25（2013）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. 腫瘍血管成熟化に関する研究	-----	3
高倉伸幸		
2. 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	-----	4
矢野聖二		
3. 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	-----	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

VASH2 の siRNA を腫瘍局所投与することで、腫瘍血管新生と腫瘍発育が抑制できることを、マウスのがん細胞移植実験で証明した。また、がん細胞の VASH2 発現を shRNA でノックダウンすることで、がん細胞の上皮間葉転換が制御できることを明らかにした。

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

当該研究者が発見した vasohibin ファミリー分子のうち、特になん細胞が発現する VASH2 についての研究を進め、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を目的とした。

B. 研究方法

がん細胞を皮下移植し、腫瘍生着を確認後、VASH2 の siRNA をアテロコラーゲンに混入して腫瘍周囲に局注し、腫瘍の発育と血管新生に与える影響を経時的に観察した。

培養がん細胞の VASH2 発現を shRNA によって安定的にノックダウンし、特に上皮間葉転換に関わる特性の変化をコントロールの shRNA で処理したものと比較した。

（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った。

C. 研究結果

VASH2 の siRNA を腫瘍周囲に局所投与することで、VASH2 mRNA の発現は約半分程度に減少できることを確認した。この条件において腫瘍発育は有意に抑制さ

れ、組織学的解析で腫瘍血管新生が抑制されていることを確認した。

培養がん細胞の VASH2 発現をノックダウンすることで E-カドヘリンの発現が顕著に上昇すると共に、細胞遊走能、細胞浸潤能が有意に低下した。

D. 考察

siRNA の腫瘍局所投与の効果からがん治療の分子標的として VASH2 が適当であると考えられる。また、VASH2 は周囲の血管に対してパラクリン的に作用して血管新生を促進するだけでなく、がん細胞自身にオートクリン的に作用して上皮間葉転換を惹起すると考えられる。

E. 結論

がん細胞の産生する VASH2 は、がんの上皮間葉転換を惹起するとともに腫瘍血管新生を促進する機能を待っており、がん治療の分子標的となる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato Y. The Vasohibin Family: Novel Regulators of Angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 56, 262-266, 2012.

Watanabe T, Okada Y, Hoshikawa Y, Eba S, Notsuda H, Watanabe Y, Ohishi H, Sato Y, Kondo T. A Potent Anti-angiogenic Factor, Vasohibin-1, Ameliorates Experimental Bronchiolitis Obliterans. *Transplant Proc.* 44: 1155-1157, 2012.

Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. Clin Cancer Res. 18, 4145-4153, 2012.

Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Kanomata N, Moriya T, Suzuki M, Sato Y. Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis. Mol. Cancer Res. 10, 1135-1146, 2012.

Miyashita H, Watanabe T, Hayashi H, Suzuki Y, Nakamura T, Ito S, Ono M, Hoshikawa Y, Okada Y, Kondo T, Sato Y. Angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1. PLoS One 7, e46459, 2012.

Sato Y. The Vasohibin Family: A Novel Family for Angiogenesis Regulation. J Biochem. 153, 5-11. 2013.

Xue X, Gao W, Sun B, Xu Y, Han B, Wang F, Zhang Y, Sun J, Wei J, Lu Z, Zhu Y, Sato Y, Sekido Y, Miao Y, Kondo Y. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma. Oncogene. 32, 1724-1734, 2013.

Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, Suzuki Y, Suzuki M, Sato Y. Downregulation of vasohibin-2, a novel angiogenesis regulator, suppresses tumor growth by inhibiting angiogenesis in endometrial cancer cells. Oncol Lett. 5, 1058-1062, 2013.

Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, Suzuki T, Sato Y, Kondo T, Sasano H. Proliferation and maturation of intra-tumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. Human Pathol. 2013 [Epub ahead of print].

Kanomata N, Sato Y, Miyaji Y, Nagai A, Moriya T. Vasohibin-1 is a new predictor of disease-free survival in operated renal cell carcinoma patients. J. Clin. Pathol. 2013 [Epub ahead of print].

Kosaka T, Miyazaki Y, Miyajima A, Mikami S, Hayashi Y, Tanaka N, Nagata H, Kikuchi E, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer. Br J Cancer 2013 (in press).

2. 学会発表

Sato Y : The role of vasohibin family in tumor angiogenesis. 17th International Vascular Biology Meeting 2012. Wiesbaden, Germany, 2012.6.2-5.

Sato Y : The role of vasohibin family in tumor angiogenesis. AVBS 20th Annual Scientific Meeting 2012. Gold Coast, Australia, 2012.9.13-16.

佐藤靖史 : The role of vasohibin family in cancers. 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌, 2012.9.19-21.

伊藤想一、宮下浩輝、鈴木康弘、小林美穂、大内憲明、佐藤靖史 : 内因性 Vasohibin-1 は癌細胞の血管内侵入に対する血管内皮の抵抗性を維持し、転移を抑制する. 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌, 2012.9.19-21.

鈴木康弘、小柳貴裕、小林美穂、宮下浩輝、嵯峨泰、鈴木光明、佐藤靖史 : Regulation of VASH2 expression by miR-200 family and its role in cancer cells. 第 20 回日本血管生物医学学会学術集会, 徳島, 2012.12.5-7.

小柳貴裕、鈴木康弘、小林美穂、宮下浩輝、嵯峨泰、鈴木光明、佐藤靖史 : Development of a novel molecular-targeted therapy against vasohibin-2; Antitumor effect of siRNA and search for the active center of vasohibin-2. 第 20 回日本血管生物医学学会学術集会, 徳島, 2012.12.5-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
該当なし。

腫瘍血管成熟化に関する研究

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：Tie2は血管内皮細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼであり、血管成熟化に関与する。今回、Tie2が、大量のリガンド刺激に瞬時に反応できるように、内皮細胞上で常にリガンド非依存的に2量体を形成していることが判明した。

A. 研究目的

従来の研究で、腫瘍血管の成熟化により他のがん治療の効果があがることが判明してきた。この血管成熟化を担っているのが、内皮細胞に発現するTie2受容体であり壁細胞が分泌するアンジオポエチン-1 (Ang1) により活性化を受けると内皮-壁細胞接着が誘導され構造的に安定化する。しかし定常状態でのTie2の発現は詳細ではなく、Ang1非存在下でのTie2の発現について解析を試みた。

B. 研究方法

蛍光蛋白を2分割して、Tie2の細胞内領域のC末端にリンカーとともに連結し、蛍光蛋白の再構築により蛍光が回復するBiFC法を用いて、Tie2の2量体化を検討した。

（倫理面への配慮）

大阪大学の規定する種々の委員会において承認を受けた上で、研究を実施した。

C. 研究結果

BiFCの解析結果、Tie2はリガンド非依存的に、2量体を形成することが判明した。このAng1非依存的2量体の生物学的意義を解析するため、リガンド非依存的2量体化が誘導される領域を決定し、この変異体を用いた解析を行ったところ、Tie2のリガンド非依存的2量体化は大量のAng1に瞬時に対応してリン酸化されるために必要であることが判明した。

D. 考察

腫瘍内の血管は未成熟である。腫瘍血管内皮細胞のTie2の2量体化状態がどのように制御されているかの解析が必要と考えられた。

E. 結論

Tie2は内皮細胞上で常にリガンド非依存的に2量体を形成している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Naito H, Takakura N.

Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose Angiotensin-1. *J Biol Chem* inpress (他13報)

2. 学会発表

Takakura N. Requirement of endothelial stem-like cells and Tie2-APJ axis for mature blood vessel formation.

IVBM2012 June 3, 2012 Germany (他6件)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

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

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

上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)であるゲフィチニブおよびエルロチニブは、EGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌(NSCLC)に奏効性が高い。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。われわれは、HGF（肝細胞増殖因子）がEGFR変異肺癌においてMet/Gab1/PI3Kシグナルを活性化しEGFRチロシンキナーゼ阻害薬（TKI）耐性を誘導することを報告してきた。今年度は、HGFがMet/Gab1を介してEGFR変異肺癌のVEGF産生を刺激し、血管新生を促進することで相乗的にEGFR-TKI耐性を誘導していることを新たに見出した。さらに、MetとVEGFR2の阻害活性を有する薬剤(E7050)ががん細胞からのVEGF産生を抑制するのみならず直接血管内皮の増殖を抑制することで協力に血管新生を阻害し、HGFによるEGFR-TKI耐性を効果的に制御しうることを明らかにした。

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、上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)であるゲフィチニブやエルロチニブはEGFR遺伝子変異を有する肺癌患者群に延命効果を有することが示された。しかし、著効症例においてもその大半が1年程度で獲得耐性を生じ再燃する（獲得耐性）ことが臨床上的大きな問題となっている。

著者らは、肝細胞増殖因子(HGF)がその受容体であるMETチロシンキナーゼの活性化を介して、EGFRやERBB3とは独立にPI3K/Akt経路を活性化することにより、EGFR活性型変異を有する肺腺がん株のゲフィチニブ耐性を誘導する新たな機構を明らかにした。一方、HGFは血管新生促進作用も有することが知られている。また、血管新生に関与する代表的受容体であるVEGFR-2とHGFの受容体であるMETの下流にはPI3Kが存在し、治療標的として近年注目されている。

そこで、本研究ではEGFR変異肺癌におけるHGFによる血管新生促進作用に着目し、*in vitro* および *in vivo* モデルにおいてMetおよびVEGFR阻害薬の治療効果を検討した。

B. 研究方法

EGFR遺伝子変異(Exon 19の欠失)を有する肺癌細胞株としてPC-9とMa-1を用いた。HGFを高産生する線維芽細胞としてMRC-5を用いた。Met/VEGFR阻害薬としてE7050（エーザイ）を、抗VEGF抗体としてベバシズマブを用いた。HGFによるゲフィチニブ耐性における阻害薬の効果をMTT法で検討した。阻害薬のがん細胞内シグナル伝達における効果をWestern blotで解析した。

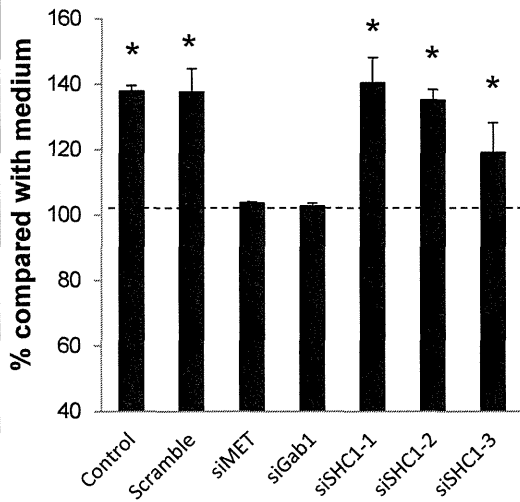
（倫理面への配慮）

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

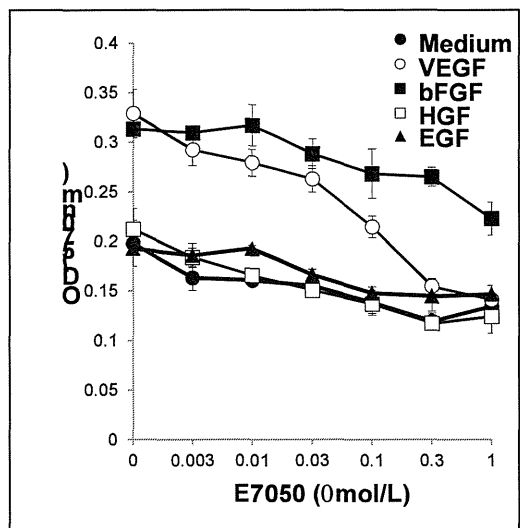
ゲフィチニブは用量依存的に肺癌細胞株PC-9とMa-1の増殖を抑制した。HGFはゲフィチニブに対しては耐性を誘導したが、E7050を併用することにより耐性が解除された。ヒトHGF遺伝子を導入したMa-1/HGFはHGFを高産生し、ゲフィチニブに耐性を示した。ゲフィチニブとE7050を併用することで、Ma-1/HGFのゲフィチニブ感受性が回復した。Western blotによる解析より、E7050はHGFによるMetのリン酸化を阻害し、ゲフィチニブ感受性を回復させることが明らかとなった。

図1 EGFR 変異肺がん細胞における HGF による VEGF 産生増強効果: Met/Gab1 siRNA による阻害



つぎに、HGF による Ma-1 の血管新生因子発現を検討した。HGF は Met/Gab1 経路を活性化し、VEGF 産生を増強した (図1)。E7050 は Met のリン酸化を阻害し、HGF による VEGF 発現促進作用を阻害した。以上より、HGF は、EGFR 変異肺がんにおいて、EGFR-TKI 耐性を誘導するのみならず血管新生も促進することが示唆された。

図2 E7050 による VEGF 刺激下での血管内皮細胞増殖抑制効果



一方、E7050 は VEGFR2 のリン酸化阻害活性も併せ持っており、血管内皮細胞における VEGF による増殖を阻害した (図2)。

D. 考察

今回の HGF は、EGFR 変異肺がんにおいて、EGFR-TKI 耐性を誘導するのみならず血管新生も促進することで、腫瘍進展を促進していることが示唆された。さらに、Met と VEGFR2 の阻害活性を有する E7050 が HGF による EGFR-TKI 耐性シグナルを阻害し薬剤耐性を解除するとともに、血管新生も阻害して EGFR-TKI 耐性腫瘍の増殖を阻害しうるということが明らかになったため、今後はこの成果をがん患者に還元できるよう、製薬企業に臨床試験を進めるように働きかける予定である。

E. 結論

宿主から産生される HGF は、分子標的薬耐性を誘導するのみならず血管新生も促進しているため、EGFR 変異肺がんの新たな治療標的になることが示唆された。

F. 研究発表

- 論文発表 (計 11 件)
 - Ishikawa D, Takeuchi S, Nakagawa T, Sano T, Junya Nakade, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Nakamura T, Matsumoto K, Kakumu H, Yoshizawa H, **Yano S.** mTOR inhibitors control erlotinib-resistance of EGFR mutant lung cancer cells triggered by HGF. **PLOS ONE**, In press.
 - Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, **Yano S.** Novel PI3K-mTOR inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib-resistance of EGFR mutant lung cancer cells triggering by HGF. **Int J Cancer**, 2013 Jan 15. doi: 10.1002/ijc.28034. [Epub ahead of print]
 - Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, **Yano S.** Scaffold Ak1, a novel therapeutic target for lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. **Oncogene**, 2012 Oct 8 [Epub ahead of print].

4. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, Ishikawa D, Sato M, Hasegawa Y, Sekido Y, **Yano S**. EGFR-TKI resistance due to *BIM* polymorphism can be circumvented by in combination with HDAC inhibition. **Cancer Res**, 2013 73:2428-34.
 5. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, **Yano S**. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in *EGFR* mutant lung cancer. **Am J Pathol**, 2012; 181:1034-43.
 6. 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**, 2012; 18:3592-602.
 7. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, **Yano S**. Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor to overcome erlotinib resistance in *EGFR* mutant lung cancer. **Mol Cancer Ther**, 2012 11:2149-57.
 8. Ohtsubo K, Watanabe H, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, **Yano S**. Endoscopic findings of upper gastrointestinal lesions in patients with pancreatic cancer. **JOP** 2012;13:420-6.
 9. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Takata M, Sako T, Yamaguchi K, Kinoshita N, Watanabe M, Touge H, Makino H, Igishi T, Hamada H, **Yano S**, Shimizu E. Therapeutic antitumor efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody, cetuximab, against malignant pleural mesothelioma. **Int J Oncol**. 2012; 41:1610-8.
 10. Uramoto H, Yamada T, **Yano S**, Kondo N, Hasegawa S, Tanaka F. Prognostic value of acquired resistance-related molecules in Japanese patients with NSCLC treated with an EGFR-TKI. **Anticancer Res**. 2012;32:3785-90.
 11. Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, **Yano S**, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y. Surfactant protein a suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. **Am J Pathol**. 2013 Mar 14. [Epub ahead of print]
2. 学会発表 (計 4 件)
- (1) **Seiji Yano**. (発表標題) Strategy to treat EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference(APLCC). November 26-28, 2012. (Fukuoka)
 - (2) **Seiji Yano**. (発表標題) Ligand-stimulated receptor activation as novel targets to overcome resistance to molecular targeted drugs in lung cancer. 第71回日本がん学会学術集会. September 19-21, 2012. (Hokkaido)
 - (3) **Seiji Yano**. (発表標題) Molecular mechanisms of EGFR-TKI resistance and strategy with HGF-Met inhibitors to overcome the resistance. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会. July 26-28, 2012. (Kyoto)
 - (4) **Seiji Yano**. (発表標題) Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor-resistance in EML4-ALK lung cancer cells. AACR Molecularly Targeted Therapies: Mechanisms of Resistance Conference. May 9-12, 2012. San Diego, (USA)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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

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 腫瘍血管内皮細胞はがん微小環境内のTGF- β 活性によって内皮間葉移行(EndMT)を起こし、がん関連線維芽細胞(CAF)へと分化してがんの進展が誘導される。我々はこのEndMTがFGFシグナルにより抑制されることを見出した。

A. 研究目的

がんの進展におけるがん関連線維芽細胞(CAF)の役割に注目が集まっているが、CAFの起源として近年腫瘍血管内皮細胞の内皮間葉移行(EndMT)に注目が集まっている。

我々は以前TGF- β がEndMTを誘導することを見出したが、EndMTを抑制しCAFの生成を阻害するシグナルの探索を試みた。

B. 研究方法

マウスの腫瘍から調製した腫瘍血管内皮細胞を用いてTGF- β によるEndMTの誘導を抑制する因子をスクリーニングした。

(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

12種類のサイトカインや低分子化合物の中でFGFとそのシグナル阻害剤がTGF- β によるEndMTの誘導をそれぞれ抑制そして亢進した。

D. 考察

腫瘍血管内皮細胞がFGFを発現しているという報告がある。腫瘍血管がTGF- β が豊富にあるがん微小環境においてその状態を維持できるのは内因性のFGFシグナルによってEndMTが起こらないように抑制の機序が作用しているからかもしれない。

E. 結論

TGF- β によるEndMTはFGFシグナルにより抑制された。がん微小環境においてFGFシグナルを抑制することでCAFの生成を標的とした治療法の開発が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, **Watabe T**, Miyazono K. (2012) TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Biochemistry*. 151:205-216.

2. 学会発表

Watabe T, Kokudo T, Mihira H, Yoshimatsu Y, Miyazono K. Activation of Signaling and Transcriptional Networks during TGF- β -induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndMT).

The 17th International Vascular Biology Meeting

(Wiesbaden, Germany)

2012年6月2~5日

G. 知的財産権の出願・登録状況

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：毛細リンパ管に特異的に発現するヒアルロン酸受容体LYVE-1のプロセッシングを検討し、VEGF-Aによるectodomain sheddingを同定した。このプロセスは、ヒアルロン酸を基質とするリンパ管内皮細胞の遊走に重要な働きを持つことを見出した。

A. 研究目的

リンパ管新生のプロセスに、リンパ管内皮細胞特異的に発現するヒアルロン酸受容体LYVE-1が関わっていることを同定し、sheddingの分子機構とリンパ管新生に与える作用を解明する。

B. 研究方法

野生型及び変異型LYVE-1を発現するアデノウイルスベクターを構築し、ヒトリンパ管内皮細胞に感染後、VEGF-Aで刺激した。ヒアルロン酸に対する細胞遊走をトランスウェルチャンバーを用いて検討した。

（倫理面への配慮）

学内組織換えDNA実験委員会に研究計画を提出し、審査を受けた。

C. 研究結果

VEGF-Aがリンパ管内皮細胞の遊走を促進する上で、ヒアルロン酸の存在した場合はLYVE-1エクストドメイン・シェディングが必要であることが明らかになった。

D. 考察

リンパ管特異的分子LYVE-1が、培養条件ではリンパ管内皮細胞の遊走に関わることを見出した。VEGF-Aを始めとする血管・リンパ管新生因子は、膜蛋白の化学的変化を誘導し、リンパ管新生を促進することが示唆された。リンパ管新生は、癌リンパ行性転移を促進する一因子である。従って、本研究課題は、リンパ行性転移を抑制する治療基盤を創出する上で重要な治験を見出した。

E. 結論

VEGF-Aによる病的リンパ管新生は、リンパ管特異的因子LYVE-1を介して促進される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okazaki et al. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic enlargement in response to ultraviolet B. J Dermatol. 39: 366-374, 2012.

2. 学会発表

A functional role of LYVE-1 in VEGF-A-induced lymphangiogenesis and psoriasis.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願2013-034570. 山内豊彦（発明者）. 平成25年2月25日.

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。Hepatocyte 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。昨年までに、Shp2 のリン酸化とそれに引き続く Grb2 のリクルートが extracellular signal-regulated kinase (Erk) の持続的活性化に重要であることが示唆されたので最終年度は、その分子メカニズムの解明を行った。さらに、腫瘍組織を用いた免疫染色によって、Shp2 のリン酸化と Erk の活性化に関係があるか否かを検討した。

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。
・ 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。
・ Hepatocyte 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) EphA2 による SHP2 のリン酸化を検討した。
- (3) SHP2 の非リン酸化変異体 SHP2-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。
- (4) Grb2 以外にも Gab1 の Shp2 依存性の Erk の持続的活性化への関与も調べた。

・ヒト乳がん組織を病理解剖組織から入手して、この乳がん組織での Shp2 のリン酸化と Erk の活性化の関連について免疫組織学的検討を行った。

・LEOPARD 症候群、Noonan 症候群の変異が Shp2 にみられることから、この変異をもつ Shp2 の増殖シグナルにおける Shp2 の機能について、ゼブラフィッシュを用いて検討した。ゼブラフィッシュには、T468M Shp2 をインジェクションして、発生における Shp2 変異の影響を観察した。

（倫理面への配慮）

本研究ではヒト病理組織切片は、北海道大学医学系研究科病理講座（田中伸哉教授との共同研究）と行った。ヒト組織切片の利用にあたっては、北海道大学医学系研究科の承認を得た試料のみを利用した（同意書の取れている試料のみ）。DNA の変異体作製・ゼブラフィッシュを用いた検討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 12-33,34,25）。

C. 研究結果

(1) HGF 刺激による NMuMG 細胞の ERK の活性化は EphA2-SHP2 依存的かつ Grb2 依存的

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。このリン酸化部位に Grb2 がリクルートされることを免疫沈降で明らかにした。

(2) Grb2 だけではなく、Gab1 を介した Erk の持続的リン酸化経路がある。

HGF 依存性の持続性 Erk の活性化における Gab1 の機能についても、Gab1 の優勢劣性変異体を用いて調べた。Gab1 の優勢劣性変異体の発現により、HGF 依存性の Erk の活性化が一部低下することから Gab1 の関与が示唆された。

(3) ヒト乳がん組織では、Shp2Tyr580 のリン酸化と Erk のリン酸化がほとんど一致している。

ヒト乳がん症例（正常組織、ductal carcinoma in situ, invasive carcinoma）の3群に分けて、Shp2Tyr580 リン酸化抗体、Erk のリン酸化抗体による免疫染色を行って、その染色性について検討した。Invasive carcinoma, ductal carcinoma in situ ともに Erk のリン酸化と Shp2Tyr580 のリン酸化が認められた。一方正常組織では、両者の染色が認められなかった。

(4) Shp2 の T468M 変異(LEOPARD 症候群に見られる変異)では、持続的な Erk 活性化を認める。

Shp2T468M の変異 mRNA をインジェクションしたゼブラフィッシュ胚では、心臓周囲の浮腫を認めた。また、この浮腫は EphA2 をモルフォリンを用いてノックダウンすると軽減することから、EphA2 による Shp2 のリン酸化が病態形成に関わることが示唆された。また、Shp2T468M の変異体の発現により EphA2 の発現も亢進することから、positive regulation カスケードが機能して、EphA2-Shp2 系が増殖にかかわることが示唆された。

D. 考察

今年度の研究で、EphA2によるShp2のリン酸化がおきる病態での意義に迫ることが

できたと考える。これまで、Shp2がチロシン脱リン酸化酵素でありながら、細胞増殖系として機能する分子と考えられてきた。われわれは、Shp2がEphA2によってリン酸化され、Grb2のリクルート、Gab1の両者がSos/Ras系を活性化する可能性を示唆する結果を得た。

さらに、Shp2が実際増殖系シグナルとして病態に関与する可能性のある根拠として乳がん組織でのShp2Tyr580のリン酸化とErkのリン酸化が同時に観察されたことをあげることができる。さらにこの組織ではEphA2も染色されることから、癌組織におけるEphA2-Shp2-Erkの活性化が細胞増殖シグナルとして機能していることが強く考えられた。

また、LEOPARD 症候群変異体を発現するゼブラフィッシュにおいてもその異常な表現型がEphA2の発現抑制によって異常が軽減することから、EphA2-Shp2シグナルの個体での重要性がさらに確認できたと考える。

E. 結論

乳がん組織でもEphA2-Shp2-Erkシグナル伝達系が細胞増殖シグナルとして働いている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H, and Mochizuki N. Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. **Oncogene** (in press) 2012

2. 学会発表

Mochizuki N. Understanding of molecular mechanism underlying cardiovascular development by imaging of zebrafish embryos. 第90回日本生理学会大会、シンポジウム36「インビボサイエンスに迫る最新研究」

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	慢性炎症におけるリンパ管新生	佐藤靖史	血管新生研究の最先端	医薬ジャーナル社	東京	2012	6

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
Watanabe T, Okada Y, Hoshikawa Y, Eba S, Notsuda H, Watanabe Y, Ohishi H, <u>Sato Y</u> , Kondo T	A Potent Anti-angiogenic Factor, Vasohibin-1, Ameliorates Experimental Bronchiolitis Obliterans.	Transplant Proc.	44	1155-1157	2012
Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, <u>Sato Y</u> , Oya M	The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma.	Clin Cancer Res.	18	4145-4153	2012
Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Kanomata N, Moriya T, Suzuki M, <u>Sato Y</u>	Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis.	Mol. Cancer Res.	10	1135-1146	2012
Miyashita H, Watanabe T, Hayashi H, Suzuki Y, Nakamura T, Ito S, Ono M, Hoshikawa Y, Okada Y, Kondo T, <u>Sato Y</u>	Angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1.	PLoS One	7	E46459	2012
<u>Sato Y</u>	The Vasohibin Family: A Novel Family for Angiogenesis Regulation.	J Biochem.	153	5-11	2013

Xue X, Gao W, Sun B, Xu Y, Han B, Wang F, Zhang Y, Sun J, Wei J, Lu Z, Zhu Y, <u>Sato Y</u> , Sekido Y, Miao Y, Kondo Y	Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma.	Oncogene	32	1724-1734	2013
Koyanagi T, Saga Y, Takahashi Y, Suzuki Y, Suzuki M, <u>Sato Y</u>	Downregulation of vasohibin-2, a novel angiogenesis regulator, suppresses tumor growth by inhibiting angiogenesis in endometrial cancer cells.	Oncol Lett.	5	1058-1062	2013
Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, Suzuki T, <u>Sato Y</u> , Kondo T, Sasano H	Proliferation and maturation of intra-tumoral blood vessels in non-small cell lung cancer.	Human Pathol.	[Epub ahead of print]		2013
Kanomata N, <u>Sato Y</u> , Miyaji Y, Nagai A, Moriya T	Vasohibin-1 is a new predictor of disease-free survival in operated renal cell carcinoma patients.	J. Clin. Pathol.	[Epub ahead of print]		2013
Kosaka T, Miyazaki Y, Miyajima A, Mikami S, Hayashi Y, Tanaka N, Nagata H, Kikuchi E, Nakagawa K, Okada Y, <u>Sato Y</u> , Oya M	The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer.	Br J Cancer	[Epub ahead of print]		2013
Kinugasa Y et al	Monoclonal Antibody Selectively Recognizing Murine But Not Human CD44.	Hybridoma	31	262-266	2012
Kidoya H et al	Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation.	J Biochem	152	125-131	2012
Sakimoto S et al	A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice.	Development	139	1327-1335	2012
Kidoya H et al	The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy.	Oncogene	31	3254-3264	2012
Yoshioka K et al	Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function.	Nat Med	18	1560-1569	2012

Komada Y et al	Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells.	PLoS One	7	e46436	2012
Maruyama K et al	The Transcription Factor Jdp2 Controls Bone Homeostasis and Antibacterial Immunity by Regulating Osteoclast and Neutrophil Differentiation.	Immunity	37	1024-1036	2012
Muramatsu F et al	microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin.	Oncogene	32	414-421	2012
Satoh T et al	Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages.	Nature	495	524-528	2012
Sakimoto S et al	An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization.	PLoS One	8	e58096	2013
Yamakawa D et al	Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose Angiopoietin-1.	J Biol Chem	288	12469-12477	2013
Sawane M et al	Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity.	Diabetes			inpress
Matsui T et al	Possible role of mural cell covered mature blood vessels in inducing drug resistance in cancer-initiating cells.	Am J Pathol	182	1792-1799	2013
Jia W et al	Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors.	Am J Pathol	182	1821-1831	2013
Takeuchi S et al	Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in <i>EGFR</i> mutant lung cancer.	Am J Pathol	181	1034-43	2012
Yamada T et al	Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor-resistance in EML4-ALK lung cancer cells.	Clin Cancer Res	18	3592-602	2012

Nakagawa T et al	Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor to overcome erlotinib resistance in <i>EGFR</i> mutant lung cancer.	Mol Cancer Ther	11	2149-2157	2012
Ohtsubo K et al	Endoscopic findings of upper gastrointestinal lesions in patients with pancreatic cancer.	JOP	13	420-426	2012
Kurai J et al	Therapeutic antitumor efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody, cetuximab, against malignant pleural mesothelioma.	Int J Oncol	41	1610-1618	2012
Uramoto H et al	Prognostic value of aquired resistance-related molecules in Japanese patients with NSCLC treated with an EGFR-TKI.	Anticancer Res	32	3785-3790	2012
Ishikawa D et al	mTOR inhibitors control erlotinib-resistance of <i>EGFR</i> mutant lung cancer cells triggered by HGF.	PLOS ONE		In press	2013
Sano T et al	Novel PI3K-mTOR inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib-resistance of <i>EGFR</i> mutant lung cancer cells triggering by HGF.	Int J Cancer		In press	2013
Yamada T et al	Scaffold Aki1, a novel therapeutic target for lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations.	Oncogene		In press	2013
Nakagawa T et al	EGFR-TKI resistance due to <i>BIM</i> polymorphism can be circumvented by in combination with HDAC inhibition.	Cancer Res	73	2428-34	2013
Mitsuhashi A et al	Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages.	Am J Pathol	182	1844-1853	2013

Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, Miyazono K.	TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells.	Journal of Biochemistry.	151	205-216	2012
Okazaki et al.	Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic enlargement in response to ultraviolet B.	J Dermatol.	39	366-374	2012
Asai et al.	Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis.	Am J Pathol.	181	2217-2224	2012
Sasaki et al.	A palm-top-sized microfluidic cell culture system driven by a miniaturized infusion pump.	Electrophoresis	33	1729-1735	2012
Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H, Mochizuki N.	Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase.	Oncogene			2013 In press



A Potent Anti-angiogenic Factor, Vasohibin-1, Ameliorates Experimental Bronchiolitis Obliterans

T. Watanabe, Y. Okada, Y. Hoshikawa, S. Eba, H. Notsuda, Y. Watanabe, H. Ohishi, Y. Sato, and T. Kondo

ABSTRACT

Background. Bronchiolitis obliterans (BO) is a major cause of morbidity and mortality after lung transplantation. BO is pathologically characterized by neovascularized fibro-obliteration of the allograft airway. A recent study has shown that aberrant angiogenesis during fibro-obliteration contributes to the pathogenesis of BO. Vasohibin-1 (VASH1) has been isolated as a vascular endothelial growth factor-inducible gene in endothelial cells (ECs) that inhibits migration and proliferation of ECs and exhibits anti-angiogenic activity *in vivo*.

Purpose. This study examines whether VASH1 inhibits fibro-obliteration of the allograft in a murine intrapulmonary tracheal transplantation model.

Method. Tracheal allografts of BALB/c mouse were transplanted into the left lung of recipient C57BL/6J mouse. We performed gene transfer to the recipient lungs using an adenovirus vector encoding human VASH1 (Ad-VASH1) or beta-galactosidase (Ad-LacZ) as the control. Tracheal allografts were harvested and pathological on days 21 and 28.

Result. Ad-VASH1 treatment reduced the vascular area on day 21 (4.6% versus 13.0%, $P = .037$) and day 28 (5.4% versus 13.4%, $P = .022$) compared with the control group. This was accompanied by significantly inhibited luminal obliteration of the tracheal allografts in the animals transferred with Ad-VASH1 compared with the control (69% versus 93%, $P = .028$) on day 21. We were not able to observe this effect on day 28 (92% versus 97%, $P = .48$).

Conclusion. Transgene expression of VASH1 in the recipient lung significantly attenuated luminal obliteration of the tracheal allograft; this was associated with significantly reduced aberrant angiogenesis in the fibro-obliterative tissue in a murine model intrapulmonary tracheal transplantation.

BRONCHIOLITIS obliterans (BO) is a major obstacle to the long-term survival of lung transplant recipients. The clinical manifestation of BO, bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), develops in 50% of all lung transplant recipients and accounts for 30% of recipient death at 5 years after transplantation.¹ Although the mechanisms involved in the etiology of BO are not fully understood, it is generally accepted that it develops as a result of persistent immunological and inflammatory insults to the allograft airways that cause epithelial injury, granulation tissue formation, and, ultimately, fibro-obliteration of the airways.

Angiogenesis is the formation of new blood vessels; it plays a central role in the progression of various chronic inflammatory diseases including diabetic retinopathy, rheu-

From the Department of Thoracic Surgery (T.W., Y.O., Y.H., S.E., H.N., H.O., T.K.), and the Department of Vascular biology (T.W., Y.S.), Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan.

Address reprint requests to Yoshinori Okada, Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, Japan, 980-8575. E-mail: yokada@idac.tohoku.ac.jp

matoid arthritis, and pulmonary fibrosis.² These diseases are characterized by chronic inflammation and fibroproliferation associated with marked vascular remodeling. Although a number of studies have focused on angiogenesis in the development of these chronic inflammatory diseases, little attention has been paid to the role of angiogenesis in the process of BO. Recently, Belperio et al showed that the CXC chemokine receptor 2/CXC chemokine receptor 2 ligand biological axis is responsible for aberrant angiogenesis and supports the fibroproliferative process in human BOS and in a murine model of BO.³ This study proposes a novel therapeutic strategy designed to attenuate vascular remodeling to prevent BO after lung transplantation. No other studies focusing on modulation of vascular remodeling, however, have been reported in preventing or treating BO.

Vasohibin-1 (VASH1) has been isolated as a vascular endothelial growth factor-inducible gene from endothelial cells (ECs). VASH1 inhibits migration and proliferation of ECs in culture and exhibits a potent anti-angiogenic activity in vivo.^{4,5} We hypothesized that VASH1 may inhibit aberrant angiogenesis that supports the process of fibroproliferation observed in BO. The purpose of the present study is to examine whether VASH1 inhibits fibro-obliteration of the tracheal allografts in an experimental murine model of BO.

MATERIALS AND METHOD

Animals

Pathogen-free, 6- to 7-weeks-old male BALB/c (H2-d) and C57BL/6 (H-2b) mice were commercially obtained from Charles River Laboratories Japan, Inc (Yokohama, Japan) and housed and used in accordance with the rules of the Institutional Animal Care and Use Committee.

Adenovirus Vectors

A replication-defective adenovirus vector encoding human VASH1 gene (Ad-VASH1) and beta-galactosidase gene (Ad-LacZ) used as the control were prepared as previously described.⁶ Briefly, plaque-purified adenoviruses were propagated in HEK293 cells. The viral lysates were purified and concentrated through two cycles of cesium chloride step gradients.

Experimental Design

Intrapulmonary tracheal transplantation was performed as previously described.⁷ BALB/c tracheas were transplanted into the left lung parenchyma of the C57BL/6J mice. Ad-VASH1 or Ad-LacZ adjusted to 1.0×10^9 plaque forming units per 75 μ L was intratracheally administered to the recipient mice on days 6, 13, and 20 posttransplantation. Our preliminary studies using a reporter gene showed the feasible gene transfer to the both lungs with this procedure. Human VASH1 messenger RNA was readily detectable in the recipient left lung transferred with Ad-VASH1 and harvested on day 21 posttransplantation and not in the lung transferred with Ad-LacZ (data not shown). Mice were sacrificed and the left lungs bearing allografts harvested on days 21 ($n = 10$, 8) and 28 ($n = 5$, 4) posttransplantation.

Histology and Immunohistochemistry

The removed lungs were immediately fixed in 4% paraformaldehyde. After 24 hours of fixation, they were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. To examine the intensity of angiogenesis, immunohistochemical staining for CD31 was performed. Sections were deparaffinized and incubated for 5 minutes at 120°C. Primary antibody reactions were performed using an anti-CD31 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif, United States) with a dilution of 1:600 overnight at 4°C. Antibody depositions were visualized using diaminobenzidine. Nuclei were counterstained with hematoxylin.

Measurement of Luminal Obliteration and Vascular Area of the Tracheal Allografts

Histological sections of the allografts were photographed at an original magnification of $\times 10$ with an all-in-one microscope with a computer (BZ9000, Keyence, Tokyo, Japan). The percentage of luminal obliteration in the tracheal allografts was calculated using the analysis software provided by Keyence as previously described.⁸ Vascular area as shown by the sum total of the lumina surrounded by CD31-positive ECs in the fibroproliferative tissue was also calculated as previously described.⁹ Vascular area was normalized by area of fibro-obliteration.

Statistical Analyses

Data were expressed as the mean \pm SE. The significance of the difference between the groups was determined by Student *t* test. All statistical analyses were performed using GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc, San Diego, Calif, United States). Values of $P \leq .05$ were considered to be significant.

RESULTS

Effect of Ad-VASH1 Gene Transfer on Luminal Obliteration and Vascular Area of the Tracheal Allografts

On day 21 posttransplantation, the lumen of the tracheal allografts in the lung expressing LacZ was almost completely obstructed, whereas the lumen of the most of the allografts in the lung expressing VASH1 was partially opened. Luminal obliteration of the tracheal allograft was significantly attenuated in the animals transferred with Ad-VASH1 compared with the controls transferred with Ad-LacZ (69% versus 93%, $P = .0276$; Fig 1). Vascular area in the fibroproliferative tissue was also significantly reduced in allografts in the animals transferred with Ad-VASH1 compared with those with Ad-LacZ (4.6% versus 13.0%, $P = .037$; Fig 2).

On day 28 posttransplantation, luminal obliteration of the tracheal allograft was almost similar in the both groups with no statistically significant difference between the groups (92% versus 97%, $P = .48$). Vascular area in the fibroproliferative tissue was still significantly reduced in the allografts in the animals transferred with Ad-VASH1 compared with those with Ad-LacZ (5.4% versus 13.4%, $P = .022$).

DISCUSSION

A novel model for posttransplantation obliterative airway disease in which the trachea is transplanted into the lung

parenchyma was introduced by Andre et al in 2005.¹⁰ In this model, the blood supply to the tracheal graft derives from the pulmonary circulation. This model is valuable for studying the mechanisms of fibrous obliteration of the transplanted airway in the relevant local environment of the lung and also makes it possible to study pulmonary-targeted therapies with transvascular and trans-airway routes.

The present study showed that transgene expression of VASH1 in the recipient lung significantly attenuated luminal obliteration of the tracheal allograft and this was associated with significantly reduced aberrant angiogenesis in the fibro-obliterative tissue when allografts were examined on day 21 posttransplantation. This finding primarily supports the hypothesis that vascular remodeling due to aberrant angiogenesis during fibro-obliteration of the allograft airway contributes at least in part to the pathogenesis of fibro-obliteration of airway disease, as seen in other chronic inflammatory diseases. The vascular remodeling of the tracheal allograft was also inhibited by VASH1 when the allograft was harvested on day 28 posttransplantation, whereas luminal obliteration was not significantly ameliorated. This may be due to the nature of transient transgene expression of target protein with this gene delivery system that may not express sufficient amount of the target protein in the late phase after gene transfer. Another possibility is that the result reflects the limitation of the effect of anti-angiogenic approaches in preventing BO. Further studies are desirable to more clearly understand the role of angiogenesis in the pathogenesis of BO and also the effect of antiangiogenic therapy on preventing BO.

In conclusion, transgene expression of a potent anti-angiogenic substance (VASH1), in the recipient lung sig-

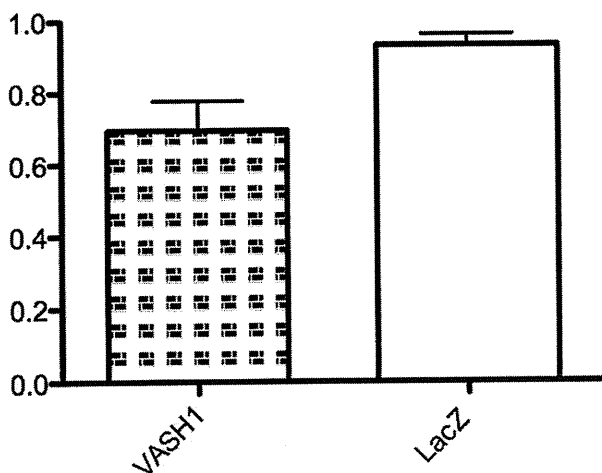


Fig 1. Luminal obliteration was significantly attenuated by VASH1 in the allografts harvested on day21 post-transplant (93% versus 69%, $P = .0276$).

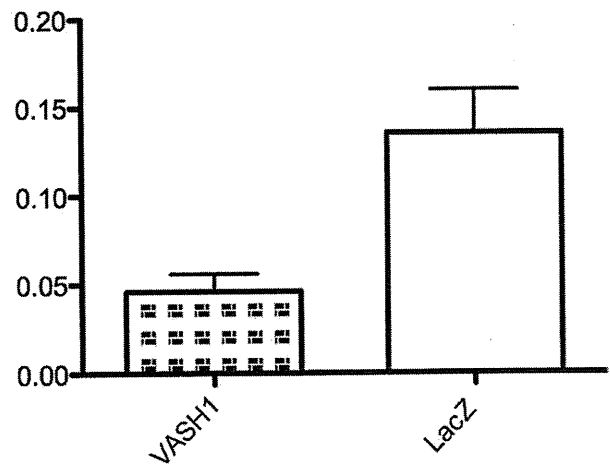


Fig 2. Vash1 treatment reduced vascular area in the allografts on day 21 posttransplant (13.0% versus 4.6%, $P = .037$).

nificantly attenuated luminal obliteration of the tracheal allograft and this was associated with significantly reduced aberrant angiogenesis in the fibro-obliteration tissue in a murine model of intrapulmonary tracheal transplantation. Therapeutic potential of anti-angiogenic agents targeting BO merits further investigations.

REFERENCES

1. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, et al: Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report—2008. *J Heart Lung Transplant* 27:957, 2008
2. Sivakumar B, Harry LE, Paleolog EM: Modulating angiogenesis: more vs. less. *JAMA* 292:972, 2004
3. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al: Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest* 115:1150, 2005
4. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al: Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 114:898, 2004
5. Heishi T, Hosaka T, Suzuki Y, et al: Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum antilymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. *Am J Pathol* 176:1950, 2010
6. Hosaka T, Kimura H, Heishi T, et al: Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. *Am J Pathol* 175:430, 2009
7. Hirayama S, Sato M, Liu M, et al: Local long-term expression of lentivirally delivered IL-10 in the lung attenuates obliteration of intrapulmonary allograft airways. *Hum Gene Ther* 22:1453, 2011
8. Lau CL, Zhao Y, Kron IL, et al: The role of adenosine A2A receptor signaling in bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Surg* 88:1071, 2009
9. Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, et al: Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 113:4810, 2009
10. Dutly AE, Andrade CF, Verkaik R, et al: A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation. *Am J Transplant* 5:248, 2005