

201220007B

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

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 靖史

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総合研究報告 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 佐藤 靖史	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	25

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

血管内皮細胞が産生するVASH1は、がんによって分解・不活性化されて十分に機能していない可能性がある。VASH2は多くのがん細胞で発現し、その発現亢進はmir200の低下に起因すると考えられる。がん細胞の産生するVASH2は、腫瘍血管新生を促進すると共にがんの上皮間葉転換を惹起する機能を待っており、がん治療の新たな分子標的となる。（佐藤）

腫瘍血管を内皮細胞に発現するAPJの活性化により成熟化すると血管透過性が改善し腫瘍免疫能が高まった。また腫瘍周辺の正常組織の血管も未成熟で血管新生阻害剤で正常化する。（高倉）

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。VEGFR-2やHGFの特異的受容体METの下流分子であるPI3Kに着目し、*in vitro*および*in vivo*モデルにおいてPI3K阻害薬がHGFによるゲフィチニブ耐性を解除することを明らかにした。また、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的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。（矢野）

がん微小環境における血管とリンパ管の形成はBMP9シグナルによってそれぞれ誘導ならびに抑制されることが明らかになった。また、がん微小環境内のTGF- β により血管内皮細胞は間葉系の細胞へ分化するが(EndMT)、腫瘍血管内皮細胞が産生するFGFによりEndMTが抑制されることが示された。（渡部）

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、このプロセスはVEGFR-2、MAPKを介して、膜表面のADAM17またはADAM10に依存していた。LYVE-1 ectodomain shedding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ち、リンパ管新生に関わることが明らかとなった。（平川）
腫瘍細胞と腫瘍血管におけるShp2の機能について検討し、EphA2によるShp2のリン酸化とErkの活性化が重要であることを突き止めた。（望月）

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

がん微小環境は、腫瘍脈管系（血管およびリンパ管）、浸潤する炎症細胞や線維芽細胞、細胞外マトリックスによって

構成されるが、なかでも腫瘍脈管はがんの発育・遠隔転移、腫瘍リンパ管はリンパ節転移に直結している。本研究の目的は、腫瘍脈管系を研究する国内のフロントランナーが集結し、それぞれが独自のアプローチで腫瘍脈管系を標的とすると共に、相互に連携することで、がんの発育と転移を制御する革新的な治療法を確立することである。

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。（佐藤）

近年、がん組織の血管は未成熟であり、その正常化により、抗がん剤の腫瘍内送達を高めるといった概念が台頭してきたが定かではない。本研究では生理的血管成熟化因子因子による血管成熟化の分子機序と腫瘍血管成熟化の誘導の有無と、それによる癌治療の効果について検討することを目的とした。(高倉)

肺がん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がん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)ことが臨床で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変異肺がんにおける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PI3K阻害薬やMetおよびVEGFR阻害薬の治療効果を検討した。(矢野)

血管の発生と維持に重要な役割を果たすTGF- β /BMPシグナルが腫瘍血管ならびに腫瘍リンパ管の形成ならびに、その維持における役割を検討することにより、がん細胞の増殖と浸潤・転移に重要な役割を果たす血管ならびにリンパ管を標的としたがんの新規治療法の開発を目指す。(渡部)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が関わることを同定し、sheddingの分子機序とリンパ管新生に与える作用を解明する。(平川)

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な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。

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最適化を目指した向血管薬の開発に資する研究を目指す。

さらに、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新たな腫瘍抑制治療の開発を目指す。(望月)

B. 研究方法

vasohibinファミリー分子の細胞や癌組織における発現を解析する。特に内皮細胞が産生するvasohibin-1(VASH1)の癌組織における不活性化と、癌細胞が産生するvasohibin-2(VASH2)の発現調節を明らかにする。

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する。

がん細胞を皮下移植し、腫瘍着生を確認後、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。(佐藤)

腫瘍にアペリンを過剰に発現させ、腫瘍血管の成熟化の誘導を試みた。また担がんマウスに血管新生抑制剤を投与して腫瘍近接部の血管の成熟化を比較した。また内皮細胞に発現するTie2の構造変化を解析した。

(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。(高倉)

EGFR遺伝子変異(Exon 19の欠失)を有する肺がん細胞株としてPC-9、HCC827、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。PI3K阻害薬としてPI-103、GDC-0941、BEZ235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。

また *in vivo* における検討として、PC-9 と線維芽細胞をあらかじめ混ぜた後に SCID マウスの皮下に移植し、4 日後からゲフィチニブを連日経口投与し治療効果を評価した。

(倫理面への配慮)

実験に使用するマウスの匹数は必要最小限にとどめる配慮を行った。(矢野)

培養血管内皮細胞としてES細胞から分化して得られたMESECならびに腫瘍組織から調製した細胞を用いた。また培養リンパ管内皮細胞としてヒト皮膚由来リンパ管(HDLEC)を用いた。さらに腫瘍モデルとしてヒト膵臓がん細胞(BxPC3)皮下移植モデルを用いた。

(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。(渡部)

①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、培養ヒトリンパ管内皮細胞に感染後、VEGF-Aで刺激した。Shedding効率を培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞で定量した。

②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。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)

愛媛大学学内組換えDNA実験委員会に研究計画を提出し、承認された。浜松医科大学では審査中。(平川)

腫瘍血管の安定化の研究

・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。

・ゼブラフィッシュの血管可視化を行うためのトランスジェニックフィッシュの維持は、研究所内の小型魚類飼育室で行った。血管内皮細胞特異的にEGFPを発現するトランスジェニックフィッシュ Tg (Fli1:EGFP) による血管の発生・可視化は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV-1000) を用いて行った。

(1) Angiopoietin-1 による血管内皮細胞安定化機構の解明—血管内皮細胞を細胞間接着の有無の条件で培養し、Angiopoietin-1 による刺激依存性に活性が上昇あるいは、転写が増加する分子に着目して実験を行った。

(2) 血管の可視化

受精卵に Tie2 モルフォリーノや、情報伝達系の分子のモルフォリーノを顕微注射して、その効果を Tg (Fli1:EGFP) で血管を観察することにより検討した。

(3) 通常の分子生物学的実験に用いた試薬類、抗体はこれまでの Angiopoietin-1/Tie2 の研究に用いたものと同様に行った。

(4) 血管内皮細胞の3次元培養により、血管新生を培養条件で誘導し、angiopoietin-1 の刺激の有無によって血管新生への影響を検討した。

腫瘍増殖における Shp2 の機能の解明

・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。

(5) 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

(6) EphA2 による SHP2 のリン酸化を検討した。

(7) 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。

(8) 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各年度ごとに行い承認後に実施した(承認番号を取得後に実験を行った)。(望月)

C. 研究結果

内皮細胞と各種癌細胞との共培養で VASH1 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 calpain 阻害剤によって完全に阻害できることを明らかとなった。

VASH2 はマウス ES 細胞出現が高く、分化とともに減少する。多くの癌細胞は VASH2 を発現しており、発癌モデルでは発癌の初期からその発現は上昇する。癌細胞は構造的に VASH2 を発現している。VASH2 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。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。

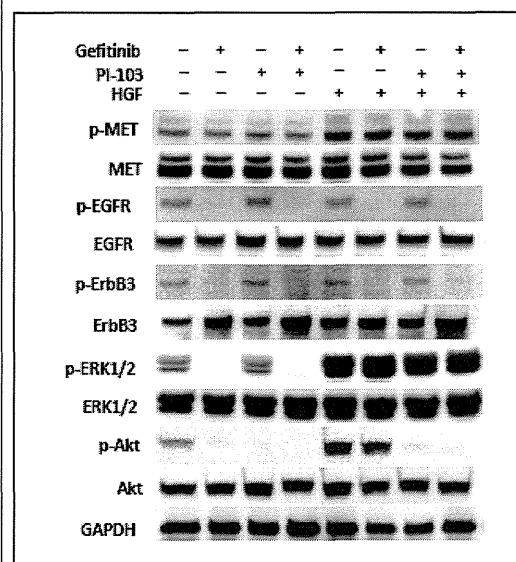
VASH2 の siRNA を腫瘍周囲に局所投与することで、VASH2 mRNA の発現は約半分程度に減少できることを確認した。この条件において腫瘍発育は有意に抑制され、組織学的解析で腫瘍血管新生が抑制されていることを確認した。(佐藤)

アペリンによる APJ の活性化は、腫瘍血管を成熟化し、血管透過性の改善により腫瘍免疫能が高まった。腫瘍周辺の正常組織の血管も未成熟で血管新生阻害剤で正常化するこ、内皮細胞上の Tie2 の活性化は 2 量体化では判断できないことが判明した。(高倉)

ゲフィチニブと PI3K 阻害薬 (PI-103, GDC-0941, BEZ235) はともに用量依存的に肺がん細胞株の増殖を抑制した。HGF はゲフィチニブに対しては耐性を誘導したが、PI3K 阻害薬に対しては耐性を誘導しなかった。HGF を高産生する線維芽細胞株 MRC-5 と肺がん細胞株を共培養した場合にも、ゲフィチニブに対しては耐性が誘導されたが、PI3K 阻害薬に対しては耐性が誘導されなかった。以上より、PI3K 阻害薬は HGF によるゲフィチニブ耐性を解除することが示唆された。

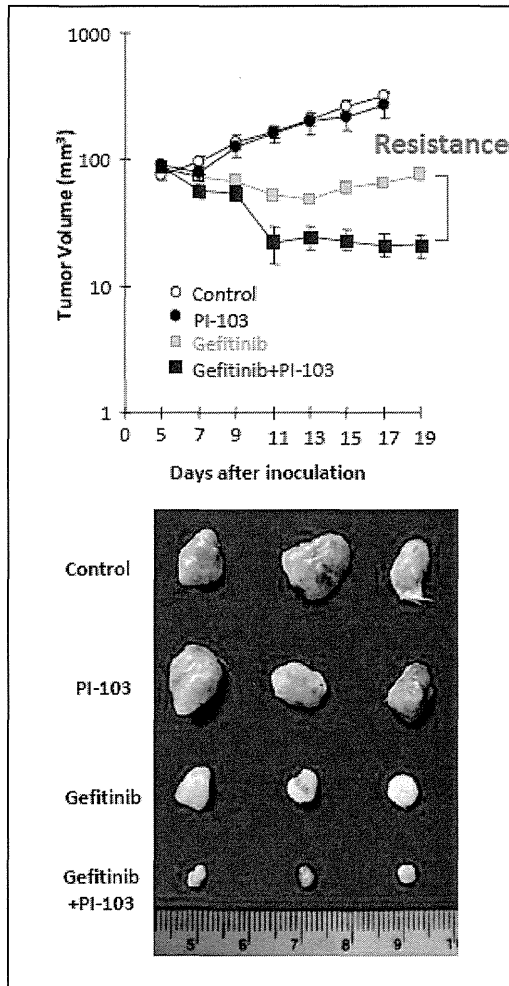
つぎに PI3K 阻害薬のがん細胞内シグナル伝達における効果を検討した。がん細胞として PC-9 を用いた場合ゲフィチニブは、HGF 存在下で Akt や ERK1/2 のリン酸化を阻害できなかった。一方、PI3K 阻害薬 PI-103 は ERK1/2 のリン酸化を阻害しないものの、HGF 存在下においても Akt のリン酸化を強力に阻害した(図 1)。以上より、PI-103 は、HGF が存在しても PI3K/Akt 経路を選択的に遮断できることが示された。

図 1 PI3K 阻害薬の細胞内シグナル伝達阻害効果 (PC-9 細胞を用いた場合)



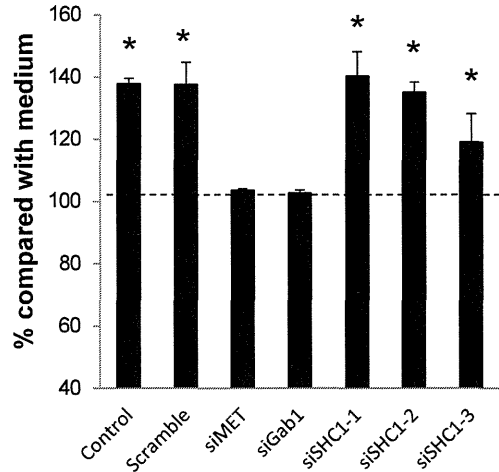
つぎに、*in vivo* において HGF により誘導されるゲフィチニブ耐性に対する PI3K 阻害薬の治療効果を検討した。PC-9 のみを皮下に接種した場合腫瘍を形成するが、ゲフィチニブ (25mg/kg/日) 単独治療にて腫瘍は著明に縮小した。PI-103 (5mg/kg/日) 単独では明らかな治療効果はみられなかった。HGF を高産生する線維芽細胞株 MRC-5 を PC-9 と混合して接種した場合、ゲフィチニブ (25mg/kg/日) 単独治療は腫瘍増大を阻害したものの腫瘍縮小はみられなかったことから、線維芽細胞が産生した HGF が *in vivo* においてもゲフィチニブ耐性を誘導したと考えられた。PI-103 (5mg/kg/日) は単独では治療効果を示さなかったがゲフィチニブ (25mg/kg/日) と併用した場合において、著明な腫瘍縮小効果がみられた (図 2)。

図2 *in vivo*におけるPI-103のHGF誘導性ゲフィチニブ耐性に対する治療効果



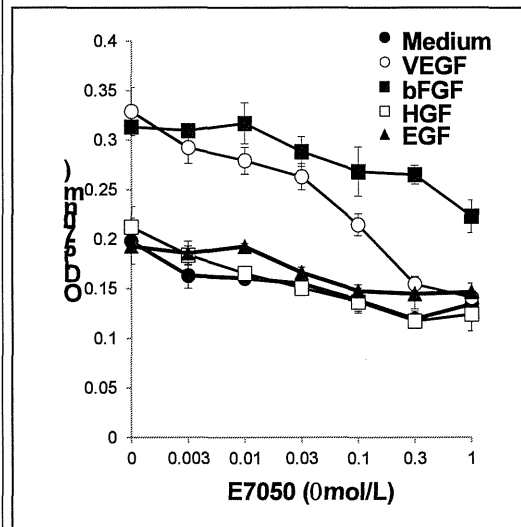
PI3K 阻害薬として GDC-0941 (5mg/kg/日) を用いた場合にも同様の効果が認められた。つぎに、Met と VEGFR 阻害活性を有する E7050 の治療効果を検討した。ゲフィチニブは用量依存的に肺がん細胞株 PC-9 と Ma-1 の増殖を抑制した。HGF はゲフィチニブに対しては耐性を誘導したが、E7050 を併用することにより耐性が解除された。ヒト HGF 遺伝子を導入した Ma-1/HGF は HGF を高産生し、ゲフィチニブに耐性を示した。ゲフィチニブと E7050 を併用することで、Ma-1/HGF のゲフィチニブ感受性が回復した。Western blot による解析より、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3 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3)。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で、腫瘍進展を促進していることが示唆された。

図4 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4)。(矢野)

BMP9の添加により培養血管内皮細胞の増殖は亢進し、リンパ管内皮細胞の増殖は減少した。また腫瘍組織において形成される血管とリンパ管の数はやはりBMP9によってそれぞれ増殖そして減少した。さらにTGF- β による内皮間葉移行(EndMT)が腫瘍血内皮細胞が産生するFGFにより抑制されることが示された。(渡部)

VEGF-A刺激により、LYVE-1のectodomain sheddingが誘導された。このプロセスは、VEGFR-2, MAPキナーゼを介して膜表面のADAM17またはADAM10に依存していた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する条件では、LYVE-1 ectodomain sheddingが必要であることが明らかになった。(平川)

血管安定化機構について

(1) Angiopoietin-1 は Dll4 の発現を増加させる。

HUVECs を細胞間接着が密の状態に培養して遺伝子発現を microcDNA アレイで調べたところ、培養条件が疎の時には認めない Dll4 の発現上昇が顕著に認められた。

(2) Dll4 の発現は細胞間接着依存性である。

Angiopoietin-1 による Dll4 の発現増加は、細胞間接着がないときには認められないこと、また Dll4 のノックダウンによっても Dll4 の発現が認められないことから Dll4 の発現には Dll4-Notch 系が必須であることも突き止めた。

(3) Angiopoietin-1 は Dll4 を介してコラーゲン Type IV の発現を増加させる。

腫瘍細胞の増殖と腫瘍血管における Shp2 について結果

(4) 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。

(5) Grb2 だけではなく、Gab1 を介した Erk の持続的リン酸化経路

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。

(6) 血管内皮細胞の増殖も Shp2 の制御を受ける

HUVEC を VEGF 刺激した時の持続性の Erk の活性化にも EphA を介した Shp2 のリン酸化が重要であることがわかった。

(7) 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。

(8) 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。(望月)

D. 考察

内皮が産生する血管新生抑制因子 VASH1 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 VASH2 の発現亢進は mir200 の発現低下に起因すると考えられた。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しており、癌治療の新たな分子標的となると考えられる。(佐藤)

腫瘍血管は壁細胞化が発達しない未成熟血管が多いが、この分子機序が解明されれば、免疫細胞によるがんのサーベイランスが可能になると考えられる。(高倉)

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。(矢野)

BMP9はALK1受容体を介してシグナルを伝達するが、ALK1遺伝子は遺伝性出血性毛細血管拡張症の原因遺伝子ということから、BMP9/ALK1シグナルの血管の形成における役割について研究が進んでいた。本研究により、BMP9の腫瘍血ことから、BMP9/ALK1シグナルの血管の形成における役割について研究が進んでいた。また、TGF- β のシグナルも心血管形成に重要な役割を果たすことが、様々な遺伝子改変マウスの解析から明らかになっていた。本研究により、TGF- β ならびにBMP9の腫瘍血管・リンパ管新生における役割が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。(渡部)

リンパ管新生は、がん組織でリンパ管内皮細胞が増殖・遊走する生物像である。リンパ管内皮細胞が遊走するためには、まずcell-cell contactあるいはcell-matrix contactが減弱しなければならない。LYVE-1は、ヒアルロン酸に対する受容体である。本研究課題では、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、膜蛋白の化学的变化を誘導し、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。(平川)

腫瘍への抗がん剤の到達を考えると腫瘍血管の透過性が低下して抗がん剤が腫瘍にまで届くことが重要と考えられる一

方で、酸素化により腫瘍細胞の増殖も考えられる。本研究では、血管内皮細胞の安定化機構として、angiopoietin-1 による D114 の発現とそれに引き続くコラーゲン TypeIV の発現増加が安定化に重要である可能性を明らかにできた。VEGF が透過性をあげるのに対して、Angiopoietin は血管透過性を抑制する分子としてこれまでも考えられてきたが、そのメカニズムは明らかでなかった。我々の研究では血管内皮細胞間接着があるときの条件での結果であるので、腫瘍血管でも同様な血管安定化機構が機能しているのかは今後の研究によって解明されなければならない。腫瘍細胞の増殖と血管内皮細胞の増殖(血管新生に不可欠な)における Shp2 の機能について検討した。Shp2 はリン酸化チロシンの脱リン酸化酵素であるが、増殖に関しては正に作用することが報告されてきている。しかし、その機序は不明であった。本研究では、EphA2 による Shp2 のリン酸化によって、Grb2/Gab1 系が機能して下流の Sos/ras 系-Erk の活性化によって増殖が調節されている結果を得た。実際に乳癌組織でも EphA2、リン酸化 Shp2 (Tyr580)、Erk のリン酸化を免疫染色で検討したところ、乳癌のステージに関わらず、ほぼ全例で3つとも陽性となった。以上から、EphA2-Shp2-Erk シグナルが乳癌の伸展に関わることが強く示唆された。また、生体でも Shp2 が増殖にかかわるかをゼブラフィッシュに LEOPARD 症候群の変異体 (T468M Shp2) を発現させて検討したところ、心臓に見られる以上が EphA2 の発現抑制によって、軽減されることから EphA2-Shp2 のシグナル系に関わることが明らかになった。(望月)

E. 結論

VASH1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、VASH2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。がん細胞の産生する VASH2 は、腫瘍血管新生を促進すると共にがんの上皮間葉転換を惹起する機能を待っており、がん治療の新たな分子標的となる。(佐藤)

腫瘍血管が成熟化すると確かに他の癌治療の効果が高まることが判明した。(高倉)

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。(矢野)

BMP9は血管内皮細胞の増殖を促進することにより腫瘍血管新生を亢進する一方腫瘍リンパ管新生を抑制した。またTGF- β によるEndMTはFGFシグナルにより抑制された。以上の結果からTGF- β /BMPシグナルを調節することで腫瘍脈管を標的とした新規のがん治療法が開発できることが期待される。(渡部)

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。(平川)

血管安定化機構として
Angiopoietin1-D114-Collagen TypeIVの発現系の重要性を示した。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。(望月)

F. 研究発表
(佐藤)

1. 論文発表

Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y. Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. **J. Cell Sci.** 123:3094-4101, 2010. (査読有)

Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. **Cancer Sci.** 102, 446-51. 2011.(査読有)

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. **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

佐藤靖史. 血管新生抑制とがん. 第69回日本癌学会学術集会. 大阪, 2010.

嵯峨泰, 高橋詳史, 竹井裕二, 町田静生, 鈴木光明, 佐藤靖史. 血管新生ネガティブフィードバック調節因子バソヒビン-1による卵巣癌分子標的・遺伝子治療. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪, 2010.

高橋詳史, 嵯峨泰, 竹井裕二, 町田静生, 鈴木光明, 佐藤靖史. 癌細胞に発現するVasohibin-2は血管新生を誘導し腫瘍増殖を促進する. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪, 2010.

佐藤靖史. A system for the termination of angiogenesis. 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 大阪, 2010.

宮下浩輝, 佐藤靖史. 内皮ストレス耐性におけるsplicing variant vasohibin-1の意義. 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 大阪, 2010.

林英樹, 宮下浩輝, 鈴木康弘, 小林美穂, 佐藤靖史. VasohibinはVEGFシグナル遮断による内皮細胞障害を防止する. 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 大阪, 2010.

鈴木康弘, 神吉康晴, 南敬, 佐藤靖史. 転写因子GATA-2によるVasohibin-1遺伝子の発現調節. 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 大阪, 2010.

北原秀治, 森川俊一, 佐藤靖史, 江崎太一. 消化管腫瘍における微小循環系の変化は上皮の悪性化と相関するか? 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 大阪, 2010.

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.

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.

(高倉)

1. 論文発表

Nagahama Y et al. PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. **Cancer Res** 70, 1215-1224, 2010.

Nagahama Y, et al. PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. **Biochem Biophys Res Commun**, 392, 150-154, 2010.

他2件

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

Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Naito H, Takakura N. Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose Angiopoietin-1. **J Biol Chem** in press

(他13報)

2. 学会発表

Takakura N. Cancer stem cell and their Vascular niche. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日大阪

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

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)

(矢野)

1. 論文発表

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** 17, 2269-2269, 2011. 査読有

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** 18, 3592-3602 (査読有) 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** 103, 1189-1194 (査読有) 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** (査読有) 2012;18:1663-71.

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** 7, 1078-1085 (査読有) 2012.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 Aki1, a novel therapeutic target for lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. **Oncogene**, 2012 Oct 8 [Epub ahead of print].

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.

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.

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.

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.

Ohtsubo K, Watanabe H, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, **Yano S**. Endoscopic findings of upper gastro- intestinal lesions in patients with pancreatic cancer. **JOP** 2012;13:420-6.

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.

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.

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

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 13th Japanese Association for Molecular Target Therapy of Cancer. 第13回日本がん分子標的治療学会. June 24-26, 2009. (Tokushima)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 第18回日本がん転移学会. July 23-24, 2009. (Asahigawa, Hokaido)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 2009 Asia-Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine and Fourth Forum of Chinese Young and Middle-aged Oncologists. Oct 24-27, 2009. Xi'An, (CHINA)

Seiji Yano, Wei Wang, Qi Li, Ivan S. Donev, Shinji Takeuchi, Tadaaki Yamada, Kunio Matsumoto, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone. Therapeutic effect of HGF inhibitors against HGF-induced EGFR-TKI resistance in lung cancer harboring *EGFR* mutations. AACR 101st Annual Meeting 2010. April 17-21, 2010. Washington, DC, (USA)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal Fibroblasts Induce Resistance of Lung Cancer to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. April 23-25, 2010. (Kyoto)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Novel gefitinib resistance mechanism and its therapeutic strategy for lung adenocarcinoma with EGF receptor activating mutations. 第19回日本がん転移学会. July 16-17, 2010. (Kanazawa, Ishikawa)

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)

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)

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)

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)

(渡部)

1. 論文発表

Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., Watabe, T. (2010) BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science** 123,1684-1692.

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.

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

渡部徹郎、鈴木夕佳、吉松康裕、大賀則孝、森下保幸、樋田京子、宮園浩平。 Physiological and pathological roles of BMP-9/ALK-1 signals in the proliferation of endothelial 第18回日本血管生物医学会 (大阪) 2010年12月1-3日 (シンポジウム)

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)

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

(平川)

1. 論文発表

Hirakawa S. Regulation of pathological lymphangiogenesis requires factors distinct from those governing physiological lymphangiogenesis. **J Dermatol Sci.** 2011; 61:85-93.

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

平川聡史 東山繁樹 VEGF-A induces the ectodomain shedding of LYVE-1 via MAPK pathway in cultured lymphatic endothelial cells 第69回日本癌学会学術総会平成22年9月22-24日

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.

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

(望月)

1. 論文発表

Zhang J, Fukuhara S, Sako K, Takenouchi T, Kitani H, Kume T, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 Signal Augments Basal Notch Signal Controlling Vascular Quiescence by Inducing Delta-Like 4 Expression through AKT-mediated Activation of β -Catenin. **J. Biol. Chem.** 286; 8055-8066, 2011.

Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. **Histol Histopathol.** 25: 387-396, 2010.

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.

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 .

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, Fukuhara S. Angiopoietin-Toe2 signal-mediated vascular maturation and quiescence are regulated by Dll4-Notch signaling. 6th International Kloster Seeon Meeting Angiogenesis. Kloster Seeon, Germany September 18-21, 2010.

Mochizuki N. Function of Spns2, a sphingosine 1-phosphate transporter, in zebrafish and mammals. The 11nd Pacific Symposium on Vascular Biology. Oct30-Nov 2, 2011, Jeju Island Korea

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. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

国立大学法人愛媛大学発明等
届出書番号：22-048
発明等の名称：皮膚モデル組織
の構築方法(平川)

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(平川)

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

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レイアウト

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	リンパ管新生とリンパ節転移	丸 義朗	がん転移	秀潤社	東京	2010	214-218
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
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
Minami, T	Down syndrome expressed protein; DSCR-1 deters	Prof. Subrata Dey	Genetics and Etiology of Down	In Tech	EU	2011	

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
Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y	Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion.	J. Cell Sci.	123	3094-3101	2010
Nakahara I et al	Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells.	Genes Cells	15	1015-1024	2010
Murakami A et al	Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist.	Mol Pharmacol	77	704-713	2010
Nagahama Y et al	PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation.	Biochem Biophys Res Commun	392	150-154	2010
Nagahama Y et al	PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties.	Cancer Res	70	1215-1224	2010
Yamada T et al	Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer.	Clin Cancer Res	16	174-183	2010

Sakaguchi S et al	Gender difference in bone metastasis of human small cell lung cancer, SBC-5 cells in natural killer-cell depleted severe combined immunodeficient mice.	Clin Exp Metastasis	27	351-359	2010
Yamada T et al	Metastatic renal cell carcinoma complicated with diffuse alveolar hemorrhage: a rare adverse effect of sunitinib.	Int J Clin Oncol	15	638-641	2010
Izumi K et al	The role of percutaneous needle biopsy in differentiation of renal tumors.	Jpn J Clin Oncol	40	1081-1086	2010
Kanematsu T et al	Epidemiological and clinical features of lung cancer patients from 1999 to 2009 in Tokushima Prefecture of Japan.	J Med Invest	57	326-333	2010
Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T	BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo.	Journal of Cell Science	123	1684-1692	2010
Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N	Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis.	Histol Histopathol	25	387-396	2010
Sato, Y	The vasohibin family.	Pharmaceuticals	3	433-440	2011
Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y	Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas.	Cancer Sci.	102	446-451	2011
Miyashita H, Suzuki H, Ohkuchi A, Sato Y	Mutual balance between vasohibin-1 and soluble VEGFR-1 in endothelial cells.	Pharmaceuticals	4	782-793	2011
Sato, Y	Is Vasohibin-1 for more than angiogenesis inhibition?	J. Biochem.	149	229-230	2011
Sato Y	Persistent vascular normalization as an alternative goal of anti-angiogenic cancer therapy.	Cancer Sci.	102	1253-1256	2011

Naito H. t 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
Tanaka H et al	Reaction of plasma hepatocyte growth factor level in lung cancer patients treated with EGFR-TKIs.	Int J Cancer	126	1410-1416	2011
Donev IS et al	Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer.	Clin Cancer Res	17	2269-2269	2011
Shiirevnyamba A et al	Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts.	Br J Cancer	104	505-513	2011
Tomimoto H et al	A multi-institutional phase II study of combination chemotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer.	Oncology Letter	2	465-470	2011

Yasumoto K et al	The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXCR4-expressing gastric cancer.	Clin Cancer Res	17	3619-3630	2011
Ogino H et al	E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor.	Mol Cancer Ther	10	1218-1228	2011
Li Q et al	Pleural mesothelioma instigates tumor associated fibroblasts to promote progression via malignant cytokine network.	Am J Pathol	179	1483-1493	2011
Yano S et al	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
Yamada T et al	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
Tanaka S et al	Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma -the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence -	Brain Tumor Pathol	28	59-64	2011
Kerjaschki D et al.	Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse.	J Clin Invest	121	2000-2012	2011
Hirakawa et al.	Regulation of pathological lymphangiogenesis requires factors distinct from those governing physiological lymphangiogenesis.	J Dermatol Sci	61	85-93	2011