

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「がん微小環境を標的とした革新的治療法の実現」 (Vasohibin ファミリーを応用したがんの発育・転移の制御)
2. 研究開発代表者： 佐藤 靖史 (国立大学法人東北大学)
3. 研究開発の成果

## (1) 内皮細胞が産生する VASH1 の機能増強

これまで VASH 活性は VASH 遺伝子導入細胞の培養上清で検討してきたが、昨年度までにプロテオミクス解析で得た VASH 受容体候補分子から VASH 受容体を単離するためには、生物活性を有する組換え VASH 蛋白が必要なため、バキュロウイルスを用いて組換え VASH 蛋白の作成・精製を行った。このため、がん細胞の発現する ADAM ファミリーの蛋白分解酵素が VASH 受容体候補分子を切断するか否かは、VASH 受容体の単離後に検証することとした。

昨年度までに腫瘍血管内皮細胞に選択的に VASH1 遺伝子導入する手法を確立し、VASH1A 遺伝子とスプライシングバリエント VASH1B 遺伝子の抗腫瘍効果を比較したところ、何れの遺伝子導入でも血管新生と腫瘍発育は抑制されるが、VASH1B 遺伝子では腫瘍血管は未熟で血流に乏しく、残存腫瘍の低酸素領域の拡大と腫瘍壊死が惹起されるのに対し、VASH1A 遺伝子導入では腫瘍血管は成熟化して残存腫瘍の低酸素領域が著減することが明らかとなった。そこで VASH1 遺伝子と VASH1B 遺伝子の最適な導入プロトコルを求め、VASH1A 遺伝子、VASH1B 遺伝子の順番で交互に遺伝子導入することで最も効果的な抗腫瘍効果の得られることを明らかにした。

## (2) がん細胞が産生する VASH2 の機能阻害

昨年度までに作成した抗ヒト VASH2 中和モノクローナル抗体クローン 1760 について、組換えヒト VASH2 蛋白との affinity を解析したところ KD 値は  $3.6 \times 10^{-5}$  であり、抗体薬として応用するには affinity が不十分であるとの結果であった。そこで、その代替策として、VASH1 蛋白とはアミノ酸配列が異なり、しかもヒト VASH2 蛋白とマウス VASH2 蛋白で共通する部位のペプチドワクチンを作成し、マウスモデルに應用したところ VASH2 蛋白に対する十分な抗体価の上昇が確認され、さらにルイス肺がん細胞の皮下移植モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を得ることに成功した。

ヒト VASH2 を標的とした修飾型アンチセンスヌクレオチド(ASO)について、昨年度までにヒト肝癌細胞同所移植モデルで ASO 腹腔内投与の効果を確認していたが、今年度はヒト大腸癌細胞肝転移モデルに應用し、顕著な治療効果が得られることを明らかにした。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータを基にがんの発生臓器別種類と VASH2 発現の程度に関連性を検索し、難治性がんの代表である肝癌、胆嚢・胆管癌、膵癌において VASH2 の遺伝子増幅が高頻度に発生していることを確認した。

作成した抗ヒト VASH2 モノクローナル抗体を組み合わせてヒト VASH2 タンパクの測定可能な ELISA 系を検討したが、確立するには至らなかった。