

# タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼによる腫瘍血管形成維持におけるバソヒビンの役割解明

## [1] 組織

代表者：小嶋 聡一

(理化学研究所基幹研究所)

対応者：佐藤 靖史

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

辰川 英樹 (理化学研究所基幹研究所)

李 殷瑞 (理化学研究所基幹研究所)

鈴木 康弘 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 29万6千円，旅費 10万4千円

## [2] 研究経過

腫瘍血管選択的な血管形成の制御法の研究・開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ2 (TG2) KO マウスに移植した癌細胞周囲で観察される腫瘍血管新生の著しい欠損、言い換えれば、TG2 による腫瘍血管形成維持機能に、腫瘍血管新生の抑制と促進に働くバソヒビン(VASH) 1と2がどのように関与するのかを解明することを目的として共同研究を開始した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

平成23年5月27日に、小嶋、辰川、李が加齢研を訪問し、佐藤、鈴木と共同研究の進め方についてディスカッションし、以下の具体的な実験計画を策定した。

A<TG2がVASH1とVASH2の発現に関与するかどうか確かめる実験>

- (1) TG2+/+マウス及びTG2-/-マウスから血管内皮細胞を単離し、VASH1の発現に違いがあるかどうか確かめる。(RT-PCR & Western Blot)
- (2) HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) にアデノウイルスベクターを用いたTG2のノックダウンもしくは強制発現を行い、VASH1の発現に影響があるかどうか確かめる。(RT-PCR & Western Blot)

- (3) 同じく癌細胞においてもTG2のノックダウンもしくは強制発現を行い、VASH2の発現に影響があるかどうか確かめる。(RT-PCR & Western Blot)

B<VASH1とVASH2がTG2の基質になるかどうか確かめる実験>

- (1) HUVECに5-BAPAを処理し、VASH1にクロスリンクされるかどうか確かめる。(Western Blot)
- (2) 細胞にVASH1とTG2を強制発現させ、同じく5-BAPAの取り込みやバンドシフトが起こるかどうか確かめる。(Western Blot)

C<腫瘍組織内におけるVASH1・VASH2・TG2の局在を確かめる実験>

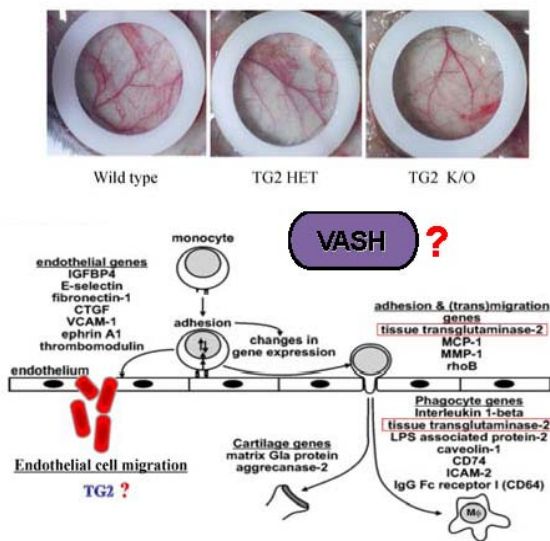
- (1) 免疫染色法によって腫瘍組織におけるVASH1・VASH2・TG2の局在を確かめる。内皮細胞や癌細胞、特に腫瘍内部のHypoxia領域での発現を確認する。

その後、夏から秋にかけて同実験計画にしたがい実験を行ったが、A1についてはTG2-/-マウスから単離した血管内皮細胞が極端に増殖能が悪く増やすことができないという問題に直面したため、これを諦め、A2並びにBの実験を行った。

10月後半から11月にかけてメールのやりとりでその結果についてディスカッションを行い、追加実験を実施し、12月1日に大阪にて開かれた日本血管生物医学会にてデータを持ち寄り、さらにディスカッションを行った。

その結果、VASHの発現や機能にTG2が直接影響を及ぼしている可能性は低いのではないかという結論に達し、引き続き、TG2の機能に及ぼすVASHの影響を探索するために、理研にVASH1 KOマウスを導入し、肝線維化/肝硬変・肝癌モデルを作成し、病態形成過程における血管新生に伴うTG2とバソヒビンの発現・機能の変化をPCR/WB/IHCなどの方法で調べる計画を策定し、実験動物委員会、並びに遺伝子組換え実験委員会の了承を得た。

## ＜腫瘍血管形成における TG2 と VASH の関係如何に＞



線維化病態動物モデルを用いて、VASH 1 の発現が TG2 の発現、機能、病態との相互作用を平成 23 年度中に調べる計画である。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、老化に伴う腫瘍血管新生に TG2 が働いており、その作用は TG2 による VASH 1 の腫瘍血管新生抑制機能の低下もしくは VASH 2 の腫瘍血管新生促進機能の亢進によることを検証しようとするものであり、これが証明できると、老化と癌に関する理解が深まることが期待される。小嶋はマルチファンクショナルな TG2 の機能ドメインの分離を進めており、理研で開発したこれらの技術と加齢研における VASH の研究成果とを結び付けることによって、高齢化社会に貢献できる研究成果を社会還元できるようになる。

### [3] 成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、共同研究の過程で、TG2 KO における血管新生の欠損は、マトリゲルプラグアッセイ、動脈リングアッセイでも観察され、このことから TG2 は血管内皮細胞の遊走に関わっており、VASH を介している可能性が考えられた (上図)。

第 2 に、VASH と TG2 の直接的相互作用を調べた。まず、VEGF (VASH 誘導剤) 刺激したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に TG2 の基質プローブであるビオチン化ペンチルアミンを添加し、TG2 の架橋活性によって細胞中のタンパク質に取り込まれたビオチン化ペンチルアミンの量をストレプトアビジンによる免疫沈降を行うことで定量したところ、免疫沈降後の抽出液中に VASH 1 が含まれていなかったことから、VASH 1 は少なくとも TG2 のグルタミン側の基質とはならないことが示唆された。次に、TG2-VASH 複合体形成の有無を IP/WB により調べた。VEGF 刺激 HUVEC 抽出液を用いて、TG2 及び VASH 1 抗体により免疫沈降を行ったところ、全くバンドが確認できなかった。以上のことから VEGF 刺激下では TG2 と VASH 1 の相互作用はないことが分かった。

第 3 に、VASH と TG2 の機能的相互作用について検討した。HUVEC を VEGF 処理する際に Cystamine (TG2 活性阻害剤) や A23187 (TG2 活性促進剤) を同時に処理すると、VASH 1 mRNA の発現自身が抑制されているらしい結果を得た。VASH 1 の転写制御における TG2 活性との機能的相互作用が示唆された。今後より詳細な解析が必要と考えられた。

そこで、やり残した癌細胞での解析を含む癌血管新生モデルに加えて、TG2 の関与が知られている肝

### [4] 成果資料

該当なし