

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24万5千円，旅費5万5千円

[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平成22年度より共同研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

平成22年5月27日の佐藤研における研究討議の結果策定した実験計画に基づき、平成22年度は、まず、VASH1-TG2の直接的相互作用を調べた。VEGF (VASH誘導剤) 刺激ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にTG2基質プローブのビオチン化ペンチルアミンを添加し、TG2の作用で細胞中タンパク質に架橋さ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が、免疫沈降後の抽出液にVASH1が入っていないことから、VASH1はTG2のG1n基質とはならないことがわかった。次に、TG2-VASH1複合体形成の有無をIP/WBにより調べた。VEGF刺激HUVEC抽出液よりTG2及びVASH1抗体により免疫沈降を行ったが、バンドは確認できなかった。

これらのことからHUVECではTG2とVASH1の物理的相互作用はないことがわかった。

次に、VASH1-TG2の機能的相互作用について調べた。HUVECをVEGF処理する際にA23187 (TG2活性促進剤)を同時に処理すると、VASH1 mRNA誘導量が低下する結果を得、TG2がVASH1の発現を制御している可能性が示唆された。

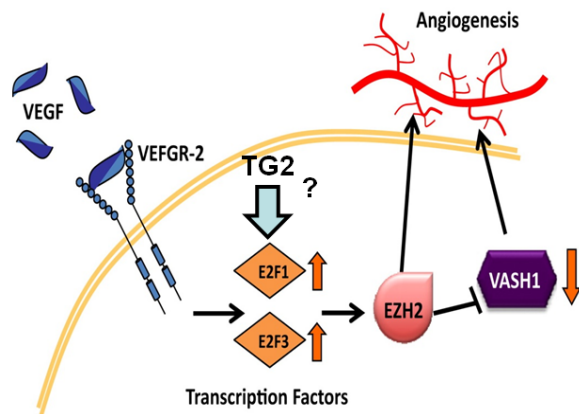
平成22年12月1日に大阪にて開かれた日本血管生物医学会にてデータを持ちより、さらにディスカッションを行った結果、引き続き、TG2の機能に及ぼすVASHの影響を探索するために、理研にVASH1 KOマウスを導入し、肝線維化/肝硬変・肝癌モデルを作成し、病態形成過程における血管新生に伴うTG2とバソヒビンの発現・機能の変化をPCR/WB/IHCなどの方法で調べる計画を策定し、実験動物委員会、並びに遺伝子組換え実験委員会の了承を得た。

平成23年度は、東日本大震災後の混乱の中、MTA契約を結ぶことから共同研究を継続した。VASH1 KOマウスを7月12日に理研動物施設に導入後、クリーニング作業を経て、12月より系統維持を開始した。平成24年1月よりVASH1-TG2ダブルKOマウスの作製を開始し、3月にダブルヘテロKOマウスが生まれた。

一方、WTマウスとTG2 KOマウスから肝類洞壁内皮細胞(LSEC)を単離し、Affymetrix GeneChip解析を行い前年度の解析で示唆されていたTG2がVASH1の発現制御因子である可能性を強める結果が得られた。

平成24年2月20日加齢研で開催された第7回Vasohibin研究会に小嶋と李が参加し、ここまでの結果を報告し、佐藤、鈴木とディスカッションした結果、TG2-VASH1ダブルKOマウスを用いた作業仮説の証明を継続するとともに、腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞を北海道大学の樋田准教授より入手し、TG2によるVASH1発現制御分子機構の解析を行う計画を策定した。

〈腫瘍血管形成における TG2 による VASH 発現抑制〉



Cancer Cell. 18: 185 (2010) を改変

[3] 成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、WT マウスと TG2 KO マウスから肝類洞壁内皮細胞(LSEC)を単離し、Affymetrix GeneChip 解析をしたところ、TG2(+/-)LSEC では、TG2(+/+) LSEC に比べ VASH1 発現量が 73 倍高いことが示唆され、qPCR により確かめられた。TG2(+/-)LSEC は、RNA がおかしい状態にあるためなのか、なぜか PCR がうまく走らず定量できなかった。

第2に、TG2 の関与が知られている胆管結紮肝線維化モデルを作製したところ、TG2 KO マウスでは、肝線維化とともに血管形成の抑制が見られ、VASH1 の発現量の亢進が示唆された。

以上の結果から、TG2 が VASH1 発現抑制因子として働いている可能性が示唆された。最近、ポリコーン群タンパク質の1つである Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2 : ヒストンメチル化酵素) による VASH1 発現抑制が報告されており (Cancer Cell 2010)、さらに、同論文では EZH2 の発現には転写調節因子 E2F が大切であることも示されている。TG2 は E2F の分解を防ぐことで細胞内での安定性を亢進することが知られており (FEBS J 2011)、TG2 が E2F ↑⇒EZH2 ↑⇒VASH1 ↓という分子機構で VASH1 の発現を抑制している可能性が考えられ (上図)、今後検証していく。

TG2 が腫瘍組織で高発現している報告と考え合わせ、“腫瘍血管内皮細胞では (正常血管内皮細胞に比べて) VEGF 刺激の量が多いので、本来 (正常血管内皮細胞に比べて) 多量の VASH1 発現が誘導されるべきところ、TG2 発現量が高いために思ったほど VASH1 の発現は高くなり、腫瘍血管形成が助長される。TG2 を KO するとこの仕組みが解除され VASH1 発現が一挙に高まるために腫瘍血管新生が強く抑えられる。”という仮説をたてた。この作業仮

説を証明するために現在 TG2(+/-)VASH1(+/-)ダブル KO マウスを作製中である。TG2 KO マウスで観察される腫瘍血管欠損が VASH1 のダブル KO によりレスキューされるかどうかを平成 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

TG2 は老化に伴い発現が上昇することが知られている酵素である。米国テキサス大 MD Anderson 癌センターの Kapil 教授らのグループを中心に TG2 がその scaffold 活性により癌細胞の生存を維持するのに働いていることが矢継ぎ早に報告され (Can Res 2008, 2009)、老化に伴う癌の増大に TG2 が働いていることが示唆されている。本研究は、これに加えて、老化に伴う腫瘍血管新生にも TG2 が働いており、その作用は TG2 による VASH1 の腫瘍血管新生抑制機能の低下によることを、動物モデルを用いて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と共に、TG2 による VASH1 の発現抑制反応を阻害する低分子薬剤を用いた新しい予防・治療法の開発につながることを期待される。なによりも夢の技術と思われていた腫瘍血管選択的な抑制技術の開発に繋がることが大いに期待できる。小嶋研で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佐藤研における 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。

[4] 成果資料

該当なし