

## 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：

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 131,460円

旅費 68,540円

### [2] 研究経過

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に働くバソヒビン(VASH) 1 がどのように関与するのかを解明することを目的とし平成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 Gln 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、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手承を得た。

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。

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 TG2 (+/-) LSEC では、TG2 (+/+) LSEC に比べて VASH1 遺伝子発現量が73倍高いことが示唆された。

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 (TEC) と正常血管内皮細胞 (NEC) 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。

平成24年6月1日に北海道大学との共同研究契約を締結し、8月7日に TEC と NEC を理研に送っていただき、解析に供した。

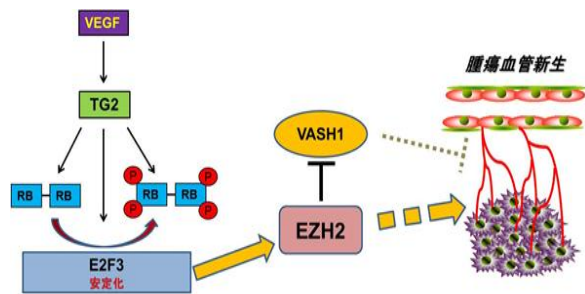
平成22年(2010年)8月号の Cancer Cell に報告されたポリコーム群タンパク質の1つである Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2 : ヒストンメチル化酵素) による VASH1 発現抑制に注目した。

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た。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という仮説の実証に取り組んだ。

平成 24 年 12 月 6 日に徳島で開催された第 20 回日本血管生物医学会学術集会にて李がその成果を発表し、YIA を受賞した。

平成 25 年 3 月 2～3 日に蔵王にて開催された第 8 回 Vasohibin 研究会に小嶋と李が参加し、最新の結果を報告し、佐藤、鈴木とディスカッションした結果、3 年間の共同研究によって明らかにした TG2/RB 架橋リン酸化/E2F 転写因子活性化/EZH2 発現促進/VASH1 発現抑制/腫瘍血管維持経路 (下図) を論文にまとめることとなり、4 月 12 日に小嶋と李が加齢研を訪問し、討論し、論文を完成させ、連休前後での投稿することとなった。

### <腫瘍血管形成における TG2 による VASH 発現抑制>



### [3] 成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、TG2 による RB タンパク質の架橋・リン酸化修飾による転写因子 E2F 活性化、EZH2 発現誘導、VASH1 発現抑制が腫瘍血管新生に必須であることを TG2(+/+) 由来肺動脈内皮細胞並びに TG2(-/-) 由来肺動脈内皮細胞を用いて実証した。

第 2 に TEC と NEC における TG2 と VASH1 の発現量を調べたところ、NEC に比べて TEC では、TG2, E2F, EZH2 の発現が上昇しており、逆に VASH1 の発現が低いという上述の結論を強める結果を得た。

第 3 に TG2 VASH1 ダブル KO マウスを作製した。

以上の結果から、TG2/RB 架橋リン酸化/E2F 転写因子活性化/EZH2 発現促進/VASH1 発現抑制/腫瘍血管維持経路が TG2 KO マウスでは損なわれ、VASH1 の発現をネガティブに制御している転写調節因子 EZH2 の発現が減少しているために VASH1 の発現が亢進し、腫瘍血管形成が阻害されていることを示した。TG2 が腫瘍血管新生の新たな標的であることを示唆した。

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 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。”という結論が示唆された。この作業仮説を証明するために今年度作製した TG2(-/-) VASH1(-/-) ダブル KO マウスを用い、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調べる。

さらに、TG2-VASH1 ダブル KO マウスや、シングル KO マウス由来の内皮細胞を単離し、hVASH1 プロモーター-ルシフェラーゼリポーター遺伝子を発現する安細胞株を作製し、同細胞株を用いて、TG2/RB 架橋リン酸化/E2F 転写因子活性化/EZH2 発現促進/VASH1 経路の下流で働く、VASH1 の転写調節機構を共同で調べるとともに、TG2/RB 架橋リン酸化/E2F 転写因子活性化/EZH2 発現促進/VASH1 抑制経路、並びにその下流をコントロールする化合物 (TG2 KO 効果をレスキューする化合物や TG2 の効果をミミックする化合物) をスクリーニングし、その効果 (腫瘍血管特定制御効果) を腫瘍移植動物モデルで検証する新たな段階の共同研究をスタートする計画である。

### (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抑制技術の開発に繋がるの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