

腫瘍血管新生特異的制御技術の共同研究

[1] 組織

代表者：小嶋 聡一
(理化学研究所
ライフサイエンス技術基盤研究センター)
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
ライフサイエンス技術基盤研究センター)
鈴木康弘 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 218,280 円，旅費 81,720 円

[2] 研究経過

過去3年間の共同研究で見出した架橋酵素トランスグルタミナーゼ2 (TG2) によるバソヒビン1 (VASH1)発現抑制を介する腫瘍血管形成維持の詳細な分子機構を解明し得られた知見を基に腫瘍血管新生特異的制御技術の開発を共同で進める。

TG2はLys-Gln残基間に架橋結合を形成する酵素であり、細胞の増殖、分化、アポトーシスに関わることが知られていたが、血管新生に対する役割については不明であった。小嶋は、障害肝においてはTG2が核に移行し、肝細胞の生存に必須のc-Met遺伝子発現を制御する転写因子Sp1を架橋・不活性化の結果、細胞死が誘導されることを見出した(Gastroenterol 2009; J Cell Physiol 2012)。一方、TG2は、細胞質ではGTPaseとして働き、細胞膜内外でScaffold活性を発現し細胞の生存を高めること、さらにPDI活性やリン酸化活性を有することも報告されている(Physiol Rev 2009)。TG2が血管新生にどのように働くのかを確かめるために、TG2 KOマウスの背にヒト肺癌細胞を移植しその周囲で形成される腫瘍血管新生を観察(DASアッセイ)したところ、WTに比べKOでは、腫瘍血管新生の著しい欠損を観察した。同様な結果は、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た。

その様子は、マウスにVASH1アデノウイルス発現ベクターを投与した際のフェノタイプ(Am J Pathol 2009)と類似していることから、平成22年度より3年間共同研究を実施した。その結果、TG2 KOマウス由来血管内皮細胞では、腫瘍血管新生の抑制に働くVASH1の発現を負に制御している転写調節因子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) (Cancer Cell 2011)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見出し、TG2-VASH1

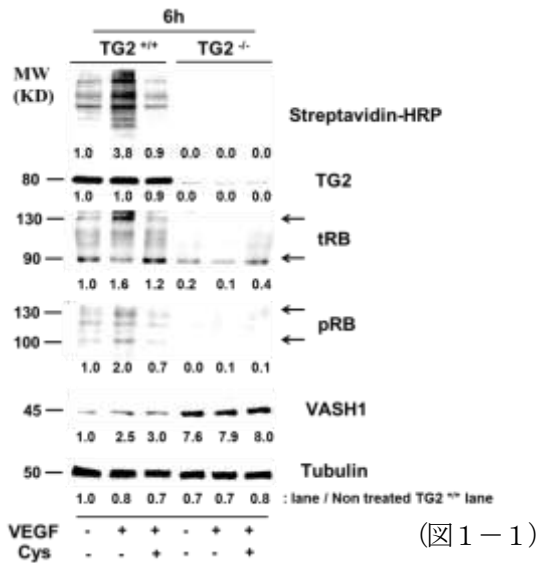
ダブルKOマウスを作製した。さらに、EZH2の上流で働くE2Fの細胞内での安定化をTG2がE2Fの分解を防ぐことで亢進することが知られており (FEBS J 2011)、TG2によるRBタンパク質の架橋・リン酸化がE2Fの活性化に働いていることを見出し、TG2/RB架橋リン酸化活性化/E2F転写因子活性化/EZH2発現促進/VASH1発現抑制/腫瘍血管維持経路がTG2 KOマウスでは損なわれているために腫瘍血管形成がなくなっていることを提唱し、ここまでの結果を李が2012年暮れの血管生物医学会並びにトランスグルタミナーゼ研究会で発表し、奨励賞を受賞した。2013年1月11日加齢研で開催された第9回Vasohibin研究会で報告すると共に、論文投稿に向けて押えのデータを収集している。

新たな共同研究では、共同開発したTG2-VASH1ダブルKOマウスや同マウス由来血管内皮細胞を用い、TG2によるVASH1発現抑制を介する腫瘍血管形成維持の詳細な分子機構を調査・解明し、得られた知見を基に、共同で腫瘍血管新生特異的な制御技術を開発する。

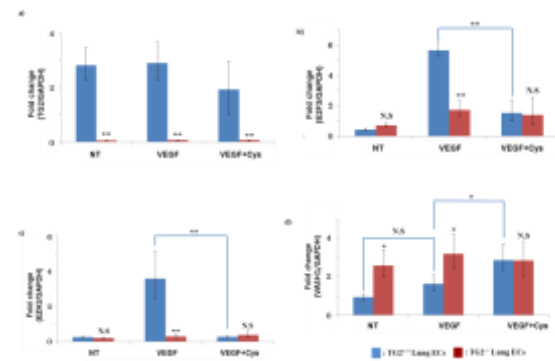
[3] 成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

WTマウスとTG2 KOマウスから肺血管内皮細胞を単離し、Affymetrix GeneChip解析をしたところ、TG2 KOでは、WTに比べVASH1発現量が7.6倍高いことが示唆され、qPCR、並びにウエスタンブロッティングにより確かめられた (図1-1, 1-2)。

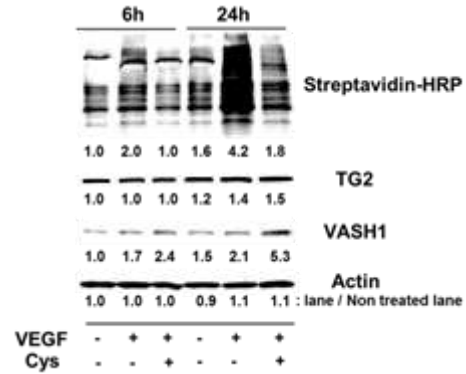


(図1-1)



(図1-2)

論文投稿に向けて、ドラフトを TG2 KO マウスを
 作製した Graham 教授 (豪) にみていただいたところ、
 Cancer Cell 等一流誌に載せるためには、
 TG2/RB 架橋リン酸化/E2F 転写因子活性化
 /EZH2 発現促進/VASH1 発現抑制の現象を示すだけ
 では不十分で、それぞれの因果関係を loss of
 function/gain of function できちっと証明しなくては
 ならないとのコメントを頂戴した。もともと論文
 のデータ取得に用いていた肺動脈内皮細胞は、実験
 に用いる量の細胞を取得するのに3か月かかるので、
 代用できる細胞株を探したところ、マウス由来動脈
 内皮細胞である MAEC が使えることを見出した。
 すなわち、この細胞では VASH1 のタンパク質発現
 量は TG2 の活性によってマイナスに制御されてお
 り、阻害剤の VEGF+シスタミン処理によって
 VASH1 の発現が VEGF 単独処理時よりも亢進する
 のを確認した (図2)。しかしながら、MAEC は遺
 伝子導入効率が極めて悪いので、siRNA を用いた
 RB, E2F, EZH2 の遺伝子ノックダウンの代わりに
 現在 RB, E2F, EZH2 の各活性阻害剤を用いて、loss
 of function データを取得中である。



(図2)

TG2-VASH1 ダブル KO マウスや、VASH1 シン
 グル KO マウス由来の内皮細胞を単離し、hVASH1
 promoter-LUC vector を発現する stable cell line
 作製を試みた。しかしながら、GATA 結合サイ
 トを含むこれまで単離されたプロモータ領域だけ
 では、ルシフェラーゼの発現をみることができな
 かった。そこで、現在適宜エクソンも取り入れ
 たコンストラクトを作製中である。

Prognoscan データベースを利用し、TG2-
 VASH1 の発現と様々な腫瘍患者の予後との関
 係を検索したところ、TG2 高発現、並びに
 VASH1 低発現の患者の予後が悪いことがわ
 かった。

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たも
 のであり、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