

## 腫瘍血管新生特異的制御技術の共同開発

### [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、東北大学加齢研)

古谷 裕

(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 15万9千460円,

旅費 14万540円

### [2] 研究経過

架橋酵素トランスグルタミナーゼ2 (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。そこで、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の傾向がみられた。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、マウスにバソヒビン1 (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4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タンパク質の架橋がE2Fの活性化に働いていることを見出し、TG2/RB架橋活性化/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。毎年1月に加齢研で開催されるVasohibin研究会で報告すると共に、論文投稿に向けて再現性のデータを収集しつつある。

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とともに、肝線維化におけるVASH1の関与を調査した。近年、血管新生と肝線維化との間に相関関係があることが報告され始めており、血管新生抑制因子VASH1欠損マウスを用いて肝線維化と血管新生との関係を調べることを目的とした。

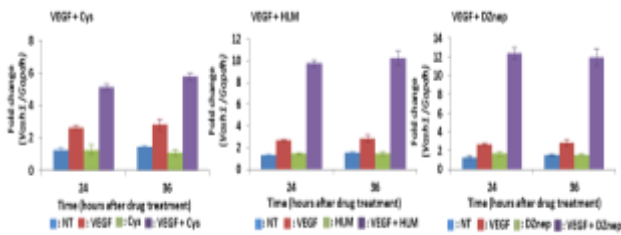
### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

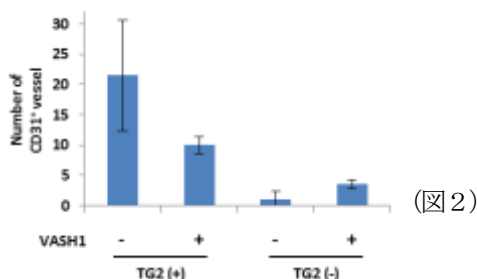
論文投稿に向けて、ドラフトをTG2 KOマウスを作製したGraham教授(豪)にみていただいたところ、TG2/RB架橋活性化/E2F転写因子活性化/EZH2発現促進/VASH1発現抑制の現象を示すだけでは不十分で、それぞれの因果関係をloss of function/gain of functionで正確に証明しなくてはならないとコメントを頂戴した。もともと論文のデータ取得に用いていた肺動脈内皮細胞は、実験に用いる量の細胞を取得するのに3カ月かかるので、代用できる細胞株を探したところ、マウス由来動脈内皮細胞であるMAECが使えることを見出した。この細胞ではVASH1のタンパク質発現量はTG2の活性によって負に制御されており、VEGF+TG2阻害剤シタミン処理によってVASH1発現がVEGF単独処理時よりも亢進するのを確認した(図1A)。E2F活性阻害剤HLM006474やEZH2活性阻害剤DZnepを用

いて、TG2によって抑制される VASH1 の発現が回復する結果を得た (図1 B,C)。(李)

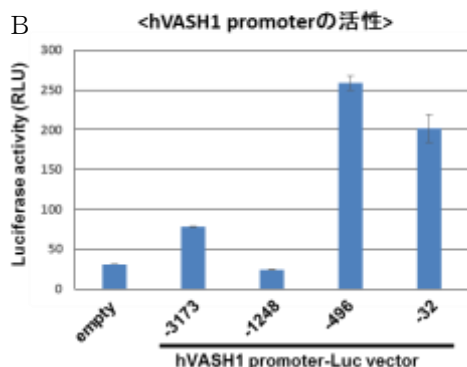
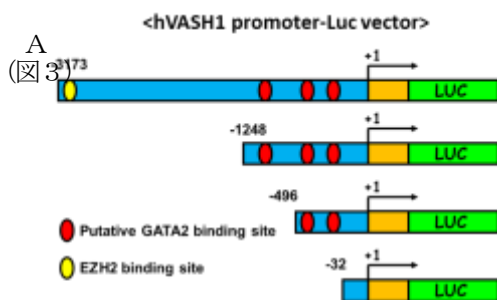
(図1) A B C



北大の樋田泰浩先生から肺がん患者の組織を供与していただき、肺がんの組織の VASH1 と TG2 の発現を免疫染色法で確認した。その結果、肺がん組織の血管内皮細胞で VASH1 発現量と TG2 発現量の間には逆相関があることを見出した (図2)。(小嶋)



ヒト臍帯静脈内皮細胞から RNA を抽出し、5'RACE 法にて VASH1 mRNA の転写開始点を同定した。その情報をもとに、転写開始点の上流・3173bp (EZH2 標的配列を含む) から Exon1 を含めたプロモーター領域を新たにクローニングして分泌性ルシフェラーゼのレポーターベクターを作製した (図3A)。マウス不死化内皮細胞株 MS1



細胞に導入してプロモーター活性の評価を行った結果、-496bp から Exon1 の一部を含む領域が VASH1 遺伝子のプロモーター活性に重要な領域であることがわかった (図3B)。現在、作製したレポーターベクターを用いて、VASH1 の転写調節機構の解析を進めるとともに、同レポーターベクターを安定導入した内皮細胞株の作製を試みている。(鈴木・李)

VASH1 は血管新生抑制因子であるため、この欠損マウスは血管新生を促進すると共に肝線維化も相乗的に進行していくと仮定して肝線維化モデルを作製し実験を行った。VASH1 欠損マウスと野生型マウスを用いて胆管結紮を行い、14 日後に肝臓と血液を採取し、血液から血漿を分取し、ALT と AST を測定した。また、肝臓から total RNA を精製し、定量 PCR によりコラーゲン I  $\alpha$ 1 mRNA 発現量を測定し、さらに肝ハイドロキシプロリン量を定量した。肝組織切片を Sirius red により染色し肝線維化領域を計測した。また、血管内皮細胞のマーカー CD31 の発現を抗体染色により解析した。

これらの実験から、肝障害、肝線維化、CD31 の染色性のすべてが胆管結紮により有意に上昇したが、胆管結紮した野生型マウスと VASH1 欠損マウスとの間では有意差はなかった。(古谷)

#### (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が期待される。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