

肝線維化・肝癌における vasohibin 発現制御機構と機能の解析

[1] 組織

代表者：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)

対応者：佐藤 靖史

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：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)

寺岡 龍太郎

(理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター)

研究費：物件費 275,440 円、

旅費 24,560 円

[2] 研究経過

肝癌は国内だけでも年間3万人が死亡し、100万人以上の患者がいる。これらの癌患者の多くが肝線維化を介して肝癌へと至るので、肝線維化を抑制し、さらには肝癌への進行を抑えることが非常に重要である。また、いくつかの論文で肝線維化と血管新生との間に相関関係があると報告され、血管新生を抑制することにより肝線維化も抑制できることが示唆された(Sakata et al. BBRC 2014)。この様に肝線維化と肝癌を制御するためには血管新生の分子機構を調べ、低分子化合物や siRNA による発現制御を介して血管新生をコントロールすることが欠かせない。本共同研究では、肝線維化モデルや肝癌モデルを用いて、肝線維化と肝癌における血管新生制御因子 vasohibin-1, -2 の働きを明らかにし、血管新生と肝

疾患との関係を示すことを目的とし研究を行った。

本年度の研究活動の状況として、以前に佐藤教授より供与して頂いた vasohibin-1 ノックアウトマウスを用いて肝線維化モデルを作製し vasohibin-1 の機能を解析した。また、肝線維化モデルマウスにおいて vasohibin-1, -2 共に mRNA 発現量が上昇することを見出した。これらの発現細胞を同定するために佐藤教授より抗 vasohibin-1, -2 モノクローナル抗体の供与を受け、マウス肝線維化モデル、ラット線維化モデル及びラット肝癌モデルで抗体染色を行った。この抗体染色実験により抗 vasohibin-1, -2 モノクローナル抗体はマウス肝組織において vasohibin-1, -2 共に検出できないことが明らかとなった。このことからマウス vasohibin-1, -2 を検出するためのウサギポリクローナル抗体を作製することにし、ペプチド抗原を作製するための最適な抗原部位に関する情報を佐藤教授と鈴木助教より入手し、ペプチドを合成しウサギポリクローナル抗体の作製を開始した。第11回 Vasohibin 研究会に参加し vasohibin-1, -2 の肝線維化と肝癌モデルマウスにおける発現と局在に関して発表し、佐藤教授と鈴木助教とディスカッションし今後の研究方針を策定した。

また、分担者である小嶋が加齢医学研究所を訪問し、佐藤教授とトランスグルタミナーゼ2(TG2)による vasohibin-1 の発現制御について研究打合せを行った。TG2は転写因子ポリコム群タンパク質の1つである Enhancer of zone homologue 2(EZH2)を介して vasohibin-1 の発現を抑制することにより血管新生を亢進していると考えられ、このシグナル

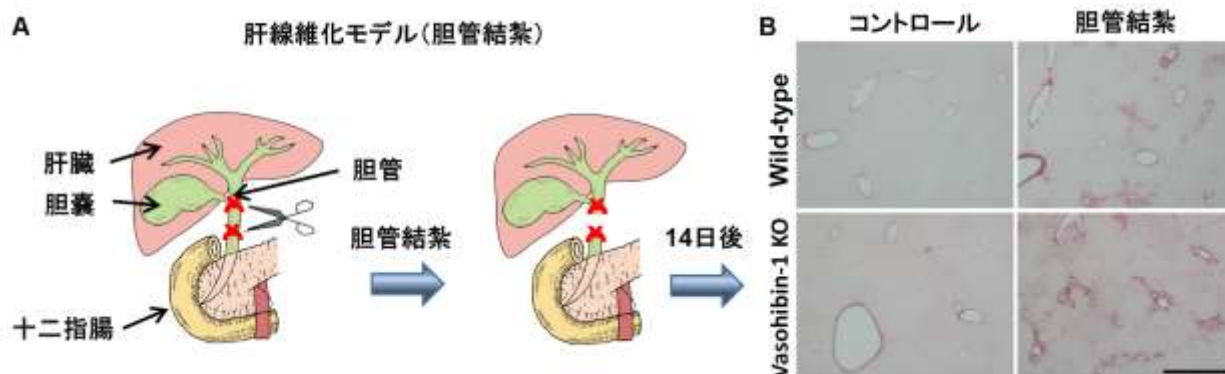


図1、(A)胆管結紮による肝線維化モデル作成方法(左)。(B)シリウスレッドで染色された肝線維化領域を wild-type と vasohibin-1 ノックアウトマウスとの間で比較したが有意な差はなかった。

伝達系を示すために TG2 と EZH2 の阻害剤をマウス由来の動脈内皮細胞 (MAEC) に処理し vasohibin-1 の発現量を解析した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、vasohibin-1 ノックアウトマウスを用いて肝線維化モデルを作製した結果、vasohibin-1 の loss-of-function による肝線維化への影響はないことを明らかにし、結果を論文にまとめ BBRC より出版された。また、これらの結果を第 47 回 日本結合組織学会学術大会で発表した。

第2に、肝線維化モデルにおいて vasohibin-1,-2 mRNA の発現が上昇することを明らかにしたが、vasohibin-1 はマウスとラット肝組織において抗体により染色されなかった。ラット肝線維化モデルを用いて抗体染色を行い、vasohibin-2 は肝線維化により促進される擬胆管形成に伴い増加する小葉間動脈に局在していることを示した。このために肝線維化と共に mRNA 量が増加していると示唆された。

Anti-VASH2抗体によるラット肝線維化モデルの染色

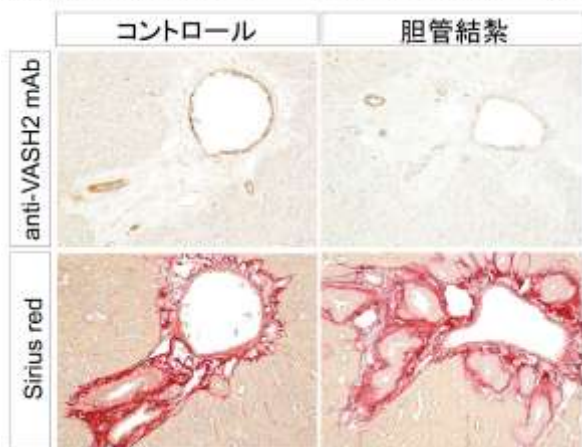


図2、胆管結紮によるラット肝線維化モデル。胆管結紮により擬胆管と小葉間動脈が増加し、これに伴い vasohibin-2 の発現量が増加すると考えられた。

第3に、マウス vasohibin-1,-2 に対する抗体を作製するために抗原性が高い最適な抗原部位の情報を入手し、これらの部位に対するペプチドを合成し、ウサギポリクローナル抗体の作製を開始した。

第4に、MAEC を用いて TG2 による vasohibin-1 の発現制御機構を解析したが、TG2 と EZH2 の阻害剤処理により vasohibin-1 の発現上昇は確認できなかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、vasohibin-1,-2 の肝線維化と肝癌で

の働きを明らかにすることにより、血管新生の制御を可能とし、肝線維化とこれに続く肝癌の抑制を目指す萌芽的研究である。Vasohibin-1,-2 は肝線維化と肝癌における新たな創薬ターゲットとなりうる分子で、今後の共同研究により我々が持つドラッグスクリーニングの系を用いて、抗肝線維化剤や抗癌剤の開発に発展すると期待できる。

[4] 成果資料

(1) Y. Furutani, Y. Shiozaki-Sato, M. Hara, Y. Sato, S. Kojima "Hepatic fibrosis and angiogenesis after bile duct ligation are endogenously expressed vasohibin-1 independent"

Biochem Biophys Res Commun. 2015. 463: 384-388

(2) Y. Furutani, S. Kojima "Control of TG functions depending on their localization"

Transglutaminase-multiple functional modifiers and targets for new drug discovery. Springer, Chapter2, (Editor; K. Hitomi and S. Kojima) DOI: 10.1007/978-4-431-55825-5_2

(3) M. Hara, I. Inoue, Y. Yamazaki, A. Kirita, T. Matsuura, S.L. Friedman, D.B. Rifkin, S. Kojima. "L(59) TGF-β LAP degradation products serve as a promising blood biomarker for liver fibrogenesis in mice."

Fibrogenesis Tissue Repair. 2015. 15:8:17.

(4) XY. Qin, S. Fujii, A. Shimizu, H. Kagechika, S. Kojima.

"Carboxylic Derivatives of Vitamin K2 Inhibit Hepatocellular Carcinoma Cell Growth through Caspase/Transglutaminase-Related Signaling Pathways."

J Nutr Sci Vitaminol. 2015. 61(4):285-90.

(5) XY. Qin, H. Tatsukawa, K. Hitomi, Y. Shirakami, N. Ishibashi, M. Shimizu, H. Moriwaki, S. Kojima.

"Metabolome analyses uncovered a novel inhibitory effect of acyclic retinoid on aberrant lipogenesis in a mouse diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis model."

Cancer Prev Res. 2016. 9(3):205-14.