

課題番号 63

肝線維化マウスモデルを用いたVasohibin-2の機能解析（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：消耗品費 300 千円、 旅費 0 千円

[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。これらの患者は肝線維化を介して肝癌に至るので、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、血管新生と肝線維化は並行して起こることが知られており(図1)、肝線維化のみならず血管新生を抑制することが有効な治療法となると考えられた。Vasohibin は血管新生を調節する因子として知られており、血管新生を抑制する効果を持つ Vasohibin-1 と血管新生を促進する効果を持つ Vasohibin-2 からなり、これらの2つの Vasohibin の発現を調節することにより肝線維化を抑制できると考え佐藤教授と共同研究を行っている。

肝線維化と血管新生は並行して起こる

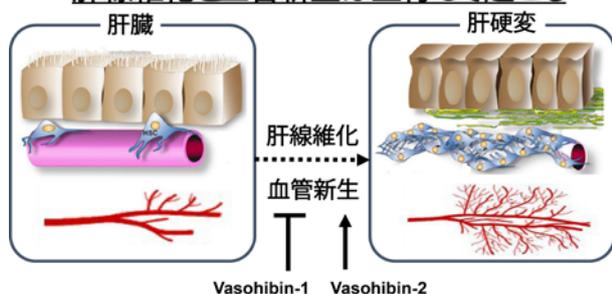


図1、肝線維化と血管新生は並行して起こることが知られている。また、Vasohibin-1 は血管新生を抑制するが、逆に Vasohibin-2 は血管新生を促進する。

CochらはVasohibin-1を肝臓で過剰発現させると肝線維化を抑制できることを報告した(Coch et al. Hepatology, 2014)。また、我々は佐藤教授より供与して頂いたVasohibin-1欠損マウスと野生型マウスを用いて肝線維化モデルを作製し比較したところ、血管新生と肝線維化にはVasohibin-1を欠損させても影響が無かったことから(Furutani et al. BBRC, 2015)、過剰発現させたときにのみ肝線維化を抑制することが明らかとなった。肝線維化モデルの肝臓においてVasohibin-1とVasohibin-2の両方のmRNA発現量が上昇することを示しており、Vasohibin-1のみでなくVasohibin-2も肝線維化に関与すると考えられた。そこで、佐藤教授よりVasohibin-2欠損マウスの供与を受け、肝線維化モデルマウスを作製し、肝線維化におけるvasohibin-2の機能解析を開始している。Vasohibin-1,2の遺伝子発現の調節により肝線維化を制御する際に、発現細胞の同定は欠かす事ができないので、Vasohibin-1とVasohibin-2をそれぞれ特異的に認識するポリクローナル抗体を作製し、これらを用いた抗体染色により発現細胞を同定した。

第12回Vasohibin研究会に参加し、佐藤教授と鈴木助教と抗Vasohibin-1,-2抗体の特異性の確認についてディスカッションを行った。

[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。

第1に昨年度の終わりに佐藤教授、李研究員よりマウスVasohibin-1,-2の抗原ペプチド作製部位に関する情報を頂き、Vasohibin-1,-2のそれぞれのN末とC末の配列を基に作製したVasohibin-1-N,-C, Vasohibin-2-N,-C合計4本のペプチドを合成した。本年度はこれらの抗原ペプチドをウサギに免疫し、抗血清を得た。

第2に抗血清とこれに含まれる抗体の特異性を確認した。ELISAにより抗血清が抗原ペプチドを認識することを確認した。また、鈴木助教に依頼し組換えVasohibin-1,-2蛋白質との反応性をELISAにより確認して頂いた結果、抗Vasohibin-2-N抗血清のみ組換えVasohibin-2蛋白質を検出でき、抗Vasohibin-2-N抗血清は未変性の蛋白質を検出でき

ることが解った。また、これらの抗血清から抗原としたペプチドを用いてアフィニティー精製を行い、抗体を精製した。これらの精製抗体または抗血清を用いてウェスタンブロットにより組換え Vasohibin-1,2 を検出すると、anti-Vasohibin-1-C と anti-Vasohibin-2-N 抗体もウェスタンブロットで組換え蛋白質をそれぞれ特異的に検出できることが解った (図2)。

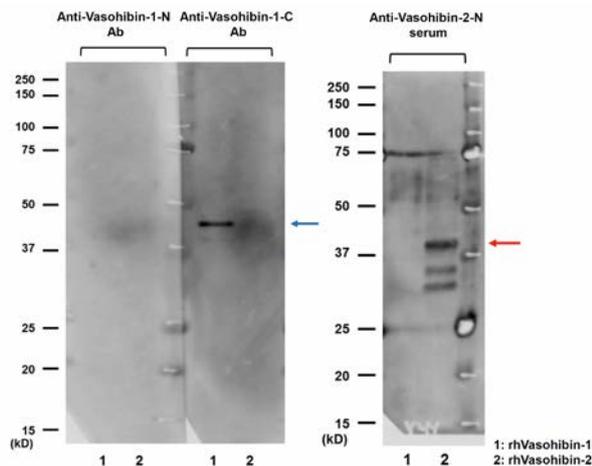


図2、ウェスタンブロットによる抗体の特異性の確認。Anti-Vasohibin-1-C抗体とAnti-Vasohibin-2-N血清は組換え Vasohibin-1 または-2 蛋白質をそれぞれ特異的に認識する。

第3に精製抗体を用いて胆管結紮による肝線維化モデルマウス肝臓での Vasohibin-1, -2 発現細胞を解析した。抗体染色で anti-Vasohibin-1-C により中心静脈周囲の肝細胞が染色され、anti-Vasohibin-2-N により血管周辺の肝細胞と動脈内皮細胞と偽胆管が染色された (図3)。これらの細胞が発現細胞と考えられた。

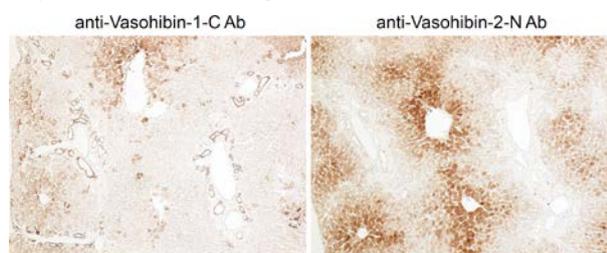


図3、抗体染色による発現細胞の同定。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で作製した抗 Vasohibin-1, -2 抗体は、モノクローナル抗体では染色が難しかったマウス切片での染色を可能とし、Vasohibin-1, -2 の局在を様々な病態モデルマウス組織切片で明らかにできる。Vasohibin 研究会のネットワークを用いて様々な研究者に利用してもらい Vasohibin の機能解明に貢献

でき、更には病態モデルを用いた治療法の開発が期待できる。

また、本研共同研究の結果を基にして、血管新生と肝線維化の制御に関する研究課題を発展させ、科学研究費補助金基盤 (C) の獲得につながった。

[4] 成果資料

- (1) R. Norita, Y. Suzuki, Y. Furutani, K. Takahashi, Y. Yoshimatsu, K. A. Podyma-Inoue, T. Watabe, and Y. Sato “Vasohibin-2 is required for epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by modulating TGF- β signaling” **Cancer Science in press** (2017)
- (2) R. Teraoka, M. Hara, K. Kikuta, Y. Hirooka, Y. Furutani, T. Shimosegawa, A. Masamune, S. Kojima “Plasma Kallikrein-dependent TGF- β Activation in Patients With Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer” **Pancreas** 46: e20-e22 (2017)
- (3) Y. Furutani, M. Toguchi, R. Shrestha, S. Kojima “Phenosafranin inhibits nuclear localization of transglutaminase 2 without affecting its transamidase activity” **Amino Acids** 49:483-488 (2017).
- (4) H. Tatsukawa, Y. Furutani, K. Hitomi, S. Kojima “Transglutaminase 2 plays opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death” **Cell Death & Disease** 2;7(6):e2244 (2016)