

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)

研究費：消耗品費 300 千円，旅費 0 千円

[2] 研究経過

肝癌により国内だけでも年間3万人が死亡し、100万人以上の患者がいる。これらの肝癌患者は肝線維化を介して肝癌へと至るので、肝線維化を抑制すると共に、更に肝癌の進行を抑えることが非常に重要である。一般的に、肝線維化と血管新生は並行して起こることが知られており、血管新生調節因子である vasohibin-1,-2 の発現量を調節することにより肝線維化を抑制出来ると考えた (図1)。

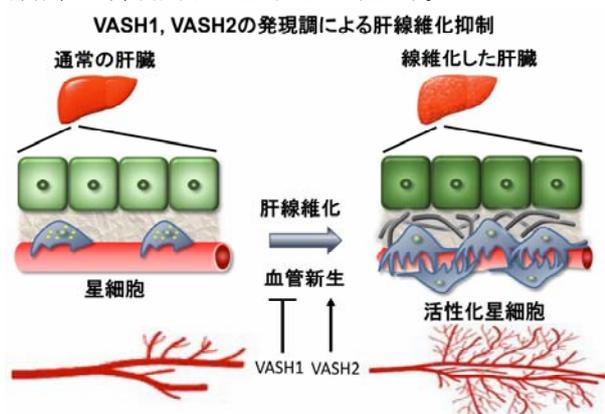


図1、肝線維化と血管新生は並行して起こることが知られている。Vasohibin-1 (VASH1)は血管新生を抑制し、一方 vasohibin-2 (VASH2)は血管新生を促進する。

肝線維化・肝癌と血管新生とのクロストークに関する研究・開発は、近年重要性を増している。本共同研究では、Vasohibin の発現量を調節することにより、血管新生と肝線維化を抑制することを目的として佐藤教授と共同研究を行った。

[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。まず第1に、佐藤教授より分与して頂いた vasohibin-2 欠損マウスを用いて胆管結紮(bile duct ligation, BDL)による肝線維化モデルを作製し、vasohibin-2 の働きを調べた。シリウスレッド染色により肝線維化領域を可視化し、肝線維化の進行度をコラーゲン I α 1 mRNA の発現とヒドロキシプロリン量を測定し定量した。Vasohibin-2 欠損マウスでは野生型マウスと比較してコラーゲン I α 1 mRNA の発現とヒドロキシプロリン量が増加する傾向があった (図2)。

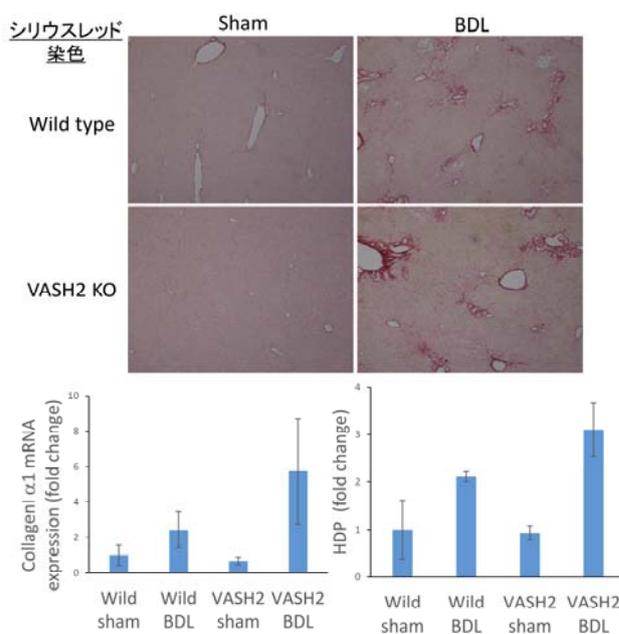


図2、Vasohibin-2 (VASH2)欠損マウスを用いた肝線維化モデルの解析。野生型(Wild)と vasohibin-2 欠損マウス(VASH2)を用いて胆管結紮(BDL)による肝線維化モデルを作製し、シリウスレッド染色、コラーゲン I α 1 mRNA の発現、ヒドロキシプロリン量を比較した。

第2に、vasohibin-1,-2 に対するポリクローナル抗体を作製し、抗体の特異性を調べた。昨年度の佐藤教授との共同研究で、vasohibin-1,-2 それぞれ N 末と C 末の配列から抗原ペプチドを設定し、ウサギポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体の特

異性を脳と精巣など vasohibin-1,-2 が高発現している組織を用いてウェスタンブロットと抗体染色により調べた。ウェスタンブロットでは予想される分子量の位置にバンドが観られず特異性は確認できなかった (図3)。また、抗体染色でも染色の特異性を確認できなかった (図4)。新たに N 末側 2 か所と C 末側 1 か所の配列を基にしたペプチドを合成し、これらのペプチドを抗原としたポリクローナル抗体を作製した。これらの抗血清は確かに抗原となるペプチドを認識することを確認した。

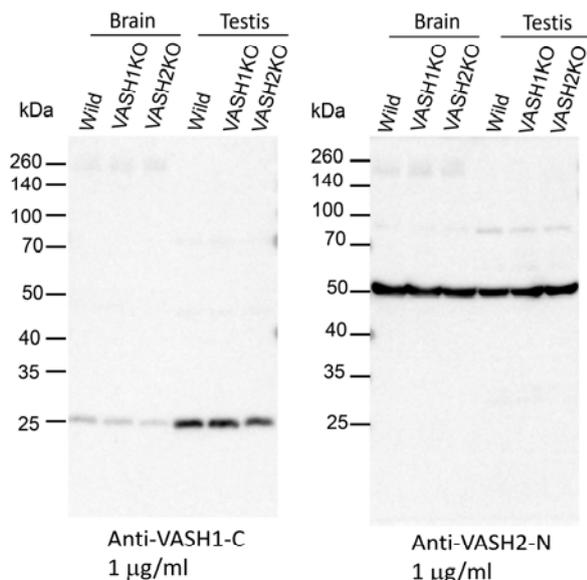


図3、抗 VASH-1-C 抗体と抗 VASH-2-N 抗体のウェスタンブロッティングによる解析。野生型(Wild)、VASH1 欠損(VASH1KO)、VASH2 欠損(VASH2KO)マウスの脳と精巣より蛋白質を抽出し抗体の特異性を調べた。

第3に、vasohibin-1, vasohibin-2, SVBP を肝臓特異的に高発現するトランスジェニックマウスを作製するために、マウス vasohibin-1,-2 と SVBP の配列を含むベクターを鈴木助教より供与を受けた。この配列を基にして、アルブミンプロモーターの制御下で vasohibin-1,-2, SVBP をそれぞれ発現できるコンストラクトを作製した。

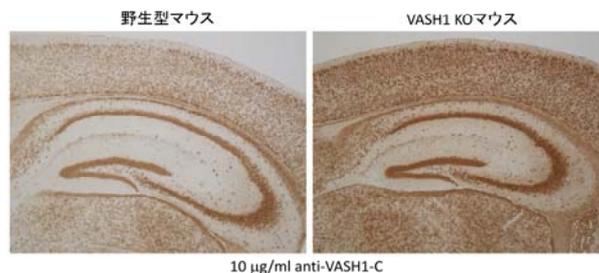


図4、抗 VASH-1-C 抗体を用いた脳切片の抗体染色。野生型、VASH1 欠損(VASH1 KO)マウスの脳切片を用いて抗体染色を行った。

第13回 Vasohibin 研究会に参加し佐藤教授と鈴木助教と研究打合せを行い、今後の研究方針を決めた。

(3-2) 波及効果と発展性など

Vasohibin-1,-2 を過剰発現するトランスジェニックマウスと発現を抑制したノックアウトマウスとの比較により、血管新生と肝線維化を同時に制御する方法を見出すことができ、肝線維化・肝癌抑制法の新たな提案ができると考えている。また、当共同研究で作製している抗体は特異性を確認した後に、Vasohibin 研究会に参加するメンバーだけでなく国内外の研究者に供与し、vasohibin が関与する癌領域の研究を大きく発展させることができる。

[4] 成果資料

- 1) X. Y. Qin, M. Hara, E. Arner, Y. Kawaguchi, I. Inoue, H. Tatsukawa, Y. Furutani, K. Nagatsuma, T. Matsuura, F. Wei, J. Kikuchi, H. Sone, C. Daub, H. Kawaji, T. Lassmann, M. Itoh, H. Suzuki, P. Carninci, Y. Hayashizaki: FANTOM consortium, N Kokudo, ARR Forrest, S. Kojima “Transcriptome Analysis Uncovers a Growth-Promoting Activity of Orosomucoid-1 on Hepatocytes” **EBioMedicine** 24: 257-266 (2017)