

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2013～2014  
課題番号：25870070  
研究課題名(和文)血管新生抑制因子Vasohibin-1受容体の同定とそのシグナル機構の解明  
  
研究課題名(英文)Vasohibin-1 signaling mechanism  
  
研究代表者  
小林 美穂 (Kobayashi, Miho)  
  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
  
研究者番号：50630539  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規血管新生ネガティブ・フィードバック調節因子Vasohibin-1(VASH1)はVEGF、FGF2やPDGF等の血管新生促進因子に対して広く抑制効果を示す。本研究により、VASH1は脱チロシン化型 $\beta$ -チューブリン(Glu- $\beta$ -チューブリン)を増加させ、VEGF受容体2(VEGFR2)の細胞内取り込みを阻害することでVEGFシグナル伝達を抑制し血管新生を抑えるという新規抗血管新生機構を明らかにした。さらに、VASH1はFGF2シグナル伝達も同様な機構を通して抑制することを見出した。したがって、VASH1-Glu- $\beta$ -チューブリン経路を用いた新しい抗腫瘍血管新生療法の開発の手がかりを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Major target of anti-cancer therapy is VEGF, but its therapeutic approach gave several issues such as a switching to other angiogenic factors from VEGF, and causes vessel disorder in other normal tissue. Vasohibin-1 (VASH1) is a VEGF- or FGF2-inducible anti-angiogenic factor that plays a role of negative feedback regulator on angiogenesis by broad angiogenic factors. VASH1 potently induces increase in detyrosination of  $\beta$ -tubulin in endothelial cells (ECs). This study revealed that VASH1 simultaneously induced Glu-tubulin increment, inhibition of VEGF-signaling, VEGF-inducible ECs migration and network formation. Co-expression of TTL (tubulin tyrosine ligase), normalized the level of Glu-tubulin, and abrogated the VASH1-induced suppression both of VEGF-signaling and VEGF-induced angiogenesis. Thus, I propose that VASH1 induces inhibition of VEGF-signaling and angiogenesis through the bias of a tubulin tyrosination/detyrosination cycle.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：血管新生 Vasohibin-1 VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

がん微小環境において血管新生は治療の重要なターゲットとして盛んに研究されているが、その調節機構の全貌は未だ不明な点が多く、現在でも腫瘍血管新生を効果的に制御する方法の確立までには至っていない。現在、抗血管新生療法として血管内皮増殖因子 (VEGF) シグナル伝達遮断薬が導入されているが、正常血管内皮細胞への障害による副作用やVEGF以外の血管新生促進因子への依存性置換による薬剤耐性の問題が指摘されている(文献1)。したがって、現行のVEGFシグナル伝達遮断薬での問題点を克服する新たな腫瘍血管新生抑制システムを開発する必要がある。申請者の所属研究室では、2004年に新規血管新生ネガティブ・フィードバック調節因子としてVasohibin-1 (VASH1) を単離、同定した(文献2)。VASH1はVEGFやFGF2に反応した血管内皮細胞によって産生・分泌され、血管内皮細胞自身に作用して遊走や増殖を抑制することで過剰な血管新生を特異的に抑制する。現在までに、*in vivo*実験において精製タンパク質やアデノウイルスベクターによりVASH1を外因的に作用させるとマウスでの腫瘍血管新生を抑制し、さらに血管の成熟化(安定化)を誘導することで病態の改善に寄与することを報告している(文献3)。また、VASH1はFGF2やPDGF等のVEGF以外の血管新生促進因子に対しても広く抑制効果を示し、過剰な血管新生反応のみを抑制して血管を安定化させる作用を持つことから(文献4)、VEGFシグナル伝達遮断薬を用いた治療で生じる様々な問題点を克服できることが大きく期待される。しかしながら、VASH1が導くシグナル伝達経路は未だ明らかになっておらず、内皮細胞において遊走や増殖を抑制するメカニズムも不明なため、まだVASH1を抗腫瘍血管新生療法に使用するには至っていない。申請者は、これまでに培養血管内皮細胞を用いた解析から、VASH1が  $\alpha$ -チューブリンの翻訳後修飾である脱チロシン化を誘導することを明らかにした。 $\alpha$ -チューブリンの脱チロシン化は可逆的な反応であり、チューブリンチロシンリガーゼ (TTL) によって再チロシン化されることが分かっている。申請者は、VASH1により増加した脱チロシ

ン化型  $\alpha$ -チューブリン (Glu-チューブリン) が、TTLを共に作用させることによりコントロールに近い程度まで減少し、VASH1によるVEGF誘導性細胞遊走の抑制もTTLとの共発現により解除されることを見出した。したがって、VASH1がGlu-チューブリン増加を導くシグナル経路を明らかにすることで、VASH1による抗血管新生メカニズムを解明することが出来ると考えている。さらに、VASH1は分泌タンパク質であり細胞外から作用することがわかっているが、VASH1自体の活性調節にはまだ不明な点が多く、治療に使用可能な高活性化型VASH1タンパク質を単離精製することは未だ出来ていない。以上の経緯を踏まえ、VASH1の受容体やその下流で活性化し抗血管新生効果を誘導するシグナル経路を明らかにすることで、VASH1自身ではなく、その下流のシグナル経路の操作により二次的にVASH1シグナル伝達活性を変化させて血管新生を制御できると考え、本研究を着想するに至った。

<引用文献> 1) Bergers et al., Nat. Rev. Cancer 8: 592-603, 2008., 2) Watanabe et al., J. Clin. Invest. 114: 898-907, 2004., 3) Hosaka et al., Am. J. Pathol. 175: 430-439, 2009., 4) Heishi et al., Am. J. Pathol. 176: 1950-1958, 2010.

## 2. 研究の目的

VASH1は、VEGFなど多くの血管新生促進因子の作用を広く抑制する分泌性血管新生抑制因子であるが、その受容体および抗血管新生作用をもたらず細胞内メカニズムは全く不明であった。申請者はこれまでに、VASH1が細胞内のGlu-チューブリン量を増加させることを通して抗血管新生機能を発揮することを見出した。そこで本研究では、(1)VASH1刺激がGlu-チューブリン増加を導くためのVASH1下流シグナル伝達経路を同定し、VASH1による抗血管新生機構を解明することを目的とする。さらに、(2)同定したVASH1シグナル伝達経路の活性化を操作することにより、二次的に抗血管新生を制御する方法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず(1)タンパク質相互アレイおよびshRNAライブラリーを用いてVASH1受容体候補及び下流シグナル分子の探索を行う。次

に(2)VASH1 シグナル伝達が必要とするエンドサイトーシス様式を同定することで、シグナル伝達機構の種類選別を行い、(3) VASH1 との細胞内での相互作用や親和性を解析することにより VASH1 受容体とその下流シグナル経路を同定する。また(4)同定した受容体とその下流シグナル分子を糸口として、血管内皮細胞を用いて VASH1 が Glu-チューブリン増加及び抗血管新生効果を導く細胞内シグナル伝達経路を明らかにする。さらに(5)同定された VASH1 シグナル経路の制御分子の発現や活性を操作することで VEGF および FGF2 に誘導される血管新生に及ぼす影響を解析し、血管新生を効果的に制御する方法について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) タンパク質相互作用アレイによる受容体候補分子の解析

タンパク質相互作用アレイによって VASH1 との結合が見られた分子において、特に内皮細胞に発現する膜分子・受容体活性を持つ分子について、それらをノックダウンするための siRNA を血管内皮細胞 HUVEC に導入し、VASH1 による Glu-チューブリン増加への影響を検討した。その結果、これら分子のノックダウン自体が HUVEC の生存や機能に大きな影響を与えてしまうため、明確な結果は得られなかった。これは、候補に挙がった分子の多くが血管内皮細胞の生存や機能に必須な血管形成制御分子であった為だと考えられる。また、アレイで候補に挙がった分子群の活性化には共通してインテグリンの活性化が必要であることから、VASH1 はインテグリンと相互作用する可能性が示唆された。

##### shRNA ライブラリーを用いた VASH1 の下流シグナル分子の探索

shRNA ライブラリーを用いた網羅的解析に備え、まずは Glu-チューブリン増加を評価するハイスループット解析として FACS または in cell western を用いた実験系を構築し、どちらも VASH1 による Glu-チューブリン増加を有意に検出することができた。Glu-チューブリン増加に影

響する細胞クローンを選別後に、導入された shRNA を同定する為に次世代シーケンサーを使用する必要があるが、委託費用が高く、シグナル分子同定に十分な回数の解析が出来ないと考え、shRNA ライブラリーではなくタンパク質相互作用アレイによる探索をメインに行った。

##### (2) VASH1 シグナル伝達とエンドサイトーシスとの関係の検討

VASH1 を一過性に過剰発現させた HUVEC をエンドサイトーシス阻害剤であるメチル -シクロキストリンで処理した結果、Glu-チューブリンの増加が抑制された。この結果から、VASH1 による Glu-チューブリン増加には細胞表面上に存在する分子のエンドサイトーシスが必要であることが分かった。次にクラスリン阻害剤またはダイナクチン阻害剤処理による影響を調べたが、これら阻害剤処理だけでも Glu-チューブリンの増加が誘導されてしまうため、VASH1 シグナル伝達とクラスリン及びダイナクチンとの関係について、明確な結果は得られなかった。

##### (3) 細胞内相互作用解析による VASH1 下流シグナル経路の探索

アレイの結果から VASH1 との結合が予想された分子群において、相互作用の有無について HUVEC を用いた共免疫沈降法により解析した。その結果、いずれの分子についても VASH1 との共沈が確認され、特にインテグリンとの結合が強く検出された。インテグリンと VASH1 シグナル伝達との関係をさらに詳しく調べる為に、RGDモチーフペプチドによりインテグリンの活性化を阻害した結果、VASH1 による Glu-チューブリン増加への影響がみられた。したがって、VASH1 はインテグリンの活性を変化させることにより、Glu-チューブリンを増加させることが示唆された。

##### (4) VASH1 が抗血管新生効果を導く細胞内シグナル伝達機構の検討

VASH1 による VEGF 誘導性血管新生の阻害と Glu-チューブリン増加との関係を調べた結果、

VASH1 は Glu-チューブリンの増加を通して VEGFR2 の細胞内取込みを阻害することで VEGF シグナル伝達を抑制することを見出した。また、細胞表面ビオチン化解析、FACS 解析及び共焦点レーザー顕微鏡観察から、VASH1 と TTL との共発現によって細胞内 Glu-チューブリン量をコントロール程度まで低下させると VASH1 による VEGFR2 の細胞内取込み阻害がみられなくなる事が明らかとなった。さらに、VASH1 による FGF2 シグナル伝達阻害についても同様に Glu-チューブリンの増加を介していることを見出した。したがって、VASH1 は Glu-チューブリン増加を介して血管新生促進因子受容体の細胞内取込みを阻害する結果、その受容体の下流シグナル伝達を抑えるという新規抗血管新生機構が明らかとなった。

#### (5) VASH1 シグナル経路活性操作による VEGF 誘導性血管新生への影響及び血管新生制御法の検討

*in vivo* 血管新生解析として、マウス脇腹に VEGF を含むマトリゲルを移植し、移植したマトリゲルプラグ内に誘導される新生血管について解析した。マトリゲル内に VEGF と LacZ を発現するアデノウィルスベクターとを共に混合したコントロールではプラグ内に多くの新生血管が形成されたが、LacZ の代わりに VASH1 を発現するアデノウィルスベクターを VEGF と共に混合させたプラグ内には、ほとんど血管が形成されなかった。しかしながら、VASH1 と共に TTL を発現させるアデノウィルスベクターを混合させたプラグでは、VEGF に誘導される新生血管の形成が復活した。したがって、生体内の血管新生においても VASH1 は Glu-チューブリンの増加を通して抗血管新生効果を発揮することが明らかとなった。さらに、VASH1 の発現量や活性レベルは変化させずに TTL のノックダウンにより Glu-チューブリン量を増加させると、それだけで VASH1 が誘導する機構と同様な VEGF シグナル伝達の抑制がみられた。したがって、直接 VASH1 を投与するの

は無く、Glu-チューブリン増加を促進させることで抗血管新生効果をもたらすことが可能と示唆され、新たな血管新生制御法を開発する手がかりを得ることが出来た。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Kaori Suenaga, Shuji Kitahara, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Sachiko Horie, Junichi Sugawara, Nobuo Yaegashi, Yasufumi Sato. Role of the vasohibin family in the regulation of fetoplacental vascularization and syncytiotrophoblast formation. PLoS One, 9, 2014, e104728, DOI 10.1371/journal.pone.0104728 (査読有り)
- (2) Soichi Ito, Hiroki Miyashita, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Susumu Satomi, Yasufumi Sato. Enhanced cancer metastasis in mice deficient in vasohibin-1 gene. PLoS One, 8, 2013, e73931, DOI 10.1371/journal.pone.0073931 (査読有り)

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 小林美穂、Vasohibin-1 による抗血管新生メカニズム、第 1 回血管生物若手研究会、2015 年 2 月 7 日、東京大学 (東京都)
- (2) Miho Kobayashi、Vasohibin-1 induces suppression of VEGF-signaling via post-translational modification of MTs, The 10th Vasohibin Meeting, 2015 年 1 月 10 日、ラフォーレ蔵王 (宮城県・蔵王町)
- (3) 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、Vasohibin-1 による抗血管新生効果の作用機序、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (4) 堀江佐知子、鈴木康弘、小林美穂、小玉哲也、佐藤靖史、音響性リポソームと超音波を用いた Vasohibin-1 遺伝子導入による

- 抗血管新生効果の評価、第 13 回日本超音波治療研究会 (JSTU2014)、2014 年 11 月 15 日、仙台情報・産業プラザ(宮城県・仙台市)
- (5) 堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 佐藤靖史、抗血管新生効果における Vasohibin-1A と Vasohibin-1B の役割、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (6) Kaori Suenaga, Shuji Kitahara, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Sachiko Horie, Junichi Sugawara, Nobuo Yaegashi, Yasufumi Sato, Role of the vasohibin family in the regulation of placental morphogenesis.、The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014)、2014 年 4 月 14-17 日、みやこめっせ(京都府・京都市)
- (7) Sachiko Horie, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Yasufumi Sato, Distinctive roles of Vasohibin-1A and Vasohibin-1B in angiogenesis regulation.、The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014)、2014 年 4 月 14-17 日、みやこめっせ(京都府・京都市)
- (8) Takahiro Koyanagi, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Hiroki Miyashita, Yasushi Saga, Mitsuaki Suzuki, Yasufumi Sato, Development of a novel anti-angiogenic cancer therapy targeting vasohibin-2.、The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014)、2014 年 4 月 14-17 日、みやこめっせ(京都府・京都市)
- (9) 堀江佐知子, 鈴木康弘, 小林美穂, 小玉哲也, 佐藤靖史、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた Vasohibin-1 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価、第 26 回バイオエンジニアリング講演会、2014 年 1 月

11-12 日、東北大学片平さくらホール(宮城県・仙台市)

- (10) 小林美穂, 鈴木康弘, 佐藤靖史、Vasohibin-1 による微小管の翻訳後修飾を介した VEGF シグナル伝達の新規抑制機構、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
- (11) 小林美穂, 鈴木康弘, 佐藤靖史、Vasohibin-1 が誘導する微小管翻訳後修飾と VEGF シグナル伝達との関係、第 21 回日本血管生物医学会学術集会、2013 年 9 月 26-28 日、千里阪急ホテル(大阪府・豊中市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 美穂 (Kobayashi, Miho)  
 東北大学・加齢医学研究所・助教  
 研究者番号: 50630539

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし