

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01800

研究課題名(和文) 血管新生抑制因子コンドロモジュリン-Iの特異的切断酵素とアンカー分子の同定

研究課題名(英文) Exploring the anchoring molecules and cleaving enzymes of Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor

研究代表者

開 祐司 (Hiraki, Yuji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40144498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、緩和な乖離条件で調製した軟骨抽出液からChM-Iを免疫沈降すること、ChM-Iと相互作用する軟骨マトリックス分子群を単離・同定することに成功した。それらのうち1つの分子種については、微弱ではあるがChM-Iとの直接相互作用していると考えられ、ChM-Iを軟骨マトリックスにアンカリングする分子である可能性が示唆された。また、ChM-Iの切断酵素活性は軟骨細胞の分化とは関係なく、細胞表面または軟骨マトリックスに強く保持されているとの知見を得た。これらの成果は、軟骨における血管侵入障壁の形成と消失に関わる分子機構を理解する手がかりになると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we isolated the ChM-I-associating extracellular matrix (ECM) protein complexes by immunoprecipitation of ChM-I from the rib cartilage extracts prepared under the mild dissociating condition. By the mass spectrometric analyses, we obtained several kinds of candidate molecules interacting with ChM-I and found one of them showed direct protein interaction with ChM-I in immunoprecipitation analyses. As for ChM-I-cleaving enzyme, we demonstrated that the cleavage activity is localized to the cell surface or cartilage ECM irrespective of differentiation states of cartilage cells. These results help us to understand the molecular mechanism underlying establishment and removal of anti-angiogenic barrier during the cartilage development.

研究分野：生化学

キーワード：コンドロモジュリン-I 血管新生抑制因子 軟骨 細胞外マトリックス アンカー分子 切断酵素

## 1. 研究開始当初の背景

血管網は臓器・器官形成や発育に不可欠で、胎生期にまず原始血管網として作られる(脈管形成)。その後、臓器の成長にあわせて既存の血管から出芽した新生血管によって新たな血管網が張り巡らされていく(血管新生)。しかし、個体成熟後の血管新生は極めて限定的である。一方、動脈硬化、糖尿病性網膜症、関節リウマチなど、組織での血管新生そのものが病態形成や増悪につながる場合が多く知られている。特に固形腫瘍における血管形成は病態の形成に決定的であるから、その抑制は癌治療戦略の一つとして注目されている。

体表面や体内組織表面を構成する上皮や内皮では細胞が緊密に繋がったシートを作って機能を果たしているので、通常、血管網は侵入しない。これに対して、基底膜を介してこれら上皮組織を栄養する間葉には豊富な毛細血管網が広く分布する。一般に、間充織を充填する豊富な ECM は血管新生に許容性(pro-angiogenic)の組織環境を作るし、基底膜は血管侵入抵抗性(anti-angiogenic)な環境を作ると考えられている。事実、J. Folkman らにより基底膜の分解によって血中に放出される一群の『隠れた(Cryptic)血管新生抑制因子』が同定されている。

これとは対照的に、間充織には血管新生に強く抵抗する無血管な領域が知られている。軟骨がその典型例で、軟骨 ECM 中にはグアニジン塩酸で抽出される強い血管新生抑制活性が存在することが示唆されてきた。申請者らはこれを精製・クローニングし、コンドロモジュリン-(ChM-I)と命名した。ChM-I は約 20-25 kDa の糖タンパク質で無血管軟骨に特異的に発現する。細胞内で合成された ChM-I は、細胞外に大量に分泌され軟骨 ECM に蓄積されることを明らかにした。興味深いことに、胎生期の軟骨性骨原基では骨形成に先立って肥大軟骨層では血管が侵入する。この時、ChM-I の発現が消失することも見いだした。近年、軟骨性骨原基がその周囲をさらに強力な血管侵入バリアーで包まれていることが判明し、ChM-I 欠損マウスで骨原基への血管侵入パターンに異常がないことも理解されるようになった。一方、このような周囲組織にバリアーを持たない ChM-I の発現組織である心臓弁では、ChM-I 欠損マウスに病的な血管侵入が誘導されることも判明した。従って ChM-I は、生理的に機能する組織特異的な血管新生抑制因子として注目される。実際、組換えヒト ChM-I は血管内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成を阻害するのみならず、腫瘍血管新生やリウマチ関節炎における血管新生をも著明に抑制した。

## 2. 研究の目的

間充織は一般に毛細血管に富むが、血管侵入に強い抵抗性を示す無血管領域も存在する。軟骨は、その典型である。我々は、血管新生抑制因子コンドロモジュリン-(ChM-I)を発見し、血管侵入抵抗性の分子基盤を追求してきた。ChM-I は軟骨細胞特異的に発現し、その細胞外マトリックス(ECM)に大量に分泌・蓄積される。一方、無血管軟骨に隣接する肥大軟骨では ECM が連続しているにもかかわらず、血管侵入抵抗性は忽然と消失する。最近、我々はこの血管侵入抵抗性領域の明瞭な区画化が、(1)軟骨 ECM に ChM-I をアンカーする分子と(2)ChM-I の N-末端領域の切断酵素(図1)による不活性化によってもたらされていることを突き止めた。そこで本研究では、2つのキーとなる分子の同定により ChM-I による区画化された血管侵入抵抗性障壁の分子基盤を解明する。

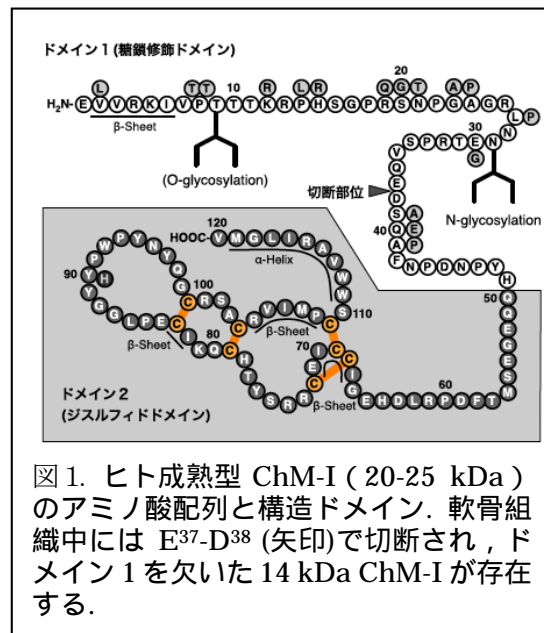


図1. ヒト成熟型 ChM-I (20-25 kDa) のアミノ酸配列と構造ドメイン。軟骨組織中には E<sup>37</sup>-D<sup>38</sup> (矢印)で切断され、ドメイン1を欠いた14 kDa ChM-Iが存在する。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット肋軟骨抽出液の調製

Wistar/ST ラット(4週齢、雄)から肋軟骨を採取し迅速に液体窒素中で凍結し、クライオプレスにより破碎した。これに対し、30倍容の抽出バッファーを加えてホモジナイズし、4℃で攪拌後、遠心して上清を軟骨抽出液とした。抽出バッファーには、2-6Mの尿素バッファー(2-6 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)、または非イオン系界面活性剤バッファー(1% Igepal CA630, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>)を用いた。

### (2) 免疫沈降法による ChM-I アンカー分子の単離・同定

ラット肋軟骨を採取し、上記(1)に準じて 2 M 尿素バッファーを用いて軟骨抽出液を調製した。得られた軟骨抽出液 4 ml に対し、5 倍容の免疫沈降バッファー (IP バッファー : 1% Igepal CA630, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) を用いて尿素を希釈した後、ChM-I モノクローナル抗体(hCHM-05 抗体)を固定化した抗体ビーズ 600 μl を加えて 4 で 6 時間ゆっくりと転倒混和し、免疫沈降を行なった。インキュベーション後、抗体ビーズは IP バッファー及び PBS にて洗浄し、0.1% TFA/H<sub>2</sub>O にて免疫沈降物を溶出した。これを凍結乾燥にて濃縮後、SDS サンプルバッファーにて可溶化・煮沸した。免疫沈降物は、SDS-PAGE にて分離後、銀染色を行い、目的バンドを切り出して MS 解析により同定した。hChMI-05 抗体固定化ビーズは、CNBr-活性化 Sepharose 4B を用いて作製した。

### (3) 組換え体タンパク質発現・精製

ヒト軟骨肉腫細胞株 OUMS-27 から精製した total RNA を用いて cDNA を合成し、候補となるアンカー分子をクローニングした。哺乳類細胞発現ベクター pCAGGS を用いて、N 末端または C 末端に FLAG タグ、His6 タグ、Strep tag II など、いずれかのアフィニティタグを付加した発現コンストラクトを作製または入手した。必要に応じて preprotrypsin leader 配列 (ppt 分泌シグナル) BM40 分泌シグナル、または内在性の分泌シグナルを用いた。組換え体タンパク質の発現は 293-F 細胞を用いた無血清浮遊細胞培養系にて行なった。発現ベクターを遺伝子導入後 72 時間培養し、培養上清よりタグに対するアフィニティビーズを用いて組換え体タンパク質の精製を行なった。

### (4) ラット初代軟骨細胞の単離・培養

Wistar/ST ラット (3 週齢、雄) から肋軟骨を採取し、それぞれ成長板軟骨細胞層、静止軟骨細胞層に分けて細かくミンスした後、0.1% EDTA, 0.15% トリプシン、0.15% コラゲナーゼにて順次処理して軟骨細胞を分離・採取した。10% 血清入り DMEM または αMEM にて培養した。

## 4. 研究成果

### (1) ChM-I 切断酵素の探索

ドメイン 1 に対する抗体 (N-ChM-I Ab) とドメイン 2 に対する抗体 (hCHM-05 Ab) を用いた蛍光免疫二重染色により、血管侵入抵抗性を失っているとされる肥大軟骨・石灰化軟骨では N-末端ドメインが切断された 14 kDa ChM-I のみが存在していると推察される。そこで、まず ChM-I の切断活性が肥大化・石灰化軟骨への分化と関連するかについて検証した。

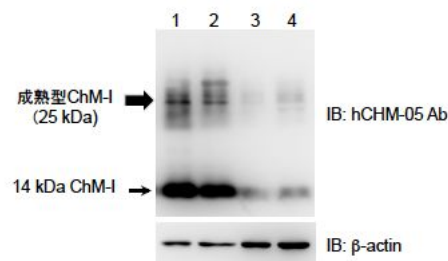


図 2. ラット肋軟骨抽出液における成熟型 ChM-I と 14 kDa ChM-I. lane1: 静止軟骨層, lane2: 増殖軟骨層, lane3, 4: 肥大・石灰化軟骨層

Wistar/ST ラットより採取した肋軟骨を、静止、増殖、肥大・石灰化軟骨の 3 区画に分けて軟骨抽出液を調製し、hCHM-05 Ab を用いてウェスタンブロッティングを行なった (図 2)。その結果、いずれの軟骨層においても 25 kDa 成熟型と 14 kDa ChM-I の存在比率に大きな違いは認められず、14 kDa ChM-I を生成する切断酵素活性は、軟骨細胞の肥大・石灰化とは相関しないと考えられた。また、ラット初代軟骨細胞の培養上清中には、成熟型 25 kDa ChM-I のみが検出され、14 kDa ChM-I は全く検出されなかった。細胞溶解液中には 25 kDa と 14 kDa ChM-I の両方が検出されたことから、14 kDa ChM-I およびその切断酵素は、軟骨細胞表面に局在するか、または細胞表面に蓄積した軟骨マトリックスに強く保持されている可能性が示唆された。軟骨マトリックスからの酵素活性の抽出は、以下のアンカー分子の探索と同様の検討を要するので、以下の (2) について優先的に取り組むことにした。

### (2) ChM-I アンカー分子の探索

ChM-I-アンカー分子複合体抽出条件の検討

ChM-I のドメイン 2 (図 1) は種間でよく保存されているので hCHM-05 抗体は種々のほ乳動物由来 ChM-I によく反応する。そこで、取得が容易なラット肋軟骨組織を材料とした。ChM-I は軟骨組織から 1M グアニジン塩酸により可溶化されるが、本研究ではアンカー分子との複合体として抽出したい。そこで、尿素バッファーや NP-40 などの非イオン系界面活性剤の抽出バッファーについて検討した。6-8 M 尿素条件では ChM-I の抽出効率が高いものの免疫沈降によって共沈するタンパク質がほとんど検出できなかった。一方、2 M 尿素的条件では、成熟型 25 kDa ChM-I, 14 kDa ChM-I が適度に抽出され、37 - 60 kDa および 100 kDa 以上に共沈タンパク質が認められた (図 3)。また、2 M 尿素条件下では CHM-05 抗体を用いた免疫沈降も可能であった。以上の結果から、2 M



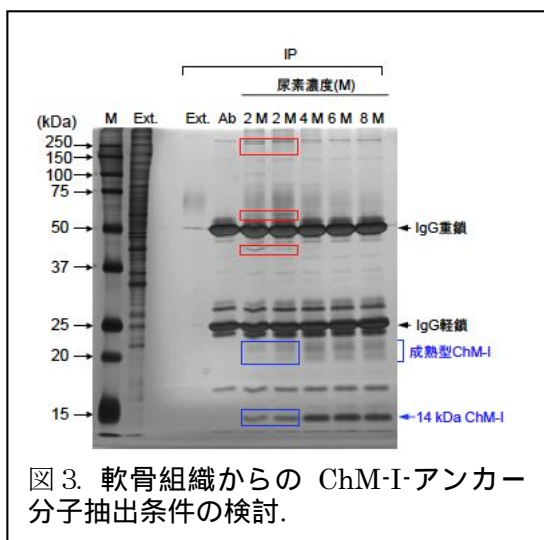


図3. 軟骨組織からの ChM-I-アンカー分子抽出条件の検討.

尿素バッファーを抽出バッファーとした。

ChM-I-アンカー分子複合体の免疫沈降およびMS解析による同定

Ig 重鎖および軽鎖の免疫沈降物への混入を避けるため、CHM-05 Abの抗体カラムを製し、8.4 mlの2M尿素軟骨抽出液を用いて免疫沈降タンパク質を得た。SDS-PAGE、銀染色により合計16の免疫沈降バンドが認められたので、これらを切り出しMS解析により同定した。その結果、Matrillin-1, 3, biglycan, TSP-1, aggrecan core protein, COMP, fibromodulinなどの軟骨マトリックス分子群が同定された。

また、ラットから肋軟骨細胞を分離し、初代培養系のConditioned medium (CM)を用いた免疫沈降も実施した。10%血清含有DMEMで48時間conditionしたCMを、IPバッファーで希釈して、免疫沈降を行った。主要なバンド10本についてMS解析を実施し、Matrillin-3, typeII collagen  $\alpha$ 1, type XI collagen  $\alpha$ 1, typeI collagen  $\alpha$ 1, TSP-1, lumicanなどが同定された。

#### タンパク質相互作用の検証

免疫沈降実験において、再現よく同定された軟骨マトリックス分子については、組換え体タンパク質を調整し、ChM-Iとの直接的なタンパク質相互作用を解析した。候補分子は、pCAGGSベクターを用いてタグ付きヒト組換え体タンパク質として発現・精製し、ChM-Iはウシ胎仔骨端軟骨からCHM-05抗体カラム、逆相クロマトグラフィーを用いて精製した天然型を使用した。IPにより相互作用を検証した結果、Matrillin-1については微弱ながらChM-Iとの相互作用が認められた。Matrillin-1やMatrillin-3は、繊維性軟骨マトリックスのアダプター分子として知られ、ChM-Iの免疫沈降物の中には、Matrillin-1, 3と相互作用することが知られる分子も含まれていた。以上の結果は、血管侵入バリアーを構成する軟骨ECMへのChM-Iのアンカー機構として、

微弱ながらもChM-IとMatrillin-1の相互作用が関与する可能性を示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 生体分子設計学分野ホームページ

<http://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/te01/index-j.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

開 祐司 (HIRAKI Yuji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所  
生体分子設計学分野・教授

研究者番号：40144498

##### (2)研究分担者

三浦 重徳 (MIURA Shigenori)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所  
生体分子設計学分野・助教

研究者番号：70511244

##### (3)連携研究者

なし