

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06821

研究課題名(和文)血管新生制御因子Vasohibinに結合する蛋白質の同定と作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Identification of Vasohibin binding proteins and their mechanisms

研究代表者

鈴木 康弘 (SUZUKI, YASUHIRO)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60332277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生制御因子Vasohibin-2 (VASH2)及びsmall vasohibin binding protein (SVBP)に結合する新規蛋白を探索し、がん悪性化における機能解析を行った。その結果、がん細胞・血管内皮細胞・脳組織の抽出液から、細胞種特異的なVASH2及びSVBP結合性蛋白を単離・同定した。SVBPとの結合及び-チューブリン脱チロシン化活性に重要なVASH2のアミノ酸残基を複数同定し、その変異体の一部はドミナントネガティブ作用を有することを明らかにした。また、がん細胞におけるVASH2の発現を阻害すると、がん関連線維芽細胞の活性化が抑制されることを新たに見出した。

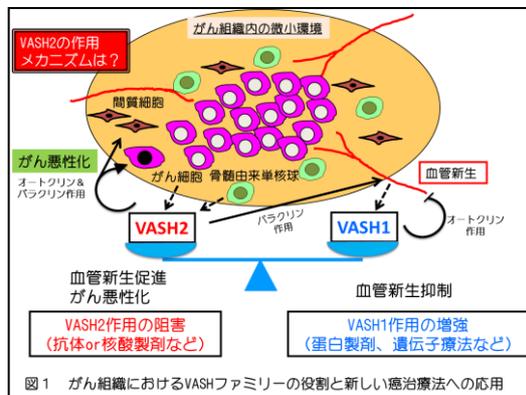
研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to identify the proteins associated with Vasohibin-2 (VASH2) and small vasohibin binding protein (SVBP), and analyzed their functions in tumor malignancy. I isolated and identified novel cell type specific proteins associated with VASH2 and/or SVBP using extracts of cancer cells, vascular endothelial cells, and mouse brain tissues. Point mutation analysis clarified important amino acid residues of VASH2 protein for binding to SVBP and for an alpha-tubulin detyrosinating activity of VASH2. Some of these mutants had dominant negative effects on the detyrosinating activity of endogenous VASH2 in cancer cells. Inhibition of VASH2 expression in cancer cells could attenuate the expansion of cancer-associated fibroblast in vivo and in vitro.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Vasohibin がん悪性化 チューブリン脱チロシン化 SVBP がん関連線維芽細胞 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属研究室では、世界に先駆けて新規の分泌性血管新生制御因子として VASH ファミリー (VASH1 と VASH2) を単離・同定し、癌をはじめとする様々な病態における役割やその治療応用に向けた基礎研究を行ってきた (図 1)。

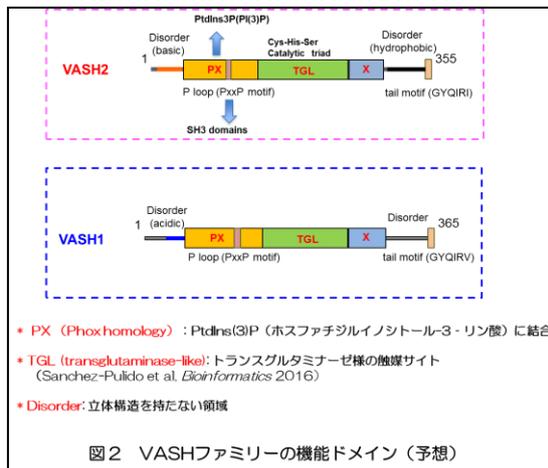


VASH1 遺伝子は VEGF や FGF-2 等の血管新生促進因子の刺激を受けた血管内皮細胞において発現誘導され、分泌されて内皮細胞自身の遊走・増殖を抑制して血管新生を負に制御する作用がある。VASH1 の精製蛋白やアデノウイルスベクターを用いて外因性に作用すると、癌・動脈硬化・未熟児網膜症のマウスモデルにおける血管新生を抑制し、且つ血管の成熟化を誘導して病態の改善に寄与することを報告している。

一方、VASH2 は VASH1 と高いアミノ酸相同性 (約 50%) を有するものの、骨髄由来単核球やがん細胞に発現して VASH1 の作用とは反対に血管新生を促進することが確認されている。多くのがん細胞株で VASH2 の発現が確認されており、VASH2 をノックダウンすることによって、血管新生・腫瘍の成長・腹膜播種が顕著に抑制されること、VASH2 mRNA の 3' UTR は浸潤・転移に深く関わる miR-200 ファミリーの標的であることを報告している。家族性大腸腺腫症や胃癌発症のマウスモデルにおいて形成される腫瘍組織では VASH2 の発現が顕著に亢進しており、VASH2 をノックアウトしたモデルでは血管新生と腫瘍形成が抑制されることを見出している。また、VASH2 の発現については、がん細胞に加えて、ES 細胞、iPS 細胞、がん幹細胞においても発現が高いことがデータベース上で示されている。VASH2 は血管新生を制御するだけではなく、癌細胞の形質転換に対しても影響しており、がん組織内の微小環境を調節することによって「がんの悪性化」を制御していると考えられる。しかしながら、VASH2 がどのような分子メカニズムを介して生理作用を発揮しているのかについては、不明な点が多く解明すべき最重要課題となっている。

これまで研究代表者は、酵母 Two-hybrid 法にて VASH ファミリーに特異的に結合する低分子量蛋白 small vasohibin binding protein (SVBP) を同定し、細胞内において VASH ファミリーと SVBP が複合体を形成する

ことによって VASH 蛋白の安定化を誘導し、VASH ファミリーと SVBP 複合体が細胞外へ分泌されることを報告した。最近、HHpred や PHYRE2 始めとするデータベース解析を行ったところ、VASH ファミリーと SVBP は共にカイメンなどの下等動物から高度に保存されており、VASH2 が VASH ファミリーの進化上のプロトタイプであることがわかってきた。また、VASH 蛋白は幾つかの機能性ドメインから構成されると予想されたものの、実際の役割については不明であった (図 2)。



以上の経緯を踏まえ、がん悪性化における VASH2 の作用機序を明らかにするためには、VASH2 と SVBP に結合する蛋白を新たに同定して、その結合蛋白間のネットワークを理解することが必須であり、且つ VASH2 を標的とした新しいタイプのがん治療法の開発に応用できると考え、本研究を構想するに至った。

2. 研究の目的

VASH1 と VASH2 は共に SVBP と結合し細胞外に分泌されるが、特異的受容体の有無や生理作用を発揮する分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、血管内皮細胞・がん細胞・幹細胞における VASH2 結合性蛋白を新たに同定し、VASH2 がどのような分子間ネットワークを通じて血管新生と癌の悪性化を制御するのかを明らかにし、新規癌治療法の開発に向けた基礎基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、蛋白-蛋白相互作用の生化学的解析からマウス病態モデルを用いた評価まで幅広い解析を行う。以下 3 つの解析を中心に研究計画を立案し、実験を遂行した。

① VASH2 及び SVBP に結合する蛋白の同定とその機能解析

大腸菌又はバキュロウイルス発現系を用いて VASH2 と SVBP の GST 融合蛋白を作製し、これを bait (餌) にして内皮細胞・がん細胞・ES 細胞、脳組織の各抽出液と反応し、GST pull down 法により VASH2 または SVBP の結合蛋白

質を分離する。VASH2 については各ドメインに分割した部分的な GST 融合蛋白を作製する。SVBP は 66 アミノ酸から成る低分子量蛋白であるため、全長 SVBP に GST を融合した蛋白を準備する。GST pull down 法により捕えられた結合蛋白は、SDS-PAGE による分離後に銀染色を行い、各ドメイン・細胞種に特異的に出現するバンド、または共通して出現するバンド分けて切り出し、各バンドに含まれる蛋白を質量分析にて同定する。

② 蛋白間の結合に必要とされるドメイン及びアミノ酸配列の解析

VASH2 または SVBP との結合に必要とされる領域を徐々に絞っていき、特に各蛋白分子中の重要なアミノ酸配列を明らかにする。生化学的な性質とドメイン構造が報告されている分子について、各機能ドメインに分割して結合の有無を免疫沈降法や Far Western Blot 法で調べる。その後、アミノ酸置換を行い、結合に必要とされるアミノ酸を明らかにする。

③ VASH2 のドミナントネガティブ変異体・合成阻害ペプチド・siRNA・shRNA によるがん悪化の抑制効果の検証

結合部位にアミノ酸置換を施したドミナントネガティブ変異体と合成阻害ペプチド作製を試みる。CRISPR/CAS9、siRNA、shRNA により癌細胞の VASH2 を欠損又はノックダウンし、微妙管の翻訳後修飾に変化があるかどうか調べる。胃がん発症マウスモデル (Gan マウス) を用いて、VASH2 を欠損することにより腫瘍間質内の浸潤マクロファージやがん関連線維芽細胞 (CAF) の進展に変化があるかどうか調べる。変化が確認された場合には、さらに細胞培養系で VASH2 の役割を評価する。

4. 研究成果

① VASH2 及び SVBP に結合する蛋白の同定とその機能解析

大腸菌を用いて VASH の各機能ドメインと全長 SVBP の GST 融合蛋白を作製した。全長 VASH の GST 融合蛋白については、バキュロウイルス発現系において SVBP と共発現することによって VASH-SVBP 複合体として安定的に調製可能な系を確立した (図 3)。調製した各 GST 融合蛋白をがん細胞・ES 細胞・マウス脳組織の各細胞抽出液と反応して、GST pull down 法により VASH ファミリーと SVBP に結合性を有する蛋白を分離した。SDS-PAGE による分離後、銀染色によりバンドを検出し質量分析によって結合性蛋白を同定した。その結果、VASH については約 50 種類、SVBP については約 10 種類の結合性蛋白を新たに同定することができた。VASH ファミリーに結合性を有す

る可能性のある蛋白には、膜蛋白、ヒートショックタンパク質、カルシウムイオン・cAMP シグナル制御因子、がん微小環境の制御に関わる因子に加え、細胞種・組織特異的な蛋白も確認された。同時に、VASH1 と VASH2 それぞれに対して特異的に結合する蛋白についても見出すことができた。(図 4) また、VASH2 と SVBP の組換え蛋白をウサギに免疫して、新たに免疫沈降に利用可能な抗体の作製を試みた。精製した抗 SVBP 抗体は、免疫沈降に用いた場合、SVBP に結合している VASH も共沈することから、共免疫沈降に適した抗体であった。共免疫沈降により結合性蛋白を分取して質量分析したところ、いずれも細胞骨格の動態を制御する既知の蛋白ファミリーであることを見出した (図 4)。

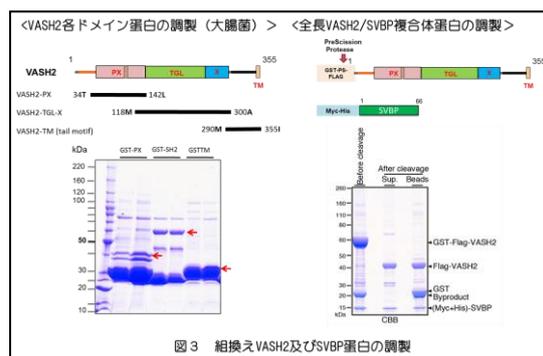


図3 組換えVASH2及びSVBP蛋白の調製

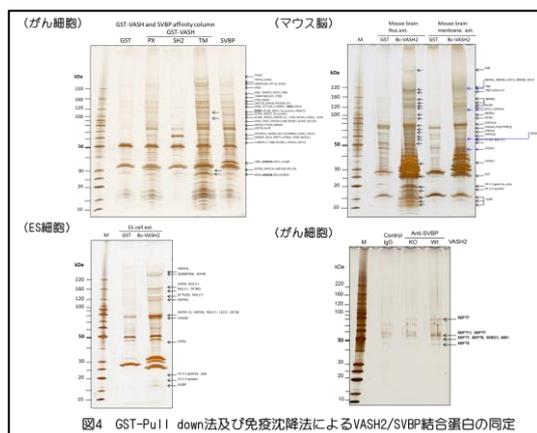
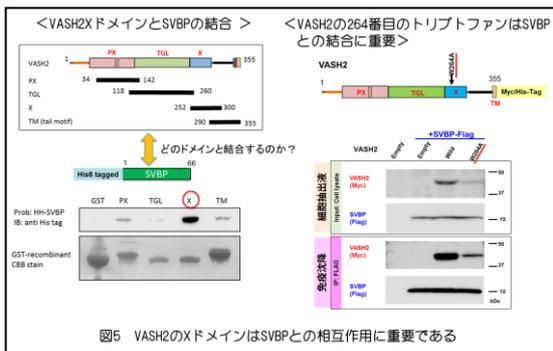


図4 GST-Pull down法及び免疫沈降法によるVASH2/SVBP結合蛋白の同定

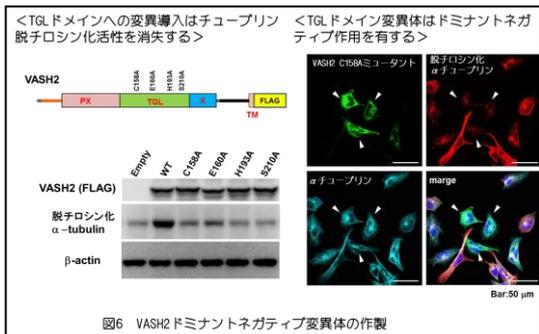
② 蛋白間の結合に必要とされるドメイン及びアミノ酸配列の解析

Far-western blotting 法によって、VASH2 の X ドメインと SVBP が直接結合することを明らかにした。VASH2 X ドメイン中の 264 番目のトリプトファンをアラニンに変換した変異体は SVBP との結合が抑制された (図 5)。これとは別に、VASH2 の PX ドメイン中にも SVBP との結合に必要とされるアミノ酸を新たに同定し、変異を導入することによって、SVBP との結合が減弱して細胞外分泌が抑制されることを確認した。



③ VASH2 のドミナントネガティブ変異体・合成阻害ペプチド・siRNA・shRNA によるがん悪性の抑制効果の検証

研究期間中に他のグループから、VASHファミリーが Transglutaminase スーパーファミリーと一部相同性を有すること、 α -チューブリン脱チロシン化酵素として機能することが報告された。CRISPR/CAS9 によりヒト横紋筋肉腫細胞株 RH30 (VASH2 高発現株) の VASH2 欠損させたところ、親株と比して α -チューブリン脱チロシン化が顕著に抑制されることを確認した。VASH2 の TGL ドメインが触媒活性中心を含む領域と予想されたことから、TGL ドメイン中の幾つかのアミノ酸に変異を導入すると、VASH2 の脱チロシン化活性が失活することを見出した (図 6)。ヒト横紋筋肉腫細胞 RH30 に同変異体を導入すると、細胞内の α -チューブリン脱チロシン化レベルが抑制されるため、ドミナントネガティブ作用を有することが示唆された (図 6)。一方、研究期間中に有効な合成阻害ペプチドの作製には至らなかった。

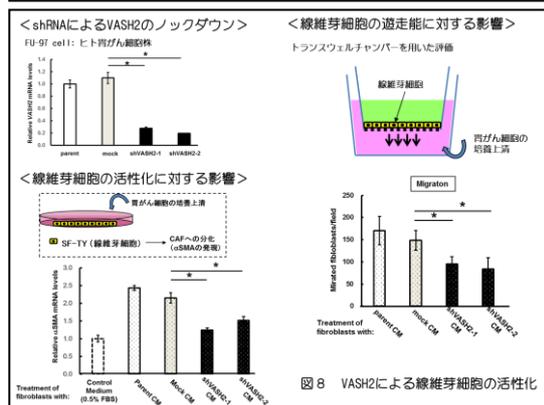
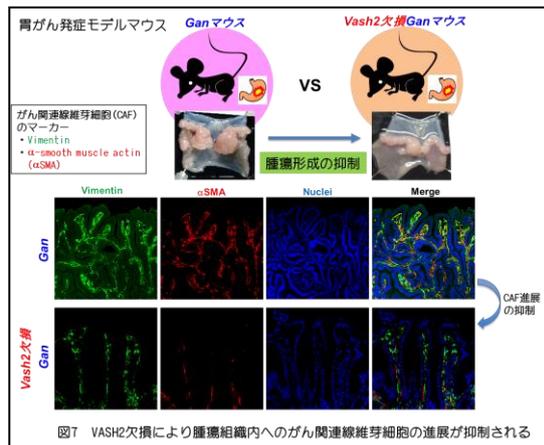


胃癌発症モデルマウスを用いた解析から、VASH2 欠損によって、腫瘍内に浸潤するマクロファージに変化は確認されなかったが、癌関連線維芽細胞 (CAF) の腫瘍間質への進展が顕著に抑制されることを新たに見出した (図 7)。また、VASH2 を発現する胃癌細胞株の培養上清が CAF の活性化を誘導し、その活性は VASH2 のノックダウンによって抑制されることを確認した (図 8)。

以上の結果から、本研究では、三年間を通じて以下の研究成果を得ることができた。① VASH 及び SVBP の新規結合性蛋白を同定した。②SVBP との相互作用に必要とされる VASH のドメイン及びアミノ酸を同定した。③VASH2

のチューブリン脱チロシン化活性に必須のアミノ酸を同定し、その変異体がドミナントネガティブ作用を有することを見出した。④がん細胞における VASH2 の発現は CAF の活性化を誘導することを新たに見出した。

これらの成果は、VASH2 のがん悪性化における役割とその作用機序の理解に重要であり、新規癌治療法への応用にも期待できる。そのためにも、今後はがん細胞における α -チューブリン脱チロシン化の意義と VASH2 の作用メカニズムの解析をさらに進めていく必要がある。



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 1件)

Yasuhiro Suzuki, Shuji Kitahara, Takuya Suematsu, Masanobu Oshima, Yasufumi Sato. Requisite role of vasohibin-2 in spontaneous gastric cancer formation and accumulation of cancer-associated fibroblasts. Cancer Sci. 108 (2017) 2342-2351 doi: 10.1111/cas.13411. (査読有)

[学会発表] (計 8件)

- ① 鈴木康弘: VASHファミリー研究の最近の動向と今後の研究展開について、第13回 Vasohibin研究会 (2018)
- ② 鈴木康弘、池田真教、菅野新一郎、佐藤靖史: 分泌性血管新生制御因子 Vasohibinファミリーの機能解析、平成29年度「先

端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会」(2018)

- ③ 鈴木康弘：胃癌発症モデルマウスを用いた腫瘍発育・微小環境における VASH2 の機能解析、第 13 回 Vasohibin 研究会 (2017)
- ④ Yasuhiro Suzuki, Shuji Kitahara, Masanori Ikeda, Shin-ichiro Kanno, Masanobu Oshima, Yasufumi Sato : Analysis of the role of vasohibin-2 in spontaneous gastric cancer formation. 第 24 回日本血管生物医学会学術集会／第 14 回日韓血管生物合同シンポジウム (2016)
- ⑤ Yasuhiro Suzuki, Shuji Kitahara, Masanobu Oshima, Yasufumi Sato: The role of vasohibin-2 in spontaneous gastric cancer formation and modulation of tumor microenvironment. 19th International Vascular Biology Meeting (2016)
- ⑥ 鈴木康弘：Vasohibin 研究の新展開、第 2 回血管生物若手研究会 (2016)
- ⑦ 鈴木康弘：胃癌発症における VASH2 の役割と VASH ファミリー研究の新展開、第 11 回 Vasohibin 研究会 (2016)
- ⑧ 鈴木康弘、乗田理恵、池田真教、菅野新一郎、佐藤靖史：Vasohibin ファミリーの機能解析における新展開、第 23 回日本血管生物医学会学術集会 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.idac.tohoku.ac.jp/site_ja/advance-mission-courses/overcoming-intractable-cancers/dept-vascular-biology/

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/vascbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康弘 (SUZUKI, Yasuhiro)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：60332277

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()