

令和 元年 6 月 26 日現在

機関番号：33303

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2018

課題番号：16KK0177

研究課題名（和文）抗腫瘍療法確立を目指したバソヒビン-1による血管安定化機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of vascular stabilization by vasohibin-1 aimed at the establishment of anti-tumor therapy. (Fostering Joint International Research)

研究代表者

小林 美穂 (Kobayashi, Miho)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50630539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：腫瘍の進展をサポートするために腫瘍内に形成された腫瘍血管では、内皮細胞同士の間隙が不安定化しており、薬剤の不到達や癌細胞の浸潤及び血管新生の容易化を誘導することで癌治療に悪影響を及ぼすことが知られている。本研究により、細胞外から作用させたバソヒビン-1（VASH1）が微小管の脱チロシン化増加を通して膜分子のエンドサイトーシスを阻害し、血管不安定化の抑制により血管安定化を引き起こすことを明らかにした。更に、組換えVASH1が血管新生自体を抑制できることも示されたため、VASH1タンパク質の投与が血管新生抑制と血管安定化誘導の両方を同時に発揮できる癌治療法として有効であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりVASH1/dY-チューブリン経路が効果的な腫瘍抑制作用をもたらすことを見出したことに大きな学術的・社会的意義がある。近年、VASH1自体が細胞内で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が、本研究ではVASH1を細胞外から組換えタンパク質として投与した際にも同様にdY-チューブリン誘導効果が見られることを明らかにし、更に生理作用についても言及している。加えて、VASH1タンパク質の投与がこれまでの癌治療とは別の作用機序として腫瘍の進展抑制に有効であることも示されたことから、新たな治療法の候補の一つとして提示できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tumor vessels are considered to be immature vascular by its instability character. Immature tumor vessels affect adversely on cancer treatment through the inhibition of drug delivery, or the facile invasion and the angiogenesis. In our project, we revealed that VASH1 inhibits endocytosis of membrane protein and vascular destabilization through the increase of dY-tubulin, non-cell autonomously. Therefore, our results suggest that VASH1 can be an effective target for tumor treatment, because VASH1/dY-tubulin pathway has double effect of the anti-tumor angiogenesis and the normalize induction of tumor vessels.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 微小管 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

腫瘍微小環境に含まれる腫瘍血管では内皮細胞同士の接着が不安定であり、現行の VEGF を標的とした抗血管新生療法が腫瘍血管の不安定化を促進させることも示唆されている(文献 1)。腫瘍血管の不安定化は薬剤の不到達や癌細胞の浸潤及び血管新生の容易化を誘導することで癌治療に悪影響を及ぼすため、癌治療を目指した血管安定化誘導法を開発する必要がある。血管の安定化にはアンジオポエチン-1(Ang1)/Tie2 シグナル伝達が重要な役割を果たしているが、Ang1 の代わりに Ang2 が Tie2 に結合すると Ang/Tie2 複合体を含む膜分子群の細胞内取込みの促進を通して、安定化シグナルが崩壊して血管の不安定化をもたらされることが知られている(文献 2)。しかしながら、腫瘍血管における Ang1/Tie2 の役割は VEGF シグナルと関連することにより相反する二面性を持つことも示唆されているため(文献 3, 4)、Ang/Tie 経路を標的とした癌治療法の確立には未だ至っていない。一方、血管新生誘導因子に反応した内皮細胞が産生するタンパク質であるバソヒピン-1(VASH1)は、血管新生ネガティブ・フィードバック調節因子であると同時に腫瘍血管の安定化を誘導することが示唆されていた(文献 5)。VASH1 による血管の安定化においては Ang1/Tie2 経路の活性化で観られるような血管径の増大を伴わず、安定化をもたらす細胞内機構も不明瞭であることから、VASH1 が誘導する血管安定化機構の解明は VASH1 による血管を標的とした癌治療の開発において重要なポイントであり、現行の癌治療の様々な問題点を克服できると期待される。申請者はこれまでに、VASH1 が微小管の脱チロシン化を強く誘導することを明らかにし、脱チロシン化型チューブリン(dY-チューブリン)の増加が VEGF 誘導性の VEGFR2 の細胞内取込み及び細胞内輸送を抑制する結果、VEGF シグナル伝達とそれに伴う細胞遊走並びに血管新生が阻害されることを見出した(図 1)。更に、不安定化内皮細胞では VE-カドヘリンや ZO-1 を始めとした細胞間接着分子の細胞内取込みが活性化していることが報告されており(文献 6)、VASH1 の発現を抑制した内皮細胞において細胞間接着の維持に必須である ZO-1 の細胞間局在が崩壊していることから(文献 7)、VASH1 が VE-カドヘリン等の細胞間接着分子の局在制御に参与する可能性があげられた。以上の経緯を踏まえ、Ang/Tie 経路を含む細胞間接着分子制御と VASH1 が誘導する dY-チューブリン増加を介した細胞内取込みの抑制との関係を明らかにすることで VASH1 による血管安定化誘導機構を解明し、VASH1 を標的とした血管新生抑制効果と血管安定化誘導効果の両方を同時に発揮する治療法の開発に貢献できると考え、本研究を着想するに至った。

<引用文献>

1) Jain. Science 307: 58-62, 2005、2) Eklund *et al.*, Exp.CellRes. 319: 1271-1280, 2013、3)Hu *et al.*, Curr.Oncol.Rep. 11: 111-116, 2009、4) Rigamonti *et al.*, Cell Rep. 8: 696-706, 2014、5) Hosaka *et al.*, Am.J.Pathol. 175: 430-439, 2009、6) Gavard *et al.*, Nat.CellBiol. 8: 1223-1234, 2006、7) Ito *et al.*, PLoS One 8: e73931, 2013

2. 研究の目的

本研究が目指すところは、VASH1 をターゲットとした新たな抗腫瘍療法の確立である。癌微小環境では、腫瘍血管を始めとして線維芽細胞や免疫細胞など様々な種類の細胞が複雑にクロストークしながら腫瘍の進展をサポートしている。それゆえに、抗腫瘍療法の確立を達成するためには細胞を用いた in vitro 解析だけでは不十分であり、生体を使用した in vivo 解析が必要となる。そこで本共同研究では主にマウスを用いて、生体内において VASH1 に誘導される dY-チューブリン増加が抗血管新生並びに血管安定化を引き起こす分子機構を詳細に明らかにすることで、抗血管新生と血管安定化とを同時に制御する治療法確立の基盤を構築させることを目的とする。更に本共同研究により培った国際共同研究の繋がりを基盤にし、生体内機能の重要性が示唆されながらも、分子機構や役割等の

不明点が多く残されている VASH1 タンパク質に対する多様な研究を広く世界に発展させることを目指す。

3. 研究の方法

- (1) VASH1 による dY-チューブリン増加が VE-カドヘリン等の膜分子の細胞内取込みや血管の安定化に与える影響について、免疫染色したマウス血管を共焦点レーザー顕微鏡を用いて形態学的に解析することで、血管安定化における dY-チューブリン増加の重要性を明らかにする。
- (2) エンドサイトーシス稼働モータータンパク質であるダイニンの発現抑制によりエンドサイトーシスを阻害した際と VASH1 を作用させた際の血管の様子を比較することで、VASH1 が誘導する血管安定化の分子機構を確認する。
- (3) 実際に治療する際の投与方法を考慮し、外から VASH1 を作用させた場合の dY-チューブリン、血管新生及び VE-カドヘリン等の膜分子の細胞内局在への影響を *in vitro* 並びに *in vivo* で検討する。
- (4) 生体内において VASH1 が細胞外から作用する際の実受容体を探索・同定する。
- (5) 腫瘍移植マウスに対して VASH1 タンパク質を投与し、腫瘍血管における膜分子の細胞内取込みや壁細胞の被覆を解析することで、VASH1 による dY-チューブリン増加を通じた効果的な抗腫瘍療法確立のための基礎を築く。

4. 研究成果

- (1) VEGF を含むマトリゲルをマウスに移植し、マトリゲルプラグ内に誘導された血管について解析した。コントロールでは内皮細胞内に vesicle 状に局在する VE-カドヘリンが観察された。VEGF と Ad-VASH1 とを共に含むマトリゲルプラグ内には新生血管が誘導されなかったが、マトリゲルプラグ周囲の血管では Ad-VASH1 により dY-チューブリン量が増加しており、VE-カドヘリンの vesicle は減少する傾向にあった。また、VEGF と共に angiopoietin-2 (Ang2) を含むマトリゲルをマウスに移植し、同様にマトリゲルプラグ内の血管を観察した。コントロールでは内皮細胞内に Tie2 が vesicle 状に局在化していたが、Ad-VASH1 を共に含むマトリゲルプラグ周囲の血管では vesicle 状 Tie2 は減少する傾向にあった。Ad-VASH1 と共にチューブリンチロシンリガーゼ (TTL を発現させた) を作用させると、マトリゲルプラグ内への血管新生が誘導され、dY-チューブリン量は basal 程度まで低下していた。更に、VASH1 と TTL を共に作用させた際には、VASH1 に誘導される vesicle 状局在化の抑制が解除されていた。従って、生体内においても VASH1 は dY-チューブリンの増加を介して VE-カドヘリン並びに Tie2 の細胞内局在を変化させ得ることが明らかになった。
- (2) *in vitro* 解析において、ダイニンのノックダウンは VEGF 刺激による VE-カドヘリンの細胞内局在化並びに Ang2 刺激による Tie2 の細胞内局在化を抑制した。これは VASH1 を作用させた際と同様な結果であったため、VASH1 による VE-カドヘリン及び Tie2 の細胞内局在抑制は、ダイニンの機能不全によるエンドサイトーシス抑制と関連している可能性が示唆された。
- (3) *in vitro* 解析において、VASH1 発現細胞と共培養した正常内皮細胞では dY-チューブリン

量が増加しており、VEGF 刺激による VE-カドヘリンの局在変化を抑制した。また、*in vivo* 解析において、組換え VASH1 と VEGF とを含むマトリゲルをマウスに移植し、マトリゲルプラグ内及び周囲の血管について解析した。組換え VASH1 の代わりに PBS を含ませたコントロールマトリゲルプラグ内では VEGF により血管新生が誘導されており、内皮細胞内に vesicle 状に局在する VE-カドヘリンが観察された。一方、組換え VASH1 を含むマトリゲルプラグ内では VEGF による血管新生が誘導されず、マトリゲルプラグ周囲の血管では dY-チューブリンが増加しており、VE-カドヘリンの vesicle 状局在化も減少していた。従って、細胞外から VASH1 を作用させることでも dY-チューブリン増加による血管の安定化が誘導できると考えられた。

- (4) 野生型マウスの組織溶解液において VASH1 と結合するタンパク質を質量分析にて解析し、VASH1 ノックアウトマウスでの結果と比較することで VASH1 特異的結合分子を探索した。その結果として選出された受容体 X については現在も機能解析中である。
- (5) 肺ガン細胞 LLC と共に組換え VASH1 を含むマトリゲルをマウスに移植し、15 日後に摘出して腫瘍内の血管について解析した。組換え VASH1 の代わりに PBS を含ませたコントロールと比較して、組換え VASH1 を作用させたものでは SMA 陽性壁細胞に被覆された血管が増加しており、腫瘍の成長も抑制されていた。また、組換え VASH1 を作用させた腫瘍血管では、VE-カドヘリン及び Tie2 の細胞内局在化が減少する傾向にあった。従って VASH1 タンパク質を投与することにより、VE-カドヘリン及び Tie2 の細胞内局在に働きかけることで腫瘍血管の安定化を効果的に誘導できることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

小林 美穂、中山 雅敬、佐藤 靖史、Vasohibin-1 による微小管の翻訳後修飾を介した機能とその役割、血管生物学会(招待講演)、2019

小林 美穂、佐藤 靖史、血管新生ネガティブフィードバック因子:Vasohibin-1 による微小管の翻訳後修飾を介した血管新生抑制機構、第 48 回日本心脈管作動物質学会(招待講演)、2019

小林 美穂、中山 雅敬、佐藤 靖史、Vasohibin-1 による微小管の翻訳後修飾とその機能、第 14 回 Vasohibin 研究会、2019

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：中山 雅敬

ローマ字氏名：Masanori Nakayama

所属研究機関名：Max Planck Institute for Heart and Lung Research

部局名：Laboratory for Cell Polarity and Organogenesis

職名：Group Leader

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名 : Johannes Graumann

所属研究機関名 : Max Planck Institute for Heart and Lung Research

部局名 : Scientific Service Group Biomolecular Mass Spectrometry

職名 : Group Leader