

令和元年6月10日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15625

研究課題名(和文)4回膜貫通タンパク質Tspan18を介した血管形成機能の解明

研究課題名(英文)Mechanistic elucidation of angiogenesis mediated by Tspan18

研究代表者

田井 育江(Tai, Ikue)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：90749508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：4回膜貫通タンパク質Tspan18を血管内皮細胞において欠損するマウスが血管発生に異常を示す機構を明らかにするため、Tspan18とVEGF受容体との結合を評価し、酵素的切断により生じるVEGFR2の130kDaおよび75kDaの断片がTspan18と結合することを明らかにした。また、130kDa断片の産生はメタロプロテアーゼ阻害剤により阻害されること、および、Tspan18をノックダウンした血管内皮細胞では2つの断片のターンオーバーが変化することを見出した。Tspan18欠損マウスに腫瘍を移植して形成される腫瘍血管は、正常血管に近い性質を示し、腫瘍血管で通常見られる出血が見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管形成において最も重要な受容体といえるVEGFR2はプロテアーゼにより断片へと切断されるが、この切断にどのような意味があるかはわかっていなかった。我々の研究により、Tspan18を欠損するマウスが血管形成に異常を示すことに加え、Tspan18がVEGFR2の断片と結合することが明らかになり、VEGFR2の切断過程や断片の制御が正常な血管形成に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tspan18-deficient mice show abnormality in retinal vascular development. To understand how this phenotype is induced, binding of Tspan18 to VEGFRs was evaluated by co-immunoprecipitation assay. As a result, binding of Tspan18 to proteolytic fragments of VEGFR2, 130-kDa and 75-kDa fragments, was detected. Experiments using protease inhibitors showed that metalloprotease is necessary for the production of the 130-kDa fragment. Furthermore, it was shown that knockdown of Tspan18 in blood endothelial cells results in a shift in turnover of the fragments, including enhanced production of 130-kDa fragment and delayed production of 75-kDa fragment after VEGF treatment. Tumor blood vessels in Tspan18-deficient mice showed normalization of vascular structure, including absence of hemorrhage.

研究分野：血管生物学

キーワード：VEGF受容体 angiogenesis Tetraspanin18 VEGFR2 shedding 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去に我々が行った解析により、テトラスパニンスーパーファミリーに属す4回膜貫通タンパク質である Tspan18 を血管内皮細胞において欠損するマウスは、網膜血管網の発生異常を示すことが明らかになった。この表現型が現れる機構に関する知見として、ある *in silico* 解析が Tspan18 との結合が予測されるタンパク質のひとつとして VEGFR1 を挙げていた。この予測は Tspan18 と VEGF 受容体群の結合が上記表現型に関与した可能性を示唆しているが、結合を裏付ける実験的な証拠はなく、また、その結合が受容体にどのような影響を与えるかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮特異的 Tspan18 ノックアウトマウスが網膜血管形成遅延の表現型を示すメカニズムの解明を目標とし、Tspan18 結合タンパク質を同定して、その結合の機能的意義を探ることを目指した。並行して、病的血管形成における Tspan18 の意義についても評価を試みた。

3. 研究の方法

共免疫沈降法を用い、Tspan18 と VEGFR1 および VEGFR2 の相互作用を検討した。この解析により Tspan18 との相互作用が示された VEGFR2 の切断断片について、その産生機構を各種阻害剤等により解析すると共に、Tspan18 をノックダウンあるいは過剰発現させた場合の VEGFR2 のターンオーバーについて評価を行った。

病的血管形成の評価では、野生型マウスおよび全身性に Tspan18 を欠損するマウスに B16メラノーマ細胞を移植し、腫瘍の生育と腫瘍血管の形成を評価し、Tspan18 の有無による違いを考察した。

4. 研究成果

Tspan18 と相互作用するタンパク質について検討するため、C 末端に Flag タグを付加した Tspan18 を HUVEC に強制発現させ、cell lysate を抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。免疫沈降物を VEGFR1 あるいは VEGFR2 に対する抗体によるウエスタンブロットに供したところ、抗 VEGFR1 抗体では何も検出されなかった。しかし抗 VEGFR2 抗体では、shedding と呼ばれる酵素的切断により生じた VEGFR2 の C 末端側(細胞質側)断片である 130kDa と 75kDa のバンドが検出され、両断片が Tspan18 と結合することが明らかになった。

VEGFR2 の断片に関する先行研究は限られており、その産生機構についても一貫した知見がなかった。そこで、HUVEC を各種薬剤で処理して断片の産生を評価した結果、メタロプロテアーゼ阻害剤 TAPI-1 で処理した細胞では 130kDa 断片が減少した。また、shedding 誘導剤として知られる PMA で処理した細胞では全長 VEGFR2 が減少するとともに、リン酸化型全長 VEGFR2 とリン酸化型 130kDa 断片が消失した。Shedding で生じる断片を細胞膜内でさらに切断することが知られる セクレターゼの阻害剤である DAPT で HUVEC を処理したところ、130kDa 断片が蓄積した。

並行して、VEGFR2 断片の産生および分解の過程に Tspan18 がどのように関わるかを調べるため、HUVEC を用いて Tspan18 をノックダウンし、VEGF 添加後の断片およびそのリン酸化物の量を解析した。Tspan18 をノックダウンしない場合の両断片の比は、VEGF 添加前には 130kDa 断片が優位だったが、VEGF 添加後には 75kDa 断片が優位になり、リン酸化全長 VEGFR2 は速や

かに増加してその後減少した。Tspan18 をノックダウンすると、VEGF 添加前の 130kDa 断片が対照群よりさらに多くなり、VEGF 添加後に 75kDa 断片が増加してくるタイミングが遅くなった。リン酸化全長 VEGFR2 の増加とその後の減少も全体として遅延した。

野生型マウスと Tspan18 欠損マウスに B16 メラノーマ細胞を移植し、両マウスに形成された腫瘍の大きさと腫瘍血管の状態を比較した。野生型マウスの腫瘍内に形成された腫瘍血管は、通常の腫瘍血管で見られるとおり構造が破綻しており、腫瘍組織内に出血が見られた。しかし、Tspan18 欠損マウスの腫瘍内に形成された腫瘍血管は、野生型マウスの腫瘍内より形成量が少なく、また、形態が正常化しており、腫瘍組織内に出血を認めなかった。腫瘍の大きさについては両群に違いがなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文(査読あり)〕(計 7 件)

1). Naito H, Iba T, Wakabayashi T, Tai-Nagara I, Suehiro JI, Jia W, Eino D, Sakimoto S, Muramatsu F, Kidoya H, Sakurai H, Satoh T, Akira S, Kubota Y, Takakura N. TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity. *Dev Cell* 31035-9, (2018)

2). Tai-Nagara I, Yoshikawa Y, Numata N, Ando T, Okabe K, Sugiura Y, Ieda M, Takakura N, Nakagawa O, Zhou B, Okabayashi K, Suematsu M, Kitagawa Y, Bastmeyer M, Sato K, Klein R, Navankasattusas S, Li DY, Yamagishi S, Kubota Y. Placental labyrinth formation in mice requires endothelial FLRT2-UNC5B signaling. *Development* 144(13): 2392-2401, (2017)

〔学会発表〕(計 7 件)(2015 年後以降)

1). 田井育江, 久保田義顕
血管とリンパ管の独立性を規定する分子機構とその破綻
第 124 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (2019 年)

2). 田井育江
血管とリンパ管の独立性を規定する分子機構とその破綻
第一回日本医学会連合 Rising Star リトリート
(2019 年)

3). Nagara-Ikue Tai, Yoshiaki Kubota
Tetraspanin18 is a novel regulator of developmental and pathological angiogenesis.
International Vascular Biology Meeting 2018 (2018 年)

4). 田井育江
網膜血管形成における新規 4 回膜貫通タンパク質 Tspan18 の機能解析
平成 30 年度花王科学奨励賞贈呈式(2018 年)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。