

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390226

研究課題名（和文） 血管構築における新規内因性抑制因子 vasohibin の機能

研究課題名（英文） Function of novel intrinsic angiogenesis inhibitor vasohibin on the establishment of vascular architecture

研究代表者

佐藤 靖史 (YASUFUMI SATO)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：50178779

研究成果の概要：

Vasohibin(VASH)ファミリーのうち、VASH-1は主に血管新生が終息する部位の内皮細胞に発現し、血管新生を止めるのに対し、VASH-2は間質に浸潤する骨髄由来単核球に発現し、VASH-1とは拮抗的に血管新生を促進する。また、内皮細胞に発現するVASH-1は、血管新生を抑制するばかりか、ROSの生成を抑制すると共にSIRT1の産生をも増加させ、内皮細胞のストレス耐性、抗老化に寄与する。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------------|------------|-------------|
| 2006年度 | 5,600,000円 | 1,680,000円 | 7,280,000円 |
| 2007年度 | 5,300,000円 | 1,590,000円 | 6,890,000円 |
| 2008年度 | 4,500,000円 | 1,350,000円 | 5,850,000円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,400,000円 | 4,620,000円 | 20,020,000円 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管病態学

1. 研究開始当初の背景

新しい血管ネットワークが形成される血管新生は、生理的現象で、特に胎児・胎盤の形成において必須であるが、癌、糖尿病網膜症、関節リウマチ、粥状動脈硬化症など多くの病態の進展と密接に関連していることから、病的な血管新生に対する効果的な制御法の開発が求められている。一方、下肢虚血や狭心症・心筋梗塞などの虚血性疾患に対しては、血管新生を促進して血流を回復させる血管再生療法が臨床導入されようとしている。このように血管新生を人為的に制御するに

は、その調節機構に関する基盤研究が欠かせない。血管新生は、促進因子と抑制因子とのバランスによって調節されている。促進因子としてはVEGF(vascular endothelial growth factor)ファミリー分子がVEGF-A代表的因子であり、胎生期の血管発生・血管形成においても必須の機能を果たしていることが知られている。一方、抑制因子としてこれまで報告されてきた因子は、主に血管外の細胞によって産生され、新生血管が侵入するのを阻止するバリアーとして機能するものが中心であり、血管内皮細胞自身の産生する調節因

子については、全く解析されていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、VEGF 刺激によって血管内皮細胞に誘導される遺伝子の網羅的解析から、血管内皮細胞で選択的に発現し、血管新生に対して negative feedback 調節を担う新規抑制因子 Vasohibin1 (VASH1) と、さらにアミノ酸レベルで約 50% 相同のホモログ (VASH2) を単離・同定した。

そこで本研究では、VASH1、VASH2 の時・空間的発現と機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス皮下血管新生モデル：マウス背部に縦に 2 本並行に切開を加え、皮下組織を剥離して透明のシリコンシートを挿入して切開を閉じ、7 日後に同皮膚組織を回収し、血管を観察した。

培養内皮細胞を用いた研究：マウス内皮細胞株 MS1 細胞、またはヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使い、VASH1 の過剰発現や siRNA によるノックダウンを行い、内皮細胞の生存や老化と、それらに関わる遺伝子群の発現変動を解析した。

4. 研究成果

マウス皮下血管新生モデルでの解析から、VASH-1 は主に血管新生が停止する部位の内皮細胞に発現し、血管新生の終息と新生血管の安定化に寄与すること、これに対して VASH-2 は血管新生周辺の間質に浸潤する骨髄由来単核球に発現し、VASH-1 とは拮抗的に血管新生を促進することが明らかとなった。

培養内皮細胞を用いた解析から、VASH-1 は内皮細胞の遊走能や増殖能が低下するだけでなく、活性酸素や血清飢餓などのストレスに対する耐性を増した。これに対し、siRNA を用いて VASH-1 の発現をノックダウンすると、内皮細胞のストレス耐性は減弱し、細胞老化を来した。そこで VASH-1 とストレス耐性、細胞老化との関連について解析を進めたところ、VASH-1 のノックダウンによって早期に SOD2 の発現低下が生じ、このために reactive oxygen species (ROS) が増加して p53 がリン酸化 (活性化) され、さらに p53 の下流の p21 が増加することによって内皮細胞の増殖停止 (細胞老化) を来すことが判明した。また、この反応に引き続いて長寿遺伝子 SIRT1 の内皮細胞での発現が低下した。興味深いことに、VASH-1 を高発現させると SIRT1 の発現は増加し、この SIRT1 の発現増加をノックダウンすることで、VASH-1 による内皮細胞のストレス耐性は消失した。

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 12 件)

1. Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Moriya T, Suzuki S, Kondo T, Sato Y. Vasohibin-1 expressed in endothelium of tumor vessels regulates angiogenesis. *Am J Pathol.* 2009 (in press). (査読有)
2. Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, Ohta H, Fujiwara T, Shimosegawa T, Sato Y. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 2009 (Epub ahead of print). (査読有)
3. Naito H, Kidoya H, Sato Y, Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J. Biochem.* 2009 (Epub ahead of print). (査読有)
4. Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y, Nishida K. Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 52:359-361, 2009. (査読有)
5. Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, Ohuchi N, Sasano H. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci.* 100:88-94, 2009. (査読有)
6. Yoshinaga, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Nobuo Yaegashi, N., Sato Y. Vasohibin, a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor: its expression on endometrial carcinoma in relation to tumor vascularity. *Cancer Sci.* 99: 914-919, 2008. (査読有)
7. Wakusawa, R., Abe, T., Sato, H., Yoshida, M., Kunitaka, H., Sato Y, Nishida K. Expression of vasohibin, an antiangiogenic factor, in human choroidal neovascular membranes. *Am. J. Ophthalmol.* 146:235-243, 2008. (査読有)
8. Sato Y, and Sonoda, H. The vasohibin family: a negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 37-41, 2007.

(査読有)

9. Yamashita, H., Abe, M., Watanabe, K., Shimizu, K., Moriya, T., Sato, A., Satomi, S., Ohta, H., Sonoda, H., Sato, Y. Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 919-925, 2006. (査読有)

10. Shen, JK., Yang, XR., Sato, Y., Campochiaro, PA. Vasohibin is Up-regulated by VEGF in the Retina and Suppresses VEGF receptor 2 and Retinal Neovascularization. *FASEB J.* 20: 723-725, 2006. (査読有)

11. Shibuya, T., Watanabe, K., Yamashita, H., Shimizu, K., Miyashita, H., Abe, M., Moriya, T., Ohta, H., Sonoda, H., Shimosegawa, T., Tabayashi, K., Sato, Y. Isolation of vasohibin-2 as a sole homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin: a comparative study on their expressions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1051-1057, 2006. (査読有)

12. Sonoda, H., Ohta, H., Watanabe, K., Yamashita, H., Kimura H., Sato, Y. Multiple processing forms and their biological activities of a novel angiogenesis inhibitor vasohibin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 640-646, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 29 件)

1. 佐藤靖史. 血管新生阻害剤の分子標的. 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会, 名古屋, 2009.3.21-22.

2. 佐藤靖史. がんにおける血管新生制御の分子基盤. 平成20年度がん特定領域研究5領域合同シンポジウム, 東京, 2009.2.2-3.

3. 佐藤靖史. Common molecular basis for the regulation of angiogenesis and vascular aging. 第4回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 東京, 2009.1.31-2.1

4. 宮下浩輝, 佐藤靖史. Vasohibin-1 is involved in the maintenance of vascular endothelial cells. 第16回日本血管生物医学学会学術総会, 金沢, 2008.12.3-5.

5. 鈴木康弘, 小林美穂, 宮下浩輝, 太田英樹, 園田光, 佐藤靖史. Isolation of a small Vasohibin-binding protein (SVBP) and its important role in the secretion of Vasohibin. 第16回日本血管生物医学学会学術総会, 金沢, 2008.12.3-5.

6. 佐藤靖史. 内因性血管新生抑制因子と癌. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28-30.

7. 鈴木康弘, 小林美穂, 宮下浩輝, 太田英樹, 園田光, 佐藤靖史. Vasohibin結合性低分子量蛋白SVBPの単離とその分泌における役割. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28-30.

8. Sato, Y. The Role of Vasohibin in the Regulation of Tumor Angiogenesis. 9th International Conference Angiogenesis: Basic Science and Clinical Applications, Patras, Greece, 2008.6.22-26.

9. Heishi T, Miyashita H, Takahashi T, Oike Y and Sato Y. Vasohibin Suppresses Lymph Node Metastasis via the Inhibition of Lymphangiogenesis in Mice. 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008.6.22-26.

10. Sato, Y. The Role of Vasohibin in the Regulation of Angiogenesis. 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008.6.1-5.

11. 宮下浩輝, 佐藤靖史. 血管内皮細胞におけるVasohibin-1の標的遺伝子の解析. 第81回日本組織培養学会大会, つくば, 2008.5.19-20.

12. 佐藤靖史. The role of vasohibin in the regulation of angiogenesis in tumors. The U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Program, 京都, 2008.3.19-21.

13. 佐藤靖史. リンパ管新生の内因性抑制因子に関する研究. 第15回日本血管生物医学学会学術大会, 福岡, 2007.11.29-30.

14. 木村洋, 宮下浩輝, 佐藤靖史. Vasohibin familyの血管新生制御における意義. 第15回日本血管生物医学学会学術大会, 福岡, 2007.11.29-30.

15. Sato, Y. Role of vasohibin family in the regulation of angiogenesis. The Joint Meeting of Vascular Biology Organizations in Asia Pacific Region, Tainan, Taiwan, 2007.10.21-24.

16. 佐藤靖史. The role of vasohibin in the regulation of angiogenesis. 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.10.3-5.

17. 瓶子隆弘, 保坂智子, 木村洋, 宮下浩輝, 高橋隆, 佐藤靖史. Vasohibin inhibits lymphangiogenesis in mouse cornea and

xenograft cancer model. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.10.3-5.

18. 宮下浩輝, 佐藤靖史. 転写因子 VEZF の標的遺伝子であるメタロチオネインは血管新生制御に関与する. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007, 徳島, 2007.9.28-29.

19. Sato, Y. The role of vasohibin family in the regulation of angiogenesis. Ang iogenesis & Microcirculation, Newport, USA, 2007.8.19-24.

20. 佐藤靖史. 血管新生制御における vasohibin family の役割. 第 28 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2007.8.2-3.

21. 佐藤靖史. 血管新生制御における vasohibin family の役割. 第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 大阪, 2007.7.13-14.

22. Sato, Y. The role of vasohibin family in the regulation of angiogenesis. Seventh ESH Euroconference on Angiogenesis, Albufeira, Portugal, 2007.5.11-14.

23. 佐藤靖史. Significance and therapeutic application of vasohibin to anti-angiogenesis. 第 14 回日本血管生物医学会, 東京, 2006.12.13-15.

24. 宮下浩輝, 佐藤靖史. Vasohibin の標的遺伝子の解析. 第 14 回日本血管生物医学会, 東京, 2006.12.13-15.

25. 瓶子隆弘, 保坂智子, 木村洋, 鈴木康弘, 宮下浩輝, 佐藤靖史. Vasohibin inhibits lymphangiogenesis in mouse cornea. 第 14 回日本血管生物医学会, 東京, 2006.12.13-15.

26. 佐藤靖史. Significance of Endothelium-derived Angiogenesis Inhibitor Vasohibin in Tumors. The Thirty-seventh International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 東京, 2006.11.14-16.

27. 保坂智子, 瓶子隆弘, 木村洋, 宮下浩輝, 太田英樹, 園田光, 森谷卓也, 鈴木聡, 近藤丘, 佐藤靖史. 内皮由来血管新生抑制因子 vasohibin と腫瘍血管の成熟性との関連. 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006.9.28-30.

28. Kimura H, Miyashita H, Ota H, Sonoda H, Shimosegawa T, Sato Y. Vasohibin, a VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor, may act as a terminator of angiogenesis. XIVth International Vascular Biology Meeting, Noordwijkerhout, Netherlands,

2006.6.6-10.

29. Yamashita H, Abe M, Shibuya T, Watanabe K, Shimizu K and Sato Y. Application of vasohibin for prevention of adventitial angiogenesis and arterial neointimal formation. XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy, 2006.6.6-10.

〔図書〕 (計 1 件)

Sato, Y. Endogenous inhibitors of angiogenesis. Angiogenesis. In “Basic Science and Clinical Applications” (Transworld Research Network) pp 1-14, 2007.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

特許出願「バソヒビンからなるリンパ管新生抑制剤」

発明者: 佐藤靖史

権利者: 東北大学

国内: 基礎出願 2006-324773

出願年月日: 2006 年 11 月 30 日

国外: WO PCT/JP2007/072838

出願年月日: 2007 年 11 月 27 日

特許出願「血管新生促進因子」

発明者: 佐藤靖史

権利者: 東北大学

国内: 基礎出願 2008-21397

出願年月日: 2008 年 1 月 31 日

特許出願「バソヒビン 1 を認識するモノクローナル抗体および該抗体を用いるバソヒビンの免疫測定方法」

発明者: 佐藤靖史, 近藤丘

権利者: 東北大学

国内: 基礎出願 2008-218581

出願年月日: 2008 年 6 月 19 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 靖史 (YASUFUMI SATO)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 50178779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし