

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510217
 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のドメイン構造と生物活性
 研究課題名（英文） The structural domains of Chondromodulin-I, an angiogenesis inhibitor, and their contribution to its bioactivity
 研究代表者
 開 祐司（HIRAKI YUJI）
 京都大学・再生医科学研究所・教授
 研究者番号：40144498

研究成果の概要：

Chondromodulin-Iは無血管軟骨特異的に発現し、その細胞外基質に蓄積する生理的血管新生抑制因子である。血管新生促進因子と比較して、血管新生抑制因子の血管内皮細胞に対する作用機序は、十分に解明されていない。そこで、本研究では、まず、無血清条件下にヒトChondromodulin-Iの大量発現を確立すると同時に迅速簡便精製を行い、高活性の組換え体を調製する。さらに、欠失を含む種々の変異組換えChondromodulin-Iタンパク質を発現させる事により、Chondromodulin-Iの分子特性と活性ドメインの構造を明らかにすることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構

1. 研究開始当初の背景

我々の身体を栄養する血管網は、胎生期の早いうちにまず原始血管網が作られ（脈管形成）と、さらに臓器・組織の形成と成長にあわせて既存血管から新たな血管網が出芽すること（血管新生）によって全身に張り巡らされていく。閉鎖血管系は一旦形成されると安定に機能する必要がある、成体での血管新生は極めて限定的である。しかし、動脈硬化、糖尿病性網膜症、関節性リウマチ炎などでは、血管形成そのものが病態悪化につながる。特

に腫瘍における血管新生は病態形成に決定的で、その抑制は癌治療にも重要である。通常、上皮では細胞同士がしっかり結合して機能が営まれるので血管網は入りこまない。これに対して、上皮を支持する間充織には細胞外マトリックスが豊富で、毛細血管網はこの大きな細胞間スペースに広く分布する。上皮と間充織を仕切る基底膜は特殊な細胞外マトリックス構造体で、通常、間充織の毛細血管網は基底膜を越えて上皮細胞層に達することはない。すなわち、間充織の細胞外マト

リックスは血管侵入許容性 (pro-angiogenic) の環境を作るし、基底膜は血管侵入抵抗性 (anti-angiogenic) な環境を作っていることが知られている。J. Folkman を中心とする Harvard 大学のグループは、腫瘍による血管基底膜成分の分解によって血流に放出される血管新生抑制因子を同定してきた。Endostatin は、このような『隠れた (Cryptic) 血管新生抑制因子』である。ところが、間充織には周囲とは対照的に無血管に保たれる組織がある。軟骨組織が典型で、その血管侵入抵抗性には組織特異的な機能性マトリックスとして血管新生抑制分子が存在する事が想定されてきた。我々は、ウシ胎仔軟骨にコンドロモジュリン-I (Chondromodulin-I) を同定しクローニングした。Chondromodulin-I は無血管軟骨特異的に発現し、その細胞外基質に蓄積することを明らかにしてきた。さらに、CHO 細胞に発現した組換えタンパク質は、血管内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成を抑制するのみならず、腫瘍血管新生やリウマチ関節炎における血管新生も著明に抑制した。最近、遺伝子ノックアウト (chm1-/-) マウスを用いて心臓弁膜症の背景に Chondromodulin-I の発現消失がある事を示す事に成功した。従って、Chondromodulin-I は、生理的に機能している組織特異的な血管新生抑制因子のカテゴリーに分類される最初の分子実体として注目される。

2. 研究の目的

チロシンキナーゼ型細胞膜受容体を介する血管新生促進因子と比較して、血管新生抑制因子の血管内皮細胞に対する作用機序は、十分に解明されていない。血管内皮細胞に対する Chondromodulin-I の作用機序についても、血管新生病態の進行や組織破壊に伴って生成する“隠れた”血管新生抑制因子群と異なることが示唆されている。また、その分子構造のうちに想定される独自の細胞外マトリックス局在化能など、特異な分子特性を持っている。Chondromodulin-I は 120 個のアミノ酸残基よりなるタンパク質で、“隠れた”血管新生抑制因子を生じる細胞外マトリックス分子よりはかなりコンパクトである。なかでも 8 個のシステイン残基を含む約 70 アミノ酸残基のドメインは種間で良く保存されている。我々は CHO 細胞に発現させて生物活性な組換えタンパク質を調製する事に既に成功している。しかし、無血清条件下での発現には成功しておらず、血清成分との強固な凝集や複雑なジスルフィド結合のために、CHO 細胞に発現させた組換え Chondromodulin-I を回収した後に、一旦、ジスルフィド結合を還元して解離条件下に再酸化させることで初めて生物活性標品を得

ることができた。

そこで、本研究では、まず、無血清条件下にヒト Chondromodulin-I の大量発現を確立すると同時に迅速簡便精製を行い、高活性の組換え体を調製する。さらに、欠失を含む種々の変異タンパク質を発現させる事により、Chondromodulin-I の分子特性とドメイン構造を明らかにする。生物活性としては、血管内皮細胞の増殖・遊走や管腔形成反応を指標にモニターする。これらの分子特性とドメイン構造の解明は、Chondromodulin-I 受容体の検索に不可欠の基盤となるのみならず、その生物活性を血管新生病態に対して臨床応用する際に不可欠な分子設計要素となる。

3. 研究の方法

(1) FLAG-Chondromodulin-I (ChM-I) および FLAG-ChM-I 変異体タンパク質発現ベクターの構築：組換えヒト Chondromodulin-I タンパク質 (rhChM-I) を無血清条件下に発現させる。このために、組換えヒト ChM-I は、成熟型ヒト Chondromodulin-I の N 末端側に preprotrypsin leader 配列 (ppt 分泌シグナル) -FLAG タグを付加し、分泌タンパク質として、pCAGGS ベクターにより発現させる。

(2) 無血清培養におけるリコンビナントタンパク質の発現：種々の組換え ChM-I タンパク質や変異体を 293-F 細胞の無血清振とう培養発現系により発現させる。発現蛋白質は、主に FLAG タグによるアフィニティー精製する。

(3) 生物活性の評価：FLAG-ChM-I および変異体の生物活性は、HUVEC の管腔形成アッセイおよび細胞遊走アッセイにより定量的に評価する。遊走アッセイは Boyden-chamber 法を用いることとし、VEGF (vascular endothelial growth factor)-A 刺激に対する細胞の遊走応答を測定する。

(4) 活性ドメインの決定

活性の消失が著しいジスルフィド結合欠失変異体の構造をもとに活性を有する部分配列を推定する。推定された部分配列が活性を有することを示すために、これを欠失した変異体を作製し、活性の消失を確認する。また、還元処理した FLAG-ChM-I は完全に活性を消失しないことから活性を有する一次配列が存在すると推測されるので、この部分配列を化学合成して検証する。また、FLAG-ChM-I Δ C 変異体においても活性変化が認められる場合、C 末端配列を親水性配列に置換した変異体および溶解性を考慮した C 末端配列ペプチドを合成して、当該ドメインの活性を明らかにする。

(5) 血管内皮細胞の細胞骨格改変への効果：ChM-I は、HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) の細胞遊走を阻害するが、その原因の一つとして VEGF-A 刺激に反応する細胞骨格の改変への作用が予測される。推

定された活性ドメインの作用を示すことを検討するため、VEGF-A 刺激後の HUVEC のアクチンフィラメントを phalloidin-Alexa594、focal adhesion を anti-paxillin 抗体で染色し、細胞骨格を可視化することにより評価する。

4. 研究成果

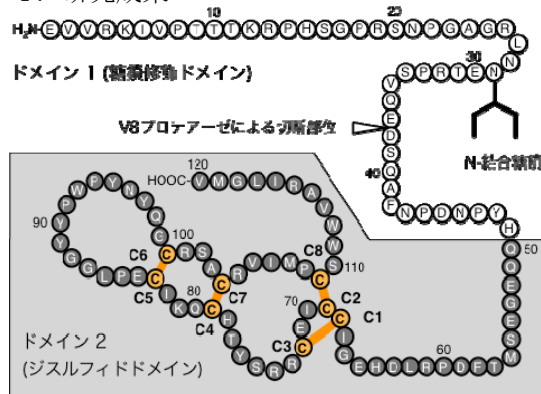


図1. 成熟型ヒトChondromodulin-Iのミノ酸配列とドメイン構造

ヒト Chondromodulin-I 遺伝子は、6 個のエクソンにより構成され、334 残基からなる II 型膜貫通型前駆体をコードしている。細胞外に分泌される成熟型ヒト Chondromodulin-I は前駆体蛋白質の C-末端 120 残基に相当し、エクソン 5 およびエクソン 6 にコードされている。図 1 に示したように、エクソン 5 は N-型糖鎖結合部位を含む親水性領域（ドメイン 1：N-末端から 49 残基の部分）をコードし、エクソン 6 は成熟型 Chondromodulin-I に存在する 8 個のシステイン残基（図中に C1-C8 で示した）の全てを含む疎水性領域（ドメイン 2）をコードしている。これら 8 個のシステイン残基はいずれもジスルフィド結合の形成に参画しており、C1:C3、C2:C8、C4:C7、C5:C6 の間がジスルフィドブリッジが形成されていると推定されている。

そこで、成熟型ヒト Chondromodulin-I に相当する配列をコードする cDNA をベクターに組み込んで大腸菌に発現させることにより、糖鎖修飾を欠いた組換えヒト Chondromodulin-I (NG-rhChM-I) を調製した。NG-rhChM-I は、CHO 細胞由来の糖鎖修飾のある組換え体 (CHO-rhChM-I) に対して 1/10 以下の低い比活性ではあるものの、軟骨細胞の増殖促進活性や培養血管内皮細胞の管腔形成阻害活性を示した。すなわち、糖鎖修飾は ChM-I の生物活性には必要不可欠ではないことが明らかとなった。一方、NG-rhChM-I は生物活性を示すものの、PBS (phosphate-buffered saline) への溶解度は CHO-rhChM-I に比較して遙かに低いことが分かった。むしろ、50%エタノール水溶液には易溶であった。NG-rhChM-I を V8 プロテアーゼで処理すると

Glu37 と Asp38 の間で切断され、N-末端欠失型 Chondromodulin-I (Δ N-hChM-I) を生じる。 Δ N-hChM-I にも生物活性が認められることから、ドメイン 2 が生物活性に不可欠なドメインであり、ドメイン 1 は糖鎖修飾を受けることで ChM-I 分子の可溶化に寄与していることが示唆された。

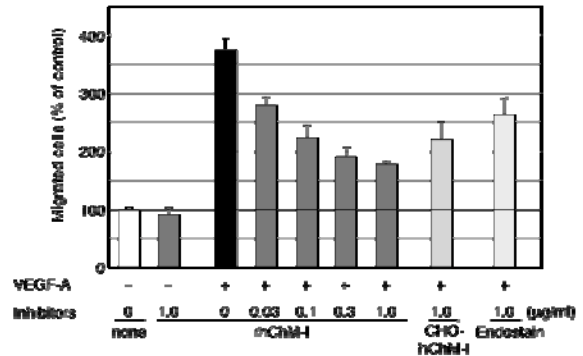


図2. ヒト組換えChM-I (rhChM-I)の血管内皮細胞游走阻害活性

次に、種々の組換え ChM-I 変異体を調製して、その生物活性を比較検討するために、まず、糖鎖修飾を受けた組換えヒト Chondromodulin-I を無血清培養条件下で発現・調製し、簡便精製が可能な系を構築した。すなわち、成熟型ヒト Chondromodulin-I に相当する前駆体部分 (Glu215-Val1334) の N-末端側に FLAG タグを付加した組換え蛋白をコードする DNA 断片を pCAGGS 発現ベクターに組込んで、分泌シグナルの制御下に hChM-I が分泌されるようにコンストラクトした。これを無血清条件下に 293 細胞に発現させ、FLAG アフィニティーによる簡易精製により組換え体を調製した。得られた rhChM-I の生物活性はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた in vitro 管腔形成アッセイを用いて検定し、従来法で CHO 細胞から得られる組換え体 CHO-hChM-I と同等の生物活性を確認した (図 2)。すなわち、Boyden-chamber アッセイにおいて培養 HUVEC を VEGF-A (20 ng/ml) 刺激すると、その細胞游走活性は約 4 倍亢進する。本研究において調製した rhChM-I は、この HUVEC の細胞游走応答を用量依存性に抑制することが分かった (図 2)。その抑制活性は、これまで用いていた CHO-rhChM-I より強く、0.3-1.0 μg/ml で最大となった。この時、培養系に添加した hChM-I は、VEGF-A により惹起される受容体 VEGFR-2 のリン酸化から ERK1/2 にいたるシグナル経路に影響を与えていなかった。また、HUVEC の接着能に対しても影響を与えなかった。一方、タイムラプスによる細胞の移動軌跡の解析から、hChM-I は VEGF-A に刺激された HUVEC の細胞運動にも著明な抑制作用を示すことが、明らかとなった。さらに、in vivo においてマウス角膜血管新生モデルでも血

管新生抑制活性を確認することに成功した。

ウシ胎仔軟骨から精製したウシ ChM-I は DDT やメルカプトエタノール処理などの還元処理により失活することが、既に初期の解析により示されている。そこで、変異 rhChM-I を同様の方法で 293-F 細胞に発現・調製することにより、ChM-I の生物活性ドメインと想定されるドメイン 2 に局在するジスルフィドブリッジの役割を詳細に検討した。すなわち、C1 から C8 の全ての残基をセリンに置換した変異体 (rhChM-I-mutant-all-S) の活性は、天然型の rhChM-I のそれに比して、減弱していた。また、4 個のジスルフィド結合のうち 2 個を作っている C4/C5/C6/C7 の 4 個のシステイン残基をセリンに置換した変異体 (rhChM-I-mutant-S4-7) の活性も、ほぼ同様に低かった。次に、C5:C6 のジスルフィド結合の形成ができない C5 と C6 をセリンに置換した変異体 (rhChM-I-mutant-S5-6) も、弱い阻害活性を示したのみであった。その相対的な活性は、rhChM-I > rhChM-I-mutant-S5-6 > rhChM-I-mutant-S4-7 ≒ rhChM-I-mutant-all-S の順であった。以上の結果は、ChM-I の生物活性の発現にはジスルフィド結合の存在が不可欠で、特に、C5 と C6 のシステイン残基間に形成されるジスルフィド結合が重要であることを示唆している。また、このことは C5:C6 のジスルフィド結合によってできる Glu84 から Gly98 の 15 アミノ酸残基によって形成されるループ構造が標的細胞へのシグナル伝達に重要であることを想起させた。

そこで、この部分に相当する Ile82 から Arg100 までの配列に相当する 19 残基のペプチド (linear Ile82-Arg100 ペプチド) を化学合成により作成した。これを酸化条件下にジスルフィドブリッジを形成させて、cyclic Ile82-Arg100 ペプチドを作成した。linear Ile82-Arg100 ペプチドには、全く生物活性を見いだすことができなかったが、cyclic Ile82-Arg100 ペプチドは用量依存性に HUVEC の遊走阻害活性を示した。さらに、C-末端に存在する極めて疎水性の高い領域が、この環状構造部分の生物活性に補助的に作用するなどの、ドメイン構造と生物活性の相関を解明することができた。また、rhChM-I 処理した血管内皮細胞ではストレスファイバー形成が阻害されていることが明らかとなった。これと関連して、VEGF-A によって誘導される細胞運動の亢進応答も変化して、細胞の運動軌跡をビデオ撮影により解析したところ平均移動速度が低下すると共にならびに移動方向の転換頻度の上昇が認められた。また、このとき、rhChM-I の添加は、VEGF-A による VEGF 受容体のリン酸化に始まり ERK1/2 のリン酸化に至るシグナル伝達経路自体への阻

害効果を示さなかった。以上の結果は、血管内皮細胞には、ChM-I に特異的なシグナル機構が存在することを示唆していた。以上の結果は、Chondromodulin-I の作用機序の解明に重要な手がかりを与えると考えられる (現在、投稿準備中)。

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 4 件)

- ① C. Shukunami, A. Takimoto, S. Miura, Y. Hiraki Chondromodulin-I and Tenomodulin are differentially expressed in the avascular mesenchyme during mouse and chick development. *Cell Tissue Res.*, 332: 111-122, 2008 査読有り
- ② K. Yukata, Y. Matsui, C. Shukunami, A. Takimoto, T. Goto, Y. Nishizaki, Y. Nakamichi, T. Kubo, T. Sano, S. Kato, Y. Hiraki, N. Yasui Altered fracture callus formation in chondromodulin-I deficient mice. *Bone*, 43: 1047-1056, 2008 査読有り
- ③ Y. Anraku, H. Mizuta, S. Kudo, E. Nakamura, K. Takagi, Y. Hiraki The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage*, 16: 961-964, 2008 査読有り
- ④ C. Shukunami, Y. Hiraki Chondromodulin-I and Tenomodulin: the Negative Control of Angiogenesis in Connective Tissue. *Curr. Pharm. Design*, 13: 2101-2112, 2007 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 開 祐司 結合組織の血管侵入抵抗性と軟骨形成. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 20 年 10 月 23 日、京都
- ② 開 祐司 軟骨形成・維持と ECM 環境. 第 29 回日本炎症・再生医学会、平成 20 年 7 月 9 日、東京
- ③ 三浦 重徳、宿南 知佐、開 祐司 Chondromodulin-I の血管内皮細胞に対する遊走阻害活性. 第 8 回運動器科学研究会、平成 19 年 8 月 24 日、徳島
- ④ S. Miura, C. Shukunami, Y. Nishizaki, Y. Hiraki A potential role of decidual chondromodulin-I in the control of cell migration and invasion of trophoblast giant cells. The 21st Century COE Symposium for Integration of

Transplantation Therapy and
Regenerative Medicine、平成 19 年 6 月
29 日、京都

〔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

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

開 祐司 (HIRAKI YUJI)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40144498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし