

平成22年 5月 14日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ~ 2009
 課題番号：19790509
 研究課題名 (和文) 内皮細胞自身が産生する血管新生抑制因子Vasohibinに結合する
 蛋白の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of Vasohibin-binding proteins
 研究代表者 鈴木 康弘(SUZUKI YASUHIRO)
 東北大学・加齢医学研究所・産学官連携研究員
 研究者番号：60332277

研究成果の概要 (和文) : 血管新生抑制因子Vasohibin結合する二つの蛋白の機能解析を行った。Vasohibin結合性低分子量蛋白SVBP (small Vasohibin binding protein) は血管内皮細胞内でVasohibinと複合体を形成し細胞外への分泌を促進すること、Vasohibin結合性膜蛋白TMEM16FはVasohibinによる α -チューブリンの転写後修飾の誘導に部分的に関与することから、両蛋白はVasohibinによる血管新生制御に重要な分子であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In this study, the physiological functions of two Vasohibin-binding proteins were analyzed. A small Vasohibin-binding protein (SVBP) interacted with Vasohibin within vascular endothelial cell and enhanced the extracellular secretion of their complex. TMEM16F affected the posttranscriptional modification of α -tubulin induced by Vasohibin. These results suggested that SVBP and TMEM16F might contribute to the anti-angiogenic activity of Vasohibin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

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：血管新生、内皮細胞、蛋白質分泌、細胞遊走、微小管、チューブリン、
 ユビキチン化、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

血管新生は、血管内皮細胞によるプロテアーゼの産生→基底膜の溶解→遊走・増殖→管腔形成→基底膜・壁細胞の再構築といった一連のステップを経て完了する。これらの複雑なステップは促進因子と抑制因子のバラ

スによって調節されており、これまでに様々な調節因子が報告されてきた。研究代表者の所属研究室では過剰な血管新生に対して負に制御する新規フィードバック因子としてVasohibin-1 (VASH1) を単離・同定した。VASH1は、血管新生刺激に反応した血管内皮細胞自

身から産生・分泌されることから、これまでに報告されてきた抑制因子とは全く異なるタイプの新規血管新生抑制因子である。VASH1 遺伝子の発現は、VEGF や FGF 等の血管新生促進因子の刺激に応じて PKC (特に PKC δ) を介するシグナルを介して促進され、この促進作用は IL-1 や TNF α 等のサイトカインによって抑制される。また、VASH1 蛋白の C 末端側にはヘパリン結合性と血管新生抑制活性が保持されており、血管内皮細胞内においてプロテアーゼにより限定分解されることによって、血管新生抑制活性を欠損した VASH1 蛋白が作り出されることが明らかにされている。また、VASH1 とアミノ酸組成上約 50% の相同性を有する VASH2 も同定している。一方、病態との関係では、癌・動脈硬化病変・未熟児網膜症モデルにおいて、VASH1 は血管新生部位の内皮細胞に局在すること、さらに、アデノウイルスベクターなどを用いて外来性に VASH1 を投与することによって、血管新生が抑制され、これらの病態が改善されることが報告されている。

これまでの報告は、血管新生における VASH1 のネガティブフィードバック調節因子としての役割を十分に立証するものである。しかしながら、VASH1 の作用機序としては血管内皮細胞の増殖や遊走を特異的に阻害することが明らかになっているが、その分子メカニズム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た。

本研究を計画するにあたり、事前に Two-hybrid 法により VASH1 に結合する二種類の興味深い蛋白質をクローニングした。共に機能が全くわかっていない蛋白質であり、そのうちの一つは、14kDa の低分子量蛋白で内皮細胞に恒常的に発現しており、SVBP (small Vasohibin binding protein) と命名した。VASH1 にはクラシカルなシグナル配列が存在しないこと、血管内皮細胞の免疫染色像では ER (calnexin) と局在を異にすることから、その分泌メカニズムは全く不明である。予備的な実験結果では、SVBP は内皮細胞の細胞質に局在し VASH1 の蛋白質安定化に寄与すること、VASH1 だけでなく VASH2 にも結合すること、VASH1 が細胞外に分泌される際にも結合して細胞外に放出されることが示唆されていた。このことから、VASH1 蛋白は SVBP と結合することによって、何らかの制御を受けて細胞外へ放出されることが予想された。一方、もう一つの結合蛋白は 8 回膜貫通ドメインを有する細胞膜蛋白 TMEM16F であった。VASH1 は細胞外に分泌された後、内皮細胞自身に作用して血管新生ネガティブフィードバック効果を発揮する。予備実験の結果では、VASH1 は内皮細胞のチューブリンの脱チロシン化を引き起こし、重合安定化を引き起こすことが示唆されていた。チューブリンの重合

安定化は、タキソールなどの一部の抗癌剤・抗血管新生剤や Wnt シグナルで引き起こされることが知られている。このような VASH1 の作用を発揮するためには、内皮細胞表面には VASH1 受容体が存在することが予想され、この細胞膜蛋白が VASH1 に対する受容体として機能する可能性がある。以上の経緯から、申請者は、VASH1 に結合する SVBP と細胞膜蛋白のそれぞれの機能を解析することによって、VASH1 による血管新生ネガティブフィードバック調節機構の詳細を解明する手がかりになると確信し、本研究を構想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記二つの VASH1 結合性蛋白のそれぞれの機能を解析することによって、VASH1 による血管新生ネガティブフィードバック調節機構の詳細を解明することである。具体的には、SVBP に関しては、VASH1 との結合の生理的意義、VASH1 の細胞外分泌における役割を明らかにする。細胞膜蛋白については、VASH1 受容体あるいは VASH1 の作用を仲介する膜蛋白として機能するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) SVBP の発現パターンの解析

SVBP に対する抗体を用いた免疫染色法や、RNA プローブを用いた in situ hybridization 法およびノーザンブロット法、RT-PCR 法によりマウス各臓器や血管内皮細胞における SVBP の発現パターンを確認する。

(2) 細胞内外の VASH1-SVBP 複合体形成とその局在

内皮細胞内および細胞外に分泌された VASH1 が SVBP との複合体形成を維持しているかどうかを免疫沈降法にて調べる。SVBP 蛋白中に唯一存在する 58 番目システインをセリンに変換した変異体 SVBP 蛋白を作製し、VASH1 蛋白との結合、安定化および細胞外分泌に対する影響を調べる。培養内皮細胞内における VASH1 と SVBP の共局在を免疫染色法にて確認するとともに、in situ proximal ligation assay にて細胞内における VASH1-SVBP 複合体の形成と局在を確かめる。

(3) SVBP の VASH1 蛋白の細胞外分泌及び溶解性に対する影響

SVBP の強制発現あるいは SVBP の siRNA 導入により内在性 SVBP をノックダウンすることより血管内皮細胞が産生する VASH1 蛋白の細胞外分泌及び 1% TritonX-100 溶液への溶解性が変化するかどうかウェスタンブロットにて解析する。さらに、SVBP の有無によって分泌される VASH1 蛋白の量的変化を ELISA 法にて調べる。

(4) SVBP の VASH1 蛋白安定性に対する影響

SVBP の有無による VASH1 蛋白のコピキチン

ープロテアソーム系による蛋白分解に対する影響についてウェスタンブロットにて解析する。

(5) VASH1による血管内皮細胞の遊走阻害に対するSVBPの影響

培養内皮細胞に VASH1 と SVBP を強制発現させ VEGF 誘導性の内皮細胞の遊走に対する影響を調べる。同じく、培養上清中に分泌された VASH1 と SVBP の効果についても調べる。

(6) VASH1 結合性膜蛋白質の機能解析

VASH1 結合性細胞膜蛋白 TMEM16F の siRNA 導入により VASH1 によるチューブリンの脱チロシン化誘導に対する影響をウェスタンブロットにて調べる。

4. 研究成果

主な結果を以下6点にまとめる。

(1) 各臓器におけるSVBPの発現パターン

ノーザンブロット法および RT-PCR 法により、マウス生体内の臓器間の SVBP の発現量の比較を行ったところ、骨髄や脾臓に加え、特に精巣において非常に強い発現が確認された(図1)。また、in situ hybridization 法による解析から精子形成過程における精原細胞・精母細胞にて強く発現することがわかった。培養細胞においても、VASH1 の発現は内皮細胞に選択的であるが、SVBP は内皮細胞に限らず癌細胞を含む様々な細胞でも恒

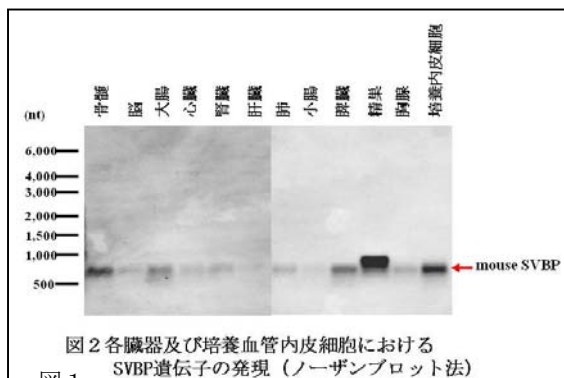


図1 各臓器及び培養血管内皮細胞におけるSVBP遺伝子の発現(ノーザンブロット法)

(2) SVBPは細胞内でVASH1と複合体を形成し細胞外へ分泌される

SVBP と VASH1 それぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により SVBP と VASH1 が内皮細胞内及び細胞上清中(細胞外)で複合体を形成することを示した(図2)。

また、SVBP 蛋白中に唯一存在する58番目システインをセリンに変換した変異体 SVBP 蛋白を作製し、VASH1 蛋白との結合、安定化および細胞外分泌に対する影響を調べたが、正常 SVBP と同等の効果が確認されたため SVBP-VASH1 相互作用には SVBP 蛋白のシステインを介するジスルフィド結合は関与しないと予測された。これらの結果に加え、免疫染色法と in situ Proximity Ligation Assay によって、細胞の頂端側で SVBP-VASH1 複合

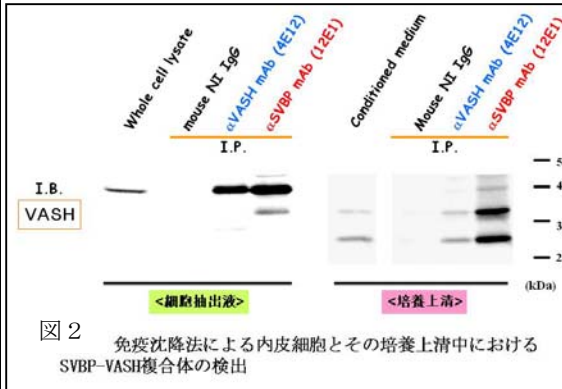


図2 免疫沈降法による内皮細胞とその培養上清中におけるSVBP-VASH1複合体の検出

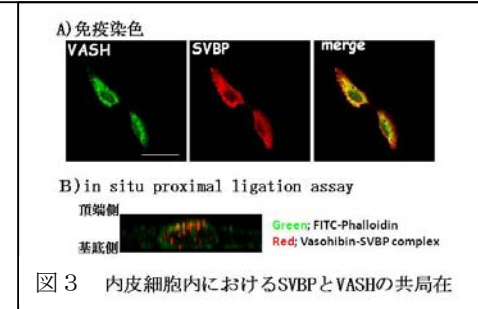


図3 内皮細胞内におけるSVBPとVASH1の共局在

体が集積することを証明した(図3)。

(3) SVBPはVASH1 蛋白の細胞外分泌及び溶解性を亢進する

内皮細胞では、通常多くの VASH1 蛋白が不溶画分(1% TritonX-100 溶液に不溶)にプールされるが、SVBP を強制発現した内皮細胞では、VASH1 が可溶画分に溶出し易くなり、細胞外への分泌が促進された(図4)。逆に、SVBP をノックダウンした内皮細胞では、VASH1 の不溶画分への集積が促進され、細胞外への分泌が抑制された。また、SVBP の強制発現及び siRNA によるノックダウンは、VASH1 の mRNA レベルに影響を与えないことが確認された。さらに、SVBP と Vasohibin に対する各特異抗体を用いた ELISA 法によって、培養内皮細胞により分泌される SVBP-VASH1 複合体の濃度を測定し、SVBP の発現量に依存して VASH1 の細胞外分泌量が制御されることを定量的に示した。その効果は小胞体ーゴルジ体輸送経路の阻害剤 Brefeldin A (BFA) 処理によって影響を受けないことが明らかとなった(図5)。

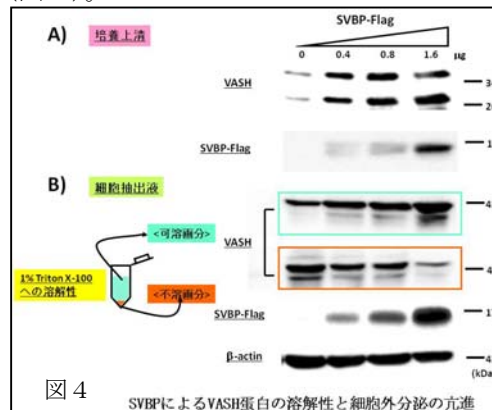


図4 SVBPによるVASH1蛋白の溶解性と細胞外分泌の亢進

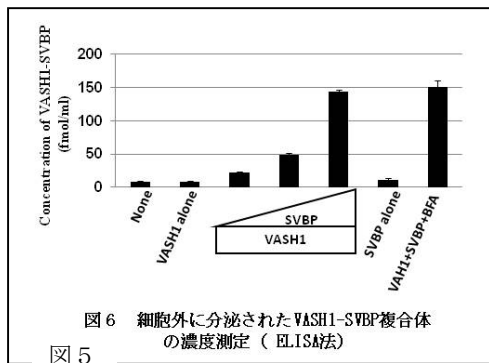


図6 細胞外に分泌されたVASH1-SVBP複合体の濃度測定 (ELISA法)

図5

(4) SVBPはVASH1 蛋白のユビキチン化を阻害し、蛋白を安定化する

VASH1はプロテアソーム阻害剤MG-132存在下において、VASH1蛋白のポリユビキチン化が確認され、SVBPとの共発現によってVASH1のポリユビキチン化が抑制され、プロテアソームによる分解から回避することが確認さ

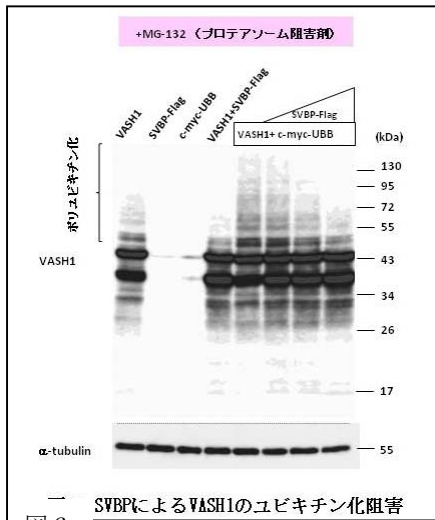


図6 SVBPによるVASH1のユビキチン化阻害

(5) VASH1による血管内皮細胞の遊走阻害に対するSVBPの影響

培養内皮細胞にVASH1を強制発現させるとVEGF刺激による細胞遊走が抑制され、SVBPとの共発現によってその抑制効果が増強された。さらに、SVBPとの強制発現により培養上清中に分泌されたVASH1-SVBP複合体の濃度に依存して血管内皮細胞の遊走が抑制さ

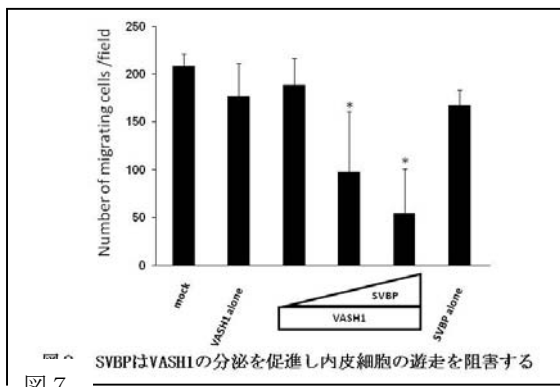


図7 SVBPはVASH1の分泌を促進し内皮細胞の遊走を阻害する

図7

れることを示した (図5と7)。

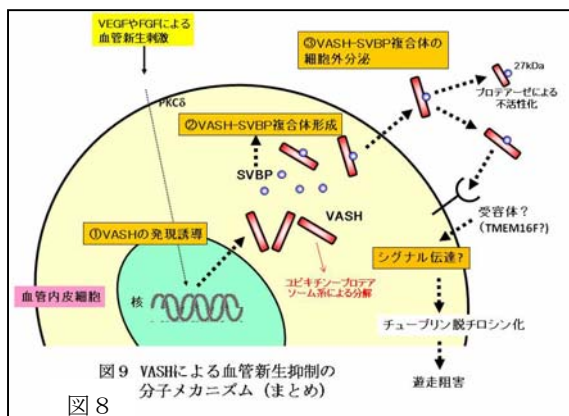
(6) VASH1 結合性膜蛋白質TMEM16FはVASH1誘導性のチューブリンの転写後修飾に関する

培養内皮細胞にTMEM16FのsiRNAを導入し、ノックダウンするとVASH1による α チューブリンの脱チロシン化が部分的に阻害された。同じく、この阻害効果は、VASH1自身はもちろんのこと、SVBPのノックダウンによっても確認された。

以上の結果から、SVBPは血管新生刺激に反応した血管内皮細胞でVASH1蛋白が合成されると複合体を形成し、細胞外への分泌を促進し、VASH1による抗血管新生効果を発揮するための重要なパートナー分子として機能することが明らかとなった。また、SVBPはVASH1蛋白の溶解性を亢進し、ポリユビキチン化を抑制する (図8)。このような性質は、蛋白質の正常な折りたたみを制御する一部のヒートショック蛋白の性質に類似しており、SVBPは新規の分泌性シャペロン様分子として機能することが考えられる。VASHはクラシカルな分泌シグナルを有しておらず、詳細な分泌メカニズムはわかっていない。FGF-2やガレクチンに代表される一連の分泌シグナルを有さないleaderless蛋白に対して、SVBPが機能するかどうか今後検討したい。

一方、TMEM16Fは、VASH1によるチューブリンの脱チロシン化反応の誘導に部分的に関与することが示唆された (図8)。TMEM16FはTMEM16ファミリー (別名Anoctaminファミリー) に属する膜蛋白質であるが、ごく最近、TMEM16ファミリーが細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加に応じて開口する Ca^{2+} 活性化 Cl^{-} チャネルであることが報告された。本研究では、TMEM16Fにのみ焦点を当てていたが、内皮細胞に優位に発現している他のファミリー分子があるかどうか、また、VASHとの特異的結合の有無について確かめる必要があり、実際にVASH1受容体として機能するかどうかを今後さらに検討していきたい。

血管内皮細胞自身が産生する内因性血管新生抑制因子としてはVASH1が世界で初めて発見された分泌蛋白である。従って、VASHファミリーによる血管新生ネガティブフィードバック調節機構の解析は、国際的にも数多くの研究者が凌ぎを削っている血管新生の研究領域の中にあつて、独創性の極めて高い研究テーマである。本研究によってもたらされた成果は、VASHファミリーによる血管新生のネガティブフィードバック調節の作用メカニズム解明だけでなく、血管新生が関わる多くの病態に対する新しい治療法の開発に向けた大きな足掛かりとなると期待できる。



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3件)

- ① Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y. Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. Journal of Cell Science 査読有、2010、in press
- ② Heishi T, Hosaka T, Suzuki Y, Miyashita H, Oike Y, Takahashi T, Nakamura T, Arioka S, Mitsuda Y, Takakura T, Hojo K, Matsumoto M, Yamauchi C, Ohta H, Sonoda H, Sato Y. Endogenous Angiogenesis Inhibitor Vasohibin1 Exhibits Broad-Spectrum Antilymphangiogenic Activity and Suppresses Lymph Node Metastasis. The American Journal of Pathology 査読有、176、2010、1950-1958
- ③ Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Moriya T, Suzuki S, Kondo T, Sato Y. Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. The American Journal of Pathology 査読有、175、2009、430-439
- ④ 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、査読有、113、2009、4810-4818

[学会発表] (計4件)

- ① 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、血管新生抑制因子Vasohibin-1 はチューブリンの脱アセチル化を誘導することで内皮細胞の遊走阻害を引き起こす、第17回日本血管生物医学学会学術大会、平成21年10月8-9日、東京
- ② 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、Vasohibin-1

induced deacetylation of α -tubulin triggers an inhibition of endothelial cell migration、第68回日本癌学会学術総会、平成21年10月1-3日、横浜

- ③ 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大会・The 6th Korea-Japan Symposium on Vascular Biology、平成20年12月3-5日、金沢
- ④ 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の単離と分泌における役割、第67回日本癌学会学術総会、平成20年10月28-30日、名古屋

[図書] (計1件)

- ① 鈴木康弘、佐藤靖史、羊土社、実験医学増刊 シグナル伝達研究2008-'09第2章-11 Vasohibinによる血管新生のネガティブフィードバック調節、2008、158-163

[その他]

ホームページ等

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/vascbi/o/>

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・産学官連携研究員

研究者番号：60332277

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし