

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32301

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501006

研究課題名（和文）核蛋白ピグペンの血管新生促進作用の機序の解明と血管新生制御への応用

研究課題名（英文）Mechanism how pigpen, a nuclear protein induces angiogenesis and the application for the control of angiogenesis

研究代表者

安部 まゆみ（ABE MAYUMI）

上武大学・看護学部・医学生理学研究所・教授

研究者番号：80271980

研究成果の概要（和文）：申請者らが見出した PILSAP の血管新生ならびに脈管形成促進作用の分子学的機序を解明する過程で、核蛋白ピグペンの関与が示唆された。siRNA による発現阻害実験から、ピグペンも血管新生と脈管形成に関与する因子であることが明らかとなった。VEGF 非添加時ピグペンは核に、PILSAP は細胞質に主に存在し、VEGF 添加により細胞質の PILSAP は核に移動してピグペンと共局在した。以上より、ピグペンが PILSAP と協調して血管新生ならびに脈管形成にも関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：While the authors investigated how PILSAP, which we found as an angiogenic factor as well as a vasculogenic one, a nuclear protein Pigpen was thought to play a certain role there. The inhibition of Pigpen expression by siRNA showed that pigpen was involved in angiogenesis and vasculogenesis. Moreover, VEGF (vascular endothelial growth factor) increased PILSAP-pigpen complex formation by mobilization of PILSAP from cytoplasm to nucleus. Our study demonstrates that PILSAP may cooperate with pigpen to induce angiogenesis and vasculogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍血管生物学

キーワード：血管新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性・進行性悪性腫瘍に対する血管新生抑制療法：主要な癌治療には外科手術、放射線・化学療法がある。手術不能、再発、副作用など、従来の治療法では対応できない症例に対し血管新生抑制

療法が試みられている。しかしながら、無効例や有害事象などもあり、更なる血管新生抑制療法の開発や効果の検証が必要である。そのためには、血管新生の分子学的機序を踏まえた血管新生制御因子の研究が必須である。

(2) 血管新生の機序：成体には既存の血管から出芽や嵌入などにより新たな血管が形成される狭義の血管新生

(angiogenesis) と血管内皮前駆細胞から分化した血管内皮細胞(endothelial cell: EC) により血管が形成される脈管形成 (vasculogenesis) の2つの様式が存在する。かつて後者は胎生期にのみ見られると考えられていた。血管新生因子や機序など、胎生期と成体での血管新生、あるいは血管新生と脈管形成の機序には共通点が多い。申請者らも、胎性期の新生血管の EC 特異的に強く発現する転写因子 *ets-1* や *vezfl* が、成体での血管新生にも作用する事を報告した。また、申請者らが発見した血管新生調節因子バゾヒビン *vasohibin* やピューロマイシン非依存性ロイシン特異的アミノペプチダーゼ (puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase: PILSAP) も胎児と成体の両方で血管新生制御を担う事を示した。

(3) 血管新生促進因子 PILSAP：申請者らは PILSAP が血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) による EC の増殖、遊走、管腔形成の促進に関与し、VEGF 依存性の血管新生促進因子であることを報告した。しかし PILSAP の脈管形成への関与は不明であった。そこで申請者は、*in vitro* のマウス胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞の分化系を用いて PILSAP のアミノペプチダーゼ活性が EC 分化や血管叢形成に関与する事を示し、この分子が脈管形成にも必要である事を明らかにした。

(4) 詳細な機能が不明な核タンパク質 *pigpen*：ES 細胞から EC への分化過程で PILSAP のアミノペプチダーゼ活性に発現を制御される核蛋白を、プロテオーム解析により検出したところ *pigpen* が得られた (未発表)。*pigpen* は、Alliegro らがウニのレクチン類似物質として 1988 年に発見したカハール(コイル)体蛋白である。*pigpen* が血管新生に関与する可能性を示唆する報告はなされているが、詳細な機序は不明なままである。

2. 研究の目的

(1) *pigpen* が血管新生や脈管形成に関与するか否かを検討する。

(2) *pigpen* が血管新生調節因子であるとしたら、PILSAP はどのように関与するのか、その機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) *pigpen* の血管新生に及ぼす影響：

① *pigpen* の細胞内局在を確認し、PILSAP と同様に VEGF や塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) でその発現が増強するかを細胞免疫染色や Western blot で検討する。

② *pigpen* の脈管形成に及ぼす影響を *in vitro* のマウスの ES 細胞の分化系において検証する。具体的には siRNA で *pigpen* の発現を抑制した場合に内皮細胞への分化や胚様体 (embryoid body: EB) 内の脈管の形成がどのように変化するのかを観察する。

③ *pigpen* の血管新生に及ぼす影響を血管内皮細胞を用いた *in vitro* の系で検討する。具体的には siRNA で *pigpen* の発現を抑制した場合に内皮細胞の増殖や遊走、ネットワーク形成どのように変化するのかを観察する。

(2) *pigpen* の発現・機能阻害による血管新生の抑制：*pigpen* の発現阻害により *in vivo* での血管新生が抑制されるかを検討し、さらに担癌動物モデルにおいて、腫瘍血管新生抑制を介した腫瘍増殖、転移の阻害が見られるかを検討する。

① マウス皮下に VEGF あるいは bFGF を混入したマトリゲルを注入し、ゲル内に侵入する血管を *pigpen* の発現阻害により阻止できるかを検討する。siRNA のゲルへの混入で十分な血管新生の阻害が見られない場合は、*pigpen* の shRNA を組み込んだアデノウイルスベクターを用いる。

② 次に、ヌードマウスの皮下に癌細胞株を混入したマトリゲルを注入する。腫瘍血管新生、腫瘍の発育、転移を解析する。この際、①で得られた方法により *pigpen* の発現を阻害した場合に、これらの現象が抑制されるか否かを検討する。

(3) *pigpen* と PILSAP による血管新生における協調作用：PILSAP の血管新生に関与する可能性のある核蛋白 *pigpen* が、実際、PILSAP と協調して血管新生に働くのか。両分子が結合するか否かを調べる。

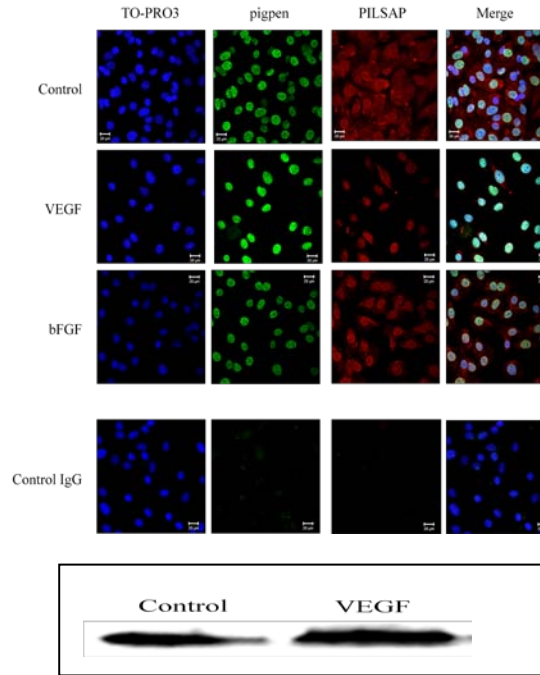
① アミノペプチダーゼ活性を欠除した ES 細胞由来の EB における両分子の発現を Western blot で検討する。

② 培養 EC および EB において両分子が結合する可能性があるのかを細胞免疫染色や免疫沈降-Western blot (IP-Western) で検討する。

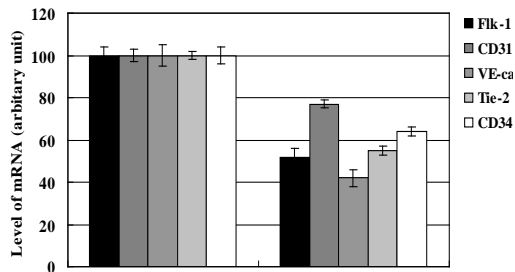
4. 研究成果

(1) ピグペンの血管新生に及ぼす影響：

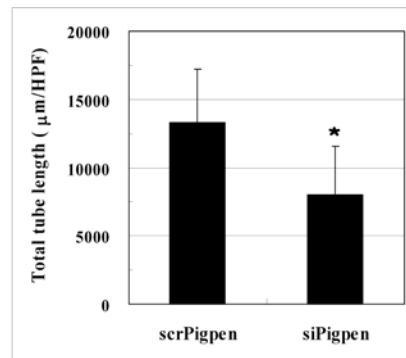
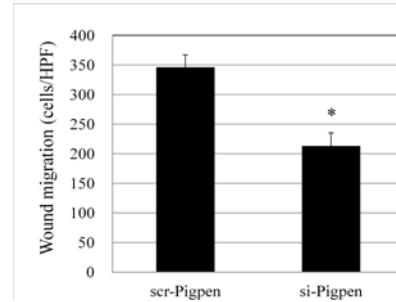
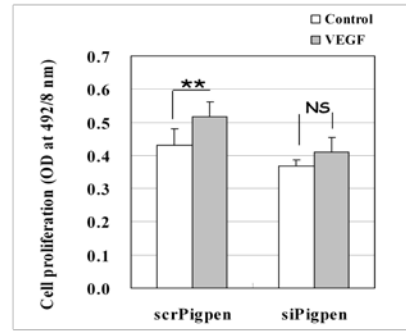
①ピグペンの細胞内局在：細胞免疫染色により PILSAP は EC の細胞質、特に核周囲の細胞質に存在することが確認され、ピグペンは核に存在する事が判明した。また、VEGF によりピグペンの発現が亢進する事が細胞免疫染色と Western blot で明らかとなった。



②ピグペンの脈管形成に及ぼす影響：マウス ES 細胞の in vitro 分化系においてピグペンの発現を siRNA で抑制したところ、EC の系列マーカーの発現が有意に抑えられ、また EB 内の CD31 陽性の脈管構造の発達も阻害された。以上よりピグペンは脈管形成に関与することが示唆された。

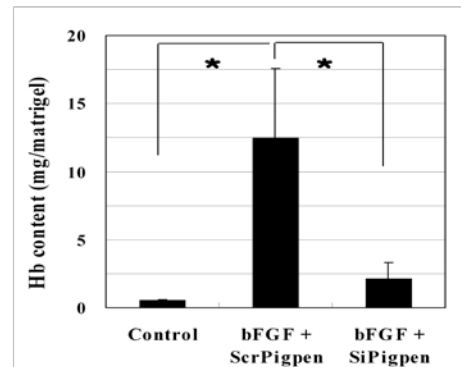


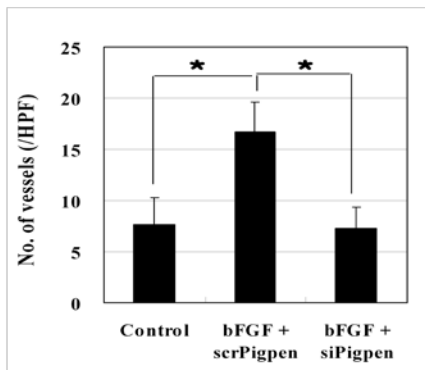
③ピグペンの血管新生に及ぼす影響：マウス EC を用いた in vitro の血管新生実験(増殖、遊走、管腔形成)において、ピグペンの siRNA はこの全てを阻害した。以上よりピグペンは血管新生にも関与することが示唆された。



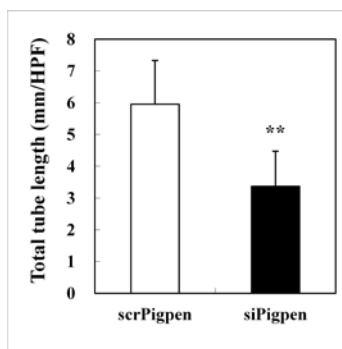
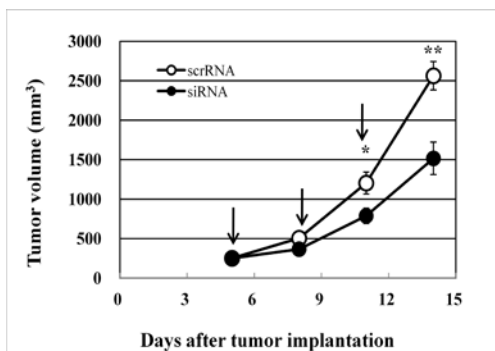
(2) ピグペンの発現・機能阻害による血管新生の抑制：

①マウス皮下に注入した bFGF 含有のマトリゲル内に侵入する血管をヘモグロビン含有量ならびに単位面積当たりの VE-カドヘリン陽性の脈管の数で検討したところ、ピグペン siRNA を混入した群では、コントロールの scrRNA 群に比べ血管新生が阻害された。



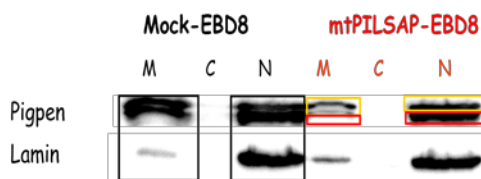


②マトリゲルにルイス肺がん細胞とともにピグペン siRNA あるいはコントロールの scrRNA を混入し、マウス皮下に注入し、腫瘍の増殖と腫瘍血管新生を観察したところ、siRNA 群で腫瘍増殖と腫瘍血管新生が有意に抑制された。

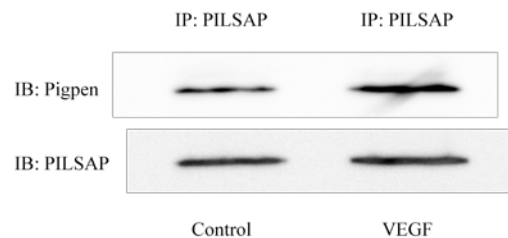


(3) ピグペンと PILSAP による血管新生における協調作用：

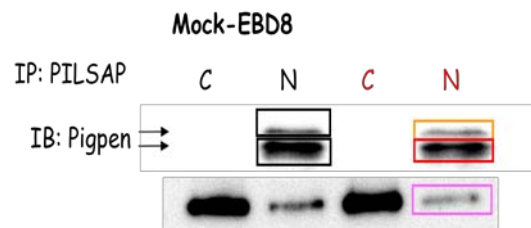
①EB におけるピグペンの局在：アミノペプチダーゼ活性を欠失した PILSAP の ES 細胞由来 EB では核および核膜のピグペンの発現が有意に阻害され、PILSAP の酵素活性がピグペンの発現に必要なことが判明した。



②培養 EC および EB における PILSAP とピグペンの結合：マウス EC では両分子は結合し、その結合は VEGF で増加する事が示唆された。



また、EB でも PILSAP とピグペンは結合しており、その複合体は核に存在する。アミノペプチダーゼ活性を欠失した PILSAP の ES 細胞由来 EB ではその複体の形成が阻害されており、両分子の結合にはアミノペプチダーゼ活性が必要であると考えられた。



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 4 件)

- ① T. Akahori, A. Kobayashi, M. Komaki, H. Hattori, K. Nakahama, S. Ichinose S, M. Abe, S. Takeda, I. Morita. Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hindlimb ischemia in mice. Tissue Engineering, Part A, 16(3): 953-959. 2010. 査読有
DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0097.
- ② T. Yoshida, Y. Sato, I. Morita, M. Abe. Pigpen, a nuclear coiled body component protein, is involved in angiogenesis. Cancer Science, 101(5): 1170-1176, 2010. 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01494.x.

- ③ T. Yoshida, M. Komaki, H. Hattori, J. Negishi, A. Kishida, I. Morita, M. Abe. Therapeutic Angiogenesis by Implantation of a Capillary Structure Constituted of Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30: 1300-1306, 2010. 査読有
DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.198994.
- ④ A. Taki, M. Abe, K. Oku, S. Iseki, S. Mizutani, I. Morita. Expression of angiogenesis-related factors and inflammatory cytokines in placenta and umbilical vessels in pregnancies with preeclampsia and chorioamnionitis/funisitis. *Congenital anomalies*, 52(2): 97-103, 2012. 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2012.00359.x.

[学会発表] (計3件)

- ① 須藤乃理子, 吉田朋子, 星野優子, 小牧基浩, 中浜健一, 久保田俊郎, 安部まゆみ, 森田育男: 生体外で作成した血管網を用いた血管再生療法 (ワークショップ) 第31回日本炎症・再生医学会2010.8.5, 東京
- ② Oshima-Sudo N, Yoshida T, Akahori T, Komaki M, Nakahama K, Abe M, Morita I. Vascular regeneration using cell-printing system. Symposium56 Nanobiotchnology in vascular medicine, The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, December 8-10, 2011, Tokyo
- ③ Oshima-Sudo N, Hoshino Y, Komaki M, Nakahama K, Kubita T, Abe M, Morita I. Optimized method for culturing outgrowth endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood. Poster Session IV. Endothelium and Pericytes, The 17th International Vascular Biology Meeting, June 2-5, 2012, Wiesbaden, Germany

[図書] (計4件)

- ① 安部まゆみ, 森田育男, 日本臨床社, 関節リウマチー寛解を目指す治療の新時代—[第2版], 日本臨床増刊号, 5:183-188, 2010
- ② 安部まゆみ, 朝倉書店, 血管生物医学事典, 92-193, 2011
- ③ 安部まゆみ, 朝倉書店, 血管生物医学事典, 194-195, 2011
- ④ 安部まゆみ, 東京医学社, *JOHNS*, 27(11), 1705-1711, 2011

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 まゆみ (ABE MAYUMI)
上武大学・看護学部・教授
研究者番号: 80271980

(2) 研究分担者

森田 育男 (MORITA IKUO)
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)総合
研究科・教授
研究者番号: 60100129
吉田 朋子 (MORITA IKUO)
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)総合
研究科・寄付講座教員
研究者番号: 40401369

(3) 連携研究者

佐藤靖史 (SATO YASUFUMI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 50178779