

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590099

研究課題名(和文)血管新生阻害因子アンギオスタチンの新規活性、新規受容体と作用機序

研究課題名(英文)Novel functions, membrane receptor and mechanisms for angiostatin

研究代表者

高橋 悟(TAKAHASHI, Satoru)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20268098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜タンパク質p130をアンギオスタチンASの新規受容体として同定した。p130のvWF様ドメインを含む細胞外領域には、AS結合部位が存在した。血管内皮細胞をVEGF刺激すると誘導されるNO産生促進、COX-2発現、細胞遊走促進に対して、ASはいずれも抑制作用を示し、それらにp130が関与することが見出された。NO産生抑制においては、eNOSとHSP90の結合をASが阻害することが示唆された。COX-2発現抑制や細胞遊走抑制においては、JNKの活性化をASが阻害することが示唆された。また、p130はVE-cadherinやβ-cateninと複合体を形成することも判明した。

研究成果の概要(英文)：We identified membrane protein p130 as a novel receptor for angiostatin (AS). Extracellular region of p130 including vWF-like domains binds AS. AS inhibited VEGF-induced NO production, COX-2 expression in vascular endothelial cells and migration of endothelial cells. We found that p130 might mediate such effects of AS. Our data suggest that AS impairs HSP90 association with eNOS, and that AS activates JNK activation. In addition, p130 forms a complex with VE-cadherin and beta-catenin in endothelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アンギオスタチン 血管新生 血管内皮細胞 受容体 eNOS COX-2

## 1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の成長には、腫瘍細胞に酸素と栄養を供給する新しい血管の形成が必要不可欠である。また、腫瘍細胞の転移の通路としても、新生血管が関与する。血管新生は、血管内皮増殖因子 (VEGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) などの血管新生誘導因子とアンギオスタチンやエンドスタチンなどの血管新生阻害因子の量的、質的バランスによって調節されている。アンギオスタチンは、培養血管内皮細胞の増殖や遊走を抑制し、血管新生を阻害する因子として発見された。その構造は、プラスミノゲンの断片であるが、プラスミンへの変換とは異なる切断で生じており、酵素活性は有さない。担癌マウスでの実験においては、アンギオスタチンによる血管新生の抑制により、重篤な毒性が現れることなく、95%以上の種類の癌の縮小や消失がみられた。これらのことから、アンギオスタチンは「夢の抗癌剤」として期待されている。しかしながら、アンギオスタチンには抗炎症作用など新たな生理活性も見出されつつあるうえに、結合タンパク質や作用機序などの不明な点も多く、薬物としての応用に課題を残している。実際、未だにアンギオスタチンが内皮細胞の増殖や遊走を抑制する細胞内情報機序はほとんど未解明の状況であり、全容の解明が求められている。

アンギオスタチンは、内皮細胞の細胞膜に存在する受容体を介して作用を発揮するものと考えられている。これまでにアンギオモチン、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 、細胞膜 ATP 合成酵素などが受容体として報告されているが、これらの分子の間には特に共通性はない。また、これらの分子だけではアンギオスタチンの多彩な作用すべてを仲介することは説明しきれず、未知のアンギオスタチン受容体の存在が推察されてきた。

我々は血管内皮細胞に対する新しい作用を検討した。その結果、内皮細胞の機能や血流循環の維持、血管新生に重要な役割を果たしている一酸化窒素 (NO) の産生をアンギオスタチンが抑制する作用をもつこと、血管新生において誘導され、血管新生に促進的にはたらくシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現をアンギオスタチンが抑制する作用をもつことを報告している。また、アンギオスタチンには内皮細胞の活性酸素種の生成を調節する作用も示唆されている。また、アンギオスタチン結合タンパク質を探索するため、アンギオスタチンをベイトとして酵母ツーハイブリッド法にてヒト胎盤 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、1回の細胞膜貫通領域を有するタンパク質の cDNA を得た。さらに解析を進め、このタンパク質の全長 cDNA をクローニングしたところ、細胞外領域に IGF 結合タンパク質様ドメイン、数回の糖鎖結合配列、6回のフォンビルブランド因子 (vWF) 様ドメインを有す

る特異な構造の分子量 130 kDa のタンパク質を同定した。

## 2. 研究の目的

本研究では、アンギオスタチンの新規活性およびその新規受容体 p130 の機能や役割の検討および、アンギオスタチンの作用機序 (受容体から細胞内情報系) の解明を目的とする。

新規活性として、活性酸素種の産生抑制作用を検討する。新規受容体 p130 に関しては、既知のアンギオスタチンの作用 (NO 産生抑制、COX-2 発現阻害、細胞増殖抑制、細胞遊走抑制) を仲介するのかが検討する。また、アンギオスタチン結合部位の同定を行う。アンギオスタチンの作用機序として、p130 を介した細胞内情報系への影響について、検討する。

## 3. 研究の方法

代表者と分担者は、それぞれのもつアドバンテージを配慮して配分した実験の企画・遂行および小括を、各研究室ごとに行った。また代表者は全体の総括とともに、実験の進捗状況により担当の調整を行い、効率的な研究の進行に配慮した。

アンギオスタチンの新規活性については、血管内皮細胞における活性酸素種の産生に対する影響を、活性酸素種に対する蛍光プローブを用いて検討した。新規受容体 p130 の役割 (アンギオスタチンのどの活性を仲介するか) については、血管内皮細胞におけるアンギオスタチンによる NO 産生抑制、COX-2 発現阻害、細胞増殖抑制、細胞遊走抑制を p130 が仲介するのかが検討するため、RNAi や阻害剤を利用した。NO 産生量は HPLC を組み合わせた Griess 法により測定し、eNOS や COX-2 などのタンパク質はイムノプロット法で、mRNA は RT-PCR で測定した。細胞遊走については、コンフルエントの単層を一定幅で剥離し、一定時間後に写真撮影を行い、細胞の移動距離を計測した。アンギオスタチン結合ドメインの解析では、p130 改変体を COS-7 細胞に発現させ、アンギオスタチンと結合実験を行った。アンギオスタチン結合は、イムノプロット法で測定した。また、内皮細胞のライゼートから p130 を免疫沈降し、共沈するタンパク質をイムノプロット法で解析することにより、細胞内情報系につながる分子を検討した。p130 の短い細胞内領域をベイトとし、酵母で作成したヒト胎盤 cDNA ライブラリーをツーハイブリッドスクリーニングすることにより、p130 と細胞内で相互作用するタンパク質を探索した。

## 4. 研究成果

細胞膜タンパク質 p130 を、アンギオスタ

チンの新規受容体として同定した。初めに全長 p130 を COS-7 細胞に発現し、アンギオスタチンとの結合実験を行ったところ、p130 依存的なアンギオスタチンの結合が認められた。また、p130 の細胞外ドメインをさまざまに改変した p130 分子を作成後、COS-7 細胞に発現し、アンギオスタチンの結合実験を行ったところ、p130 の vWF 様ドメインを含む細胞外領域に、アンギオスタチン結合部位が存在することが判明した。

血管内皮細胞を VEGF 刺激すると誘導される NO 産生促進、COX-2 発現、細胞増殖促進、細胞遊走促進に対して、アンギオスタチンはいずれも抑制作用を示した。それに対して、p130 の RNAi を行った細胞においては、これらの抑制作用がいずれも消失あるいは減弱した。これらの結果より、検討したアンギオスタチンの抑制作用のすべてに p130 が関与することが判明した。

さらに細胞内機序を検討した。NO 産生抑制においては、eNOS 活性化経路を検討した。eNOS 活性は、主として細胞内カルシウム濃度、HSP90 の eNOS との結合、eNOS のリン酸化により促進される。VEGF 刺激における細胞内カルシウム濃度の上昇にはアンギオスタチンは影響しなかった。HSP90 はチロシンリン酸化されて、eNOS と結合するが、HSP90 のチロシンリン酸化は抑制しないにもかかわらず、アンギオスタチンは eNOS と HSP90 の結合を阻害した。HSP90 依存的に Akt が eNOS をリン酸化するが、上記の HSP90 結合の阻害の結果、アンギオスタチンにより eNOS の Ser1177 のリン酸化が抑制され、eNOS の活性化が阻害された。以上がアンギオスタチンが NO 産生を抑制する機序であると示唆された。一方、COX-2 発現抑制や細胞遊走抑制においては、VEGF で活性化される細胞内情報系の Erk, p38, JNK, Akt を検討した。アンギオスタチンは、Erk, Akt のリン酸化（活性化）には影響を与えなかったが、p38 と JNK のリン酸化（活性化）を抑制した。p130 の RNAi 細胞では、アンギオスタチンによる JNK 活性化の抑制が低下した。JNK 阻害剤は、VEGF 刺激による COX-2 発現や細胞遊走を抑制した。以上の結果より、アンギオスタチンは JNK 活性化の阻害を介して、COX-2 発現抑制や細胞遊走の抑制をおこすものと示唆された。

次に p130 から細胞内への情報系を解明するために、相互作用する分子の検討を行った。内皮細胞より p130 を免疫沈降し、共沈するタンパク質を検討した。その結果、内皮細胞間の細胞接着分子 VE-cadherin とそれに細胞内で相互作用する  $\beta$ -catenin が検出された。すなわち、p130 は VE-cadherin や  $\beta$ -catenin と複合体を形成することが判明した。一方、酵母ツーハイブリッド法による p130 細胞内領域と相互作用する分子の探索からは、細胞周期調節分子やアポトーシス関連分子などが陽性として得られた。これらが確かに p130

と相互作用するのか、については検討中である。

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0件)

〔学会発表〕(計4件)

中島 由希子、新屋 智寛、秋山 友希、佐藤 圭創、高橋 悟  
血管内皮細胞の管腔形成における CRIM1 の機能  
日本薬学会第 134 年会  
熊本市総合体育館  
2014 年 3 月 27 日～30 日

阪中 麻利子、小倉 有紀、中村 まち、杉山 晶則、高橋 悟  
血管新生抑制因子アンギオスタチンとフィブロネクチンの相互作用  
日本薬学会第 134 年会  
熊本市総合体育館  
2014 年 3 月 27 日～30 日

中島 由希子、新屋 智寛、秋山 友希、戸田 憲一、佐藤 圭創、高橋 悟  
血管内皮細胞の管腔形成における CRIM1 の機能  
第 36 回日本分子生物学会年会  
神戸ポートアイランド  
2013 年 12 月 3 日～6 日

森本 麻由佳、高橋 悟  
CRIM1 細胞内領域の血管内皮細胞における機能  
第 36 回日本分子生物学会年会  
神戸ポートアイランド  
2013 年 12 月 3 日～6 日

〔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

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
高橋 悟 (TAKAHASHI, Satoru)  
武庫川女子大学・薬学部・教授  
研究者番号：20268098

(2)研究分担者  
杉山 晶則 (SUGIYAMA, Akinori)  
岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号： 4 0 2 6 0 3 1 9

佐藤 圭創 (SATO, Keisuke)  
九州保健福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号： 0 0 3 1 5 2 9 3

(3)連携研究者

阪中 麻利子 (SAKANAKA, Mariko)  
武庫川女子大学・薬学部・助教  
研究者番号： 4 2 5 1 0 9

新屋 智寛 (SHINYA, Tomohiro)  
九州保健福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号： 6 0 5 5 1 2 9 9