

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24659378

研究課題名（和文） 組織線維化・癌を増悪させず、組織修復を可能にする技術の開発

研究課題名（英文） Development of technology capable of promoting tissue remodeling without stimulating tissue fibrosis and cancer growth

研究代表者

小嶋 聡一（KOJIMA SOICHI）理化学研究所・分子リガンド生物研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10202061

研究成果の概要（和文）：

蛋白質架橋酵素トランスグルタミナーゼ2 (TG2) が発生に伴う生理的血管形成には影響せず、移植癌細胞による腫瘍血管形成に働くこと、すなわち TG2 の KO や阻害剤は、選択的に腫瘍血管形成や線維化に伴う病的血管形成のみを抑えることを見出した。さらに、腫瘍や線維化に伴う病的血管新生に TG2 がどのように働いているかを検討した結果、TG2 により Rb タンパク質の架橋・リン酸化→転写因子 E2F の活性化→ヒストントリメチラーゼ EZH2 の発現上昇→内在性血管形成阻害因子 vasohibin 1 (VASH1) の発現抑制という作用機序を見出した。今後 TG2 並びにこれらの標的分子の特異的阻害剤を見つけ出すことによって、線維化・癌を増悪させず、組織修復を可能にする技術開発の可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

We found an essential role of TG2 in tumor-induced angiogenesis through a comparison between TG2^{+/+} and TG2^{-/-} mice, which show no abnormal manifestation during development. We provide evidence that TG2 controls crosslinking and phosphorylation of RB proteins and trans-activation of E2F that results in induction of EZH2, which suppresses an anti-angiogenic factor, vasohibin 1 (VASH1), thereby sustaining tumor angiogenesis. Thus, TG2 and under signaling molecules maybe a novel target for anti-angiogenic therapy against cancer, without affecting tissue remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,700,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Transglutaminase 2 (TG2), Tumor (cancer), Retinoblastoma (RB) protein, Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2), Vasohibin 1 (VASH1)

1. 研究開始当初の背景

Transglutaminase 2 (TG2) は、Lys-Gln 残基間に架橋結合を形成する酵素であり、細胞の増殖、分化、アポトーシスに関わることが知られていたが、血管新生に対する役割については不明であった。一方、TG2 は、細胞質では GTPase として働いたり、細胞膜内外で Scaffold 活性を発現することにより、細胞の生存を高めること、さらには、PDI 活性やリン酸化活性を有することも報告されている (Physiol Rev 2009)。TG2 が血管新生にプラス/マイナスのどちらに働くのかを確かめるために、TG2 欠損 (KO) マウスの背にマウス由来肺癌細胞を移植し、その周囲で形成される腫瘍血管新生を観察 (DAS アッセイ) したところ、野生型に比べて TG2 KO マウスでは、腫瘍血管新生の著しい欠損を観察した (第 19 回日本血管生物医学学会学術集会、2011)。同様な結果は、マトリゲルプラグアッセイ、動脈リングアッセイでも観察された。

その様子は、マウスに VASH1 アデノウイルス発現ベクターを投与した際のフェノタイプ (Am J Pathol 2009) と類似していた。

さらに、ポリコム遺伝子 EZH2 が VASH1 発現を抑制すること、EZH2 の上流で働く E2F がこの腫瘍血管新生経路で関与することが報告された (Cancer Cell, 2011)。

また、E2F の安定化には、TG2 による RB タンパク質の架橋・リン酸化が働いていることが報告された (FEBS, 2011)。

しかし、TG2 が特異的腫瘍血管新生の生物学的経路にどのように働くかは不明であった。

2. 研究の目的

最近 KO マウスを用いて蛋白質架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) が発生に伴う生理的血管形成に影響なく、移植癌細胞による栄養血管形成に働くことを検証する。また、

TG2 KO マウスでは、胆管結紮肝線維化 (BDL) モデルに伴う血管新生と線維化の形成が少ないことを検証する。さらに TG2 による病的血管新生維持の分子機構を解明し、腫瘍や線維化に伴う病的血管新生に特異的に作用する標的分子を同定して、将来 TG2 並びに同標的分子の特異的阻害剤を見つけ出すことによって、病的血管新生のみを特異的に抑えることにより、線維化・癌を増悪させず、組織修復を可能にする技術開発の可能性の有無を検討する。

3. 研究の方法

TG2 野生型、KO マウス由来肺初代血管内皮細胞を用いて western blotting, Real time Quantitative PCR, Mouse Aorta Ring Assay など、血管生物学的、分子細胞生物学的解析方法により解明する。

4. 研究成果

1) TG2 による腫瘍血管新生維持の分子機構を詳細に検討したところ、TG2 による RB タンパク質の架橋・リン酸化修飾による転写因子 E2F 活性化、EZH2 発現誘導、VASH1 発現抑制が必須であることを野生型及び TG2 欠損マウス由来肺動脈内皮細胞を用いて実証した。動脈リング ex vivo 病理学的血管新生プロセス解析モデルでは、TG2 特異阻害剤 R281/R283 を用い動脈リングの血管新生が阻害されるのを確認した。

2) TG2 の発現に依存して変化する遺伝子産物の網羅的探索を Gene Chip を用いて行った。その結果、TG2 欠損血管内皮細胞では血管新生抑制因子の VASH1 の発現が亢進していることが分かった。そこで、TG2 による VASH1 を介した腫瘍

血管新生抑制機構を明らかにするために、TG2/VASH1 ダブル欠損マウスを作製した。

3) TG2 により架橋されるマトリックス蛋白質断片の網羅的探索を行うために、肝類洞壁内皮細胞を野生型と TG2 欠損マウスより単離した。

4) 食品素材より TG2 核局在を標的とした病的細胞死制御剤を同定するために、ウコンから抽出した画分から有用な画分を決定した。正常肝細胞を抽出画分入りの培地中で培養した後に、細胞質と核における TG2 活性を定量した。その結果、ウコン抽出画分の一つが肝障害時の肝細胞死の原因となる TG2 の核局在、もしくは核での活性を強く阻害することを見出した。

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0件)

[学会発表] (計10件)

1. 李殷瑞 “腫瘍血管形成におけるTG2の役割” 日本レチノイド研究会第15回トランスグルタミナーゼ研究会学術集会、2012年12月13日～2012年12月13日、福岡
2. 李殷瑞 “Essential role of transglutaminase 2 in non-developmental angiogenesis and underlying molecular mechanism” 第20回日本血管生物医学会学術集会・第10回Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 2012年12月06日～2012年12月06日、徳島
3. 小嶋聡一 “血管新生におけるトランスグルタミナーゼの非常に重要な役割” 日本レチノイド研究会第23回学術集会、2012年10月19日～2012年10月20日、米子
4. 小嶋聡一 “タンパク質架橋酵素トランス

グルタミナーゼによるVASH1発現抑制を介する腫瘍血管形成の維持” 第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日～2012年09月21日、札幌

5. 李殷瑞、小嶋聡一 “Essential role of TG2 in nondevelopmental angiogenesis including tumor-induced angiogenesis” 2012 Gordon Research Conference、2012年07月15日～2012年07月19日、ノースカロライナ (米国)
6. 小嶋聡一 “Essential role of TG2 in tumor angiogenesis” 2012 Gordon Research Conference、2012年07月15日～2012年07月19日、ノースカロライナ (米国)
7. 小嶋聡一 “Essential role of transglutaminase 2 in tumor angiogenesis by suppression of VASH1 expression” 2012 Cell Symposia、2012年07月06日～2012年07月08日、ブリュッセル (ベルギー)
8. 小嶋聡一 “タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼによるVASH1発現抑制を介する腫瘍血管形成の維持” 第16回日本がん分子標的治療学会、2012年06月27日～2012年06月29日、北九州
9. 小嶋聡一 “血管新生による肝線維化促進” 第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年06月07日～2012年06月09日、東京
10. 李殷瑞、小嶋聡一 “Essential role of transglutaminase 2 in cancer angiogenesis” 2nd SNY- RIKEN Joint Symposium on Chemical Biology、2012年05月17日～2012年05月18日、春川 (韓国)

[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
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小嶋 聡一 (KOJIMA SOICHI)
理化学研究所・分子リガンド生物研究チ
ーム・チームリーダー
研究者番号：10202061

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし