

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830072

研究課題名(和文) Tie1細胞外ドメインによる腫瘍血管新生の制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of tumor angiogenesis by Tie1 ectodomain

## 研究代表者

山川 大史 (YAMAKAWA, DAISHI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：20631097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管新生の阻害は、がん細胞への栄養補給の遮断につながり、がんの増大を抑制できる。申請者は、血管安定化分子であるTie1受容体が血管新生刺激で切断される現象に着目した。本研究では、切断されたTie1細胞外ドメインが血管内皮細胞に直接作用することで病的血管新生を抑制することを培養細胞レベルから個体レベルまで明らかにした。

今後は、腫瘍内血管におけるTie1切断誘導法の確立、あるいはTie1細胞外ドメイン結合蛋白の発現制御法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Suppression of tumor angiogenesis suppress penetration of nutrients into tumor, resulting in tumor growth suppression. It is known that receptor tyrosine kinase Tie1 associates with vascular stabilization. In this study, we focused on the function of Tie1 ectodomain which is cleaved by angiogenic stimulation. We identified that Tie1 ectodomain suppresses pathological angiogenesis via direct interaction with endothelial cells in vitro and in vivo. In the future, we hope to establish the induction method of Tie1 ectodomain shedding or regulation method of Tie1 ectodomain binding molecule in tumor vasculature.

研究分野：血管生物学

キーワード：腫瘍血管新生 血管新生阻害 蛋白質分解酵素

## 1. 研究開始当初の背景

日本の死因疾患の上位には、がんや動脈硬化、心筋梗塞がある。これら疾患の病態のほとんどに血管構造の異常が報告されており、疾患の理解を深めるためには血管形成の分子機構を明らかにする必要がある。中でもがんの増大には血管が必須であり、血管研究はがんの治療法開発に繋がるため社会的意義が大きい。血管は酸素と栄養を全身に供給し、血管からの血液漏洩を防ぐには頑丈な管腔構造を必要とする。管腔構造の維持には、血管内皮細胞同士または血管内皮細胞と血管内皮細胞を裏打ちする壁細胞との強固な接着が必要である。しかし、腫瘍内の低酸素・低栄養環境下では腫瘍細胞から分泌される様々な増殖因子やサイトカインの作用で、細胞間接着が崩壊し、脆弱な血管が構築され、酸素や栄養の供給機能を失った無機能血管が増加する。そのため現行の抗がん剤治療においては、薬理成分を腫瘍内部まで十分に運搬できず、薬効を最大限に引き出すことができないため問題となっている。一方で、腫瘍細胞が増殖に必要な栄養を血管から供給できない場合、腫瘍は一定サイズにとどまり、抗腫瘍効果を発揮する。これらに着目し、腫瘍内血管を制御して腫瘍の成長を抑制する以下の二つの方法が研究されている。

制御法 1：腫瘍血管新生を阻害し腫瘍細胞の増殖を抑制する方法

制御法 2：腫瘍血管を正常化して抗がん剤の運搬を改善する方法

これまでに、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) のシグナルが最も血管新生に貢献していると考えられ、このシグナルを遮断することで、新生血管が崩壊し、腫瘍細胞の増殖を抑制できることが明らかとされてきた(制御法 1)。臨床でも VEGF の中和抗体が応用されており、抗腫瘍効果が確認されている。しかし本治療法は高血圧・腎障害等の副作用を持つと同時に、VEGF 以外の血管新生促進因子による血管新生が生じるため問題であった。そのため他の標的分子による血管新生制御法の開発が求められてきた。そこで申請者らは VEGF/VEGFR2 に代わる治療法の開発を目指して、新規血管新生制御因子の探索とそれら因子の血管安定化作用に関する研究を行ってきた。

受容体型チロシンキナーゼ Tie は血管構造の安定化を担っており、Tie1 と Tie2 のファミリー分子が知られている。Tie2 はリガンド Angiopoietin (Ang) が同定され、Tie2 による血管安定化と血管新生の機能解析が進んでいる。申請者らは Tie2 の機能解析を進める中で、Tie2 が細胞膜上の微小構造体カベオラに移動して血管安定化シグナルを伝達すること、また薬剤でカベオラを破壊すると、血管新生促進シグナルを伝達することを明

らかにした (Kato et al. *Exp Cell Res.*, 315:2818, 2009)。さらに、Tie2 は腫瘍内の血管内皮細胞では主に血管新生促進シグナルを伝達しているため、Tie2 活性の阻害が腫瘍血管新生を抑制することを明らかにしてきた (Yamakawa et al. *BBRC*, 415:174, 2011、制御法 1)。

一方、Tie1 はリガンドが同定されていないため、機能的に不明な点が多い。しかし、Tie1 欠損マウスの血管内皮細胞は増殖型に変化し、細胞間接着機能が破綻し出血性の胎生致死となるため、Tie1 の血管安定化への関与が示唆されている (Sato et al. *Nature*, 376:70, 1995)。また、Ang1 が Tie2 に結合すると細胞内チロシン残基のリン酸化が生じ、細胞内シグナル伝達を開始する。同時に Tie2 が Tie1 のリン酸化を誘導する。これについて申請者らも定常状態の血管内皮細胞では Tie1 と Tie2 は異なる局在を示すが、Ang1 が Tie2 に結合すると共局在することを明らかにした (Yamakawa et al. *J Biol Chem.*, 288:12469, 2013)。Tie1 の血管安定化作用が示唆される一方で、VEGF による血管新生刺激が Tie1 の細胞外領域の切断を誘導することが報告されている。この時、Ang1/Tie2 の細胞内シグナルが増強することから、Tie1 は Tie2 シグナルを制御することで血管安定化を誘導することが示唆されている。

申請者は、腫瘍内血管の Tie1 発現を上昇させることで血管を安定化させ、抗腫瘍効果を獲得できると仮説をたて、Tie1 の発現誘導の研究を進めてきた(制御法 2)。しかし、血管新生刺激で Tie1 が切断されることを踏まえ、腫瘍内に Tie1 細胞外ドメインを過剰発現させると、腫瘍径が縮小し、さらに血管数の減少が確認された。このことは、Tie1 が受容体として機能するだけでなくリガンドとしての機能も併せ持つことを示唆し、血管新生を抑制する抗がん治療への応用が期待できた(制御法 1)。

## 2. 研究の目的

細胞膜貫通型の受容体 Tie1 は、血管内皮細胞に発現して血管の安定化に寄与しており、細胞外領域の切断は血液が漏れ出る不安定な血管を構築する。しかし近年、申請者らは Tie1 細胞外ドメインを腫瘍内で過剰発現させると、腫瘍径が縮小し腫瘍内血管数が減少することを新たに見いだした。このことは、Tie1 が受容体として血管安定化に機能するだけでなく、Tie1 細胞外ドメインがリガンドとして抗腫瘍作用に関わっていることを示唆する。Tie1 細胞外ドメインの機能が明らかになれば、それに基づく抗がん治療への応用も期待できる。そこで本研究は抗がん治療の開発を目指して、Tie1 細胞外ドメインの抗腫瘍効果に関わる作用機序を明らかにするこ

とを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) Tie1 細胞外ドメインの血管内皮細胞への作用

Tie1 細胞外ドメイン過剰発現時に腫瘍血管新生が抑制されたことを受け、Tie1 細胞外ドメインが腫瘍内でいかなる細胞に作用しているかを検討した。最も可能性の高い標的細胞である血管内皮細胞に重点を置き、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC に可溶性 Tie1 を添加する実験系にて、細胞増殖、管腔形成試験を実施した。

#### (2) Tie1 細胞外ドメイン結合蛋白の同定と結合阻害による腫瘍形成への影響

同ファミリー分子である Tie2 と Tie2 結合蛋白の特異的結合配列から推察し、Tie1 細胞外ドメインにも類似のアミノ酸配列が存在するかを *in silico* にて解析した。Tie1 と Tie1 結合蛋白の相互作用が抗腫瘍効果に寄与するかを明らかにするために、Tie1 結合蛋白との結合に重要な Tie1 の配列を異なるアミノ酸に置換し、両者の結合を阻害する変異体を作製した。この Tie1 細胞外ドメイン変異体を腫瘍細胞に遺伝子導入し、腫瘍形成させた際に Tie1 細胞外ドメイン過剰発現でみられた血管新生抑制効果が打ち消されるかを腫瘍径や腫瘍組織の血管の免疫染色にて評価した。

#### (3) Tie1 細胞外ドメイン切断抑制による血管形成への影響の評価

Tie1 細胞外ドメイン切断の生理的意義を明らかにするために、Tie1 細胞外ドメイン切断を抑制したマウスを作製し、表現系の解析と血管新生誘導時の変化を各種臓器組織の H&E 染色、血管の免疫染色にて評価した。また、血管機能の評価として、エバンスブルーを用いた皮膚血管の透過性試験を行った。さらに、腫瘍血管新生への影響を調べるために、野生型マウスと Tie1 変異型マウスの皮下に腫瘍細胞を移植し、形成された腫瘍の腫瘍径や腫瘍組織の血管の変化を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) Tie1 細胞外ドメインの血管内皮細胞への作用

Tie1 細胞外ドメインが血管内皮細胞に作用しているかを明らかにするために、培養血管内皮細胞 HUVEC を用いて、細胞増殖試験ならびに管腔形成試験を実施した。Tie1 細胞外ドメインは、市販のリコンビナント蛋白であるヒト Tie1-Fc を使用した。Tie1-Fc 添加群はネガティブコントロールの IgG-Fc 添加群に比べ、細胞増殖・管腔形成ともに濃度依存的に減少させた。

#### (2) Tie1 細胞外ドメイン結合蛋白の同定と結合阻害による腫瘍形成への影響

(1)の Tie1-Fc による血管新生抑制効果が、どのような作用機序で生じているかを解明するために、Tie1 細胞外ドメインが結合する蛋白を探索した。当研究室では以前、Tie1 と相同性の高い Tie2 の細胞外ドメインが細胞表面蛋白 X と結合する可能性を見出している。この相互作用は Tie2 に含まれる特定の アミノ酸配列 XXXX が関わっている。そこで Tie1 も Tie2 に含まれる特定の アミノ酸配列 XXXX を保持しているか、また同じ細胞表面蛋白 X との結合が起こりうるかを検討した。アミノ酸配列では、Tie2 と同じ特定配列 XXXX は存在しなかったが、同族の細胞表面蛋白 Y との結合に必須のアミノ酸配列 YYYYY が存在することを明らかにした。

次に Tie1 細胞外ドメインと Y との相互作用が腫瘍血管新生抑制に貢献しているかを明らかにするために、Tie1 細胞外ドメインの YYYYY 配列を異なる ZZZZ 配列に置換し、腫瘍細胞に過剰発現させ、マウス皮下に腫瘍形成させた。YYYYY 配列を持つ Tie1 細胞外ドメインを発現する腫瘍細胞では、コントロール腫瘍細胞に比べて、腫瘍径が縮小したのに対し、ZZZZ 配列に置換した Tie1 細胞外ドメインを発現する腫瘍細胞は、コントロール腫瘍細胞が形成する腫瘍径とほぼ同等であった。さらに、これらの腫瘍組織を血管の特異的マーカーである CD31 による蛍光免疫染色を行ったところ、腫瘍径と血管数に正の相関がみられた。このことから、Tie1 細胞外ドメインによる腫瘍血管新生抑制効果は、血管内皮細胞への直接的な増殖・管腔形成抑制作用に起因し、さらにその作用は Tie1 細胞外ドメインの血管内皮細胞に発現する細胞表面蛋白 Y への結合に依存していることが示唆された。

今後、本研究成果を応用して、血管新生阻害を誘導する薬剤開発に発展させるために、Tie1 細胞外ドメインの細胞表面蛋白 Y と結合する YYYYY 配列を残した低分子量の蛋白の合成を試み、より特異性の高い血管新生阻害剤の開発が期待される。

#### (3) Tie1 細胞外ドメイン切断抑制による血管形成への影響の評価

(1)、(2)にて、Tie1 細胞外ドメインによる血管内皮細胞を介した腫瘍血管新生抑制効果を明らかにした。一方、生体内において、Tie1 切断がどれほど貢献しているかは不明のままである。そこで、Tie1 切断の生理的意義を明らかにする目的で、Tie1 切断が生じない遺伝子改変マウスの作製を試みた。ヒト Tie1 の切断領域は、すでに報告があるため、マウス Tie1 に該当する領域を欠失させた遺伝子改変マウスの構築を行った。近年著しく発展を遂げたゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを採用し、本領域に近い部位にいくつか guide RNA を設計し、遺伝子改変を行ったところ、Tie1 切断領域の 2 アミノ酸が欠失した Tie1 欠失変異 (Tie1 Tg)

マウスが作製できた。本マウスと同様の欠失変異を持つ Tie1 プラスミドを作製し、培養細胞 HEK293T に過剰発現させ、in vitro で Tie1 切断の確認を行った。Tie1 切断を誘導する刺激下において、野生型 Tie1 は切断を受けるが、Tie1 欠失変異体はほとんど切断されないことが分かった。そこでまず生理的な血管形成における Tie1 切断の意義を明らかにするために、Tie1 Tg マウスを用い、出生後の網膜血管新生、8~10 週齢の成体マウス各種臓器の血管について、組織学的な解析を行った。しかし、どちらも血管の形態や数などには異常がないことを確認した。また、フローサイトメトリー解析から、8~10 週齢の成体マウスにおいては、各種臓器血管内皮細胞に発現する Tie1 の発現にはほとんど変化が見られなかった。そこで、病的な血管新生における Tie1 切断の有無を調べるため、マトリゲルプラグアッセイによる新生血管の評価、腫瘍細胞の皮下移植による担癌マウスモデルによる腫瘍血管新生の評価、を行った。まず Tie1 Tg マウスでは血管新生に最も寄与している血管内皮増殖因子 (VEGF) によって誘導される血管新生の評価を行った。野生型マウスに比べ、Tie1 変異型マウスで皮下に注入したゲル内への血管形成が多く生じており、血液の蓄積も増加していた。さらに Tie1 Tg マウスを実施するため、マウス肺がん培養細胞 (LLC) をマウス皮下に移植した。Tie1 Tg マウスは野生型マウスに比べ約 2 倍腫瘍径が増大した。このことから、腫瘍血管新生に影響があることが推測されたため、腫瘍内血管を組織学的に評価した。Tie1 Tg マウスにおいて、腫瘍血管密度の増加が確認された。

以上のことから、Tie1 の切断は病的な血管新生の際に頻繁に生じており、血管密度を制御することによって腫瘍細胞の増殖を負に制御していることが明らかとなった。

(1)~(3)の研究により、Tie1 細胞外ドメインが血管内皮細胞に直接的に作用し血管新生抑制作用を示すことで、腫瘍増大を抑制していることを明らかにできた。今後は、腫瘍内血管において、Tie1 切断を効率良く誘導すること、あるいは Tie1 細胞外ドメインが結合する細胞表面蛋白質 Y の発現制御などを標的とした血管新生阻害療法の確立に向けた基礎研究を進める必要がある。

#### 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 2 件)

Zhang L, Takara K, Yamakawa D, Kidoya H, Takakura N. Apelin as a marker for monitoring the tumor vessel normalization window during antiangiogenic therapy. *Cancer Sci.* 2016 Jan;107(1):36-44. doi:

10.1111/cas.12836. Epub 2015 Nov 12. Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A, Takakura N. APJ Regulates Parallel Alignment of Arteries and Veins in the Skin. *Dev Cell.* 2015 May 4;33(3):247-59. doi:

10.1016/j.devcel.2015.02.024. Epub 2015 Apr 23. PubMed PMID: 25920569.

[学会発表](計 6 件)

山川大史、腫瘍血管新生における Tie1 細胞外ドメイン切断の意義、第 2 回血管生物医学会若手研究会、2016 年 3 月 4 日-5 日、仙台

山川大史、木戸屋浩康、橋田未来、細島祥子、高倉伸幸、DNA 複製因子 PSF1 のプロモーター活性を指標とした増殖血管内皮細胞の分離、第 23 回日本血管生物医学会学術集会、2015 年 12 月 11 日、神戸

山川大史、木戸屋浩康、ジャイシン、橋田未来、高倉伸幸、Tie1 細胞外ドメインの脱落が腫瘍血管新生を制御する、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋

橋田未来、山川大史、木戸屋浩康、高倉伸幸、Tie1 陽性癌細胞の同定とその特徴、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月、横浜

Miku Kitta, Daishi Yamakawa, Hiroyasu Kidoya, Zhiyuan Gong, Nobuyuki Takakura. Role of Tie1 positive colon cancer cells in tumor growth. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜  
Daishi Yamakawa, Hiroyasu Kidoya, Weizhen Jia, Li Zhang, Miku Kitta, Nobuyuki Takakura. Analysis of interactions between Tie1 and Tie2 binding proteins using bimolecular fluorescence complementation. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014.4.14. Kyoto

[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

大阪大学微生物病研究所 情報伝達分野ホームページ

<http://st.biken.osaka-u.ac.jp>

大阪大学 研究者総覧

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=3220>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川 大史 (YAMAKAWA Daishi)

大阪大学微生物病研究所・特任研究員 (常勤)

研究者番号：20631097

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし