

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20874

研究課題名(和文) 抗血管新生因子バソヒビン-1による血管安定化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of vascular stabilization mechanism by anti-angiogenic factor vasohibin-1

研究代表者

小林 美穂 (Kobayashi, Miho)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50630539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内に新しく形成された腫瘍血管では内皮細胞同士の接着が不安定化しており、薬剤の不到達や癌細胞の浸潤及び血管新生の容易化を誘導することで癌治療に悪影響を及ぼすことが指摘されている。本研究により、バソヒビン-1(VASH1)が微小管の脱チロシン化増加を通して膜分子のエンドサイトーシスを阻害し、血管不安定化を抑制することで安定化を引き起こすという新規血管安定化機構を明らかにした。さらに、VASH1は同様な細胞内機構を通して血管新生を抑制することも見出していることから、VASH1を標的とした血管新生抑制と血管安定化誘導の両方を同時に発揮できる治療法の開発を目指すための基礎を築くことが出来た。

研究成果の概要(英文)： It is known that tumor vessels show vascular instabilization, which causes adverse effects on tumor therapy through the inaccessibility of drug, the invasion of cancer cells or the induction of easy angiogenesis. In this study, I revealed the novel vascular stabilization mechanism that vasohibin-1 (VASH1) inhibits vascular instabilization by inhibiting endocytosis of cell-cell adhesion molecules via detyrosination of microtubules. Furthermore, I have found that VASH1 provokes anti-angiogenic effects through the similar mechanism, which requires increase in detyrosinated tubulin.

From these findings, it was suggested that VASH1 becomes good target for the tumor therapy which can provoke the inhibition of both vascular instability and angiogenesis concurrently. And this study provides a basis for the potential therapeutic development using of VASH1.

研究分野：血管細胞生物学

キーワード：血管安定化 細胞間接着分子 微小管

1. 研究開始当初の背景

腫瘍に誘導された新生血管では内皮細胞同士の接着が不安定であることが知られており、現行の VEGF を標的とした抗血管新生療法が腫瘍血管の不安定化を促進させることも示唆されている(文献 1)。腫瘍血管の不安定化は薬剤の不到達や癌細胞の浸潤及び血管新生の容易化を誘導することで癌治療に悪影響を及ぼすため、癌治療を目指した血管安定化誘導法を開発する必要がある。血管の安定化にはアンジオポエチン-1(Ang1)/Tie2 シグナル伝達が重要な役割を果たしており、不安定化した血管では Ang1 の代わりに Ang2 が Tie2 に結合することで Tie2 及び Ang1/Tie2 複合体に含まれる膜分子群の細胞内取込みが誘導され、安定化シグナルが崩壊して血管の不安定化がもたらされる(文献 2)。腫瘍血管における Ang1/Tie2 の役割は VEGF シグナルと関連することにより相反する二面性を持つことが示唆されているため(文献 3, 4)、Ang/Tie を標的とした癌治療法の確立には未だ至っていない。一方、申請者の所属研究室で 2004 年に単離・同定されたバソヒビン-1(VASH1)は血管新生ネガティブフィードバック調節因子であると同時に血管の安定化を誘導することが示唆されている(文献 5)。VASH1 による血管の安定化においては Ang1/Tie2 活性化で観られる血管径の増大を伴わず、安定化をもたらす細胞内機構も不明瞭なままであることから、この機構の解明は VASH1 による血管を標的とした癌治療の開発において重要なポイントであり、癌治療の様々な問題点を克服できることが大きく期待される。申請者はこれまでに、VASH1 が血管内皮細胞内で微小管の脱チロシン化を強く誘導することを明らかにし、脱チロシン化型チューブリン(ΔY -チューブリン)の増加が VEGF 誘導性の VEGFR2 の細胞内取込み及び細胞内輸送を抑制する結果、VEGF シグナル伝達とそれに伴う細胞遊走及び血管新生が阻害されること、さらに再チロシン化酵素である

TTL と VASH1 との共発現により細胞内 ΔY -チューブリン量を標準値まで下げるとこれら VEGF シグナル伝達が復活することを見出した(図 1, 2 論文準備中)。図 3 に示すように、脱チロシン化は α -チューブリンの翻訳後修飾の 1 つであり、 ΔY -チューブリンはチューブリンチロシンリガーゼ(TTL)によって再チロシン化されることが分かっているが、 ΔY -チューブリン自体を直接誘導する分子は未だ同定されていない。さらに申請者のグループは、VASH1 の発現を抑制した内皮細胞において細胞間接着の維持に必須である ZO-1 の細胞間局在が崩壊していることを報告しており(文献 6)、他グループにより不安定化内皮細胞では VE-カドヘリンや ZO-1 を始めとした細胞間接着分子の細胞内取込みが活性化していることも報告されている(文献 7)。以上の経緯を踏まえ、VASH1 が誘導する ΔY -チューブリン増加を介した細胞内取込みの抑制と Ang/Tie シグナル伝達及び細胞間接着分子制御との関係を明らかにすることで VASH1 による血管安定化誘導機構を解明し、VASH1 を標的とした血管新生抑制と血管安定化誘導の両方を同時に発揮できる治療法の開発に貢献できると考え、本研究を着想するに至った。

<引用文献>

1) Jain. Science 307: 58-62, 2005、2) Eklund et. al., Exp. Cell Res. 319: 1271-1280, 2013、3) Hu et. al., Curr. Oncol. Rep. 11: 111-116, 2009、4) Rigamonti et. al., Cell Rep. 8: 696-706, 2014、5) Hosaka et. al., Am. J. Pathol. 175: 430-439, 2009、6) Ito et. al., PLoS One 8: e73931, 2013、7) Gavard et. al., Nat. Cell Biol. 8: 1223-1234, 2006

2. 研究の目的

本研究では VASH1 による ΔY -チューブリン増加を介した膜分子の細胞内取込み抑制機構に着目することで Ang/Tie 経路及び VEGF/VE-カドヘリン経路に対する VASH1 の役

割を調査し、VASH1 による血管安定化機構を明らかにすることを目的としている。さらに、腫瘍血管に対する VASH1 の効果を抗血管新生作用及び血管安定化作用の両方から着目し、新たな抗腫瘍療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、まず (1) VASH1 による ΔY -チューブリン増加が血管内皮細胞の安定化自体に影響するか、Tie2 及び細胞間接着分子の細胞内取込みに ΔY -チューブリン増加が影響するかを解析し、血管安定化と ΔY -チューブリン増加との関係性を明らかにする。(2) また血管安定化を制御する Ang1・Ang2 の細胞外放出に対する VASH1 の影響、及び VASH1 と Tie2 との結合活性をそれぞれ検討し、VASH1 による ΔY -チューブリン増加を介さない血管安定化制御の可能性も評価する。さらに (3) これまでに報告されている Ang1,2/Tie2 の下流で血管安定化制御に働くシグナル伝達経路に VASH1 が影響するかを検討し、(4) マウスを用いた *in vivo* 実験により生体内での VASH1 誘導性の血管安定化を詳細に解析することで、VASH1 による血管安定化誘導機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) VASH1 による膜分子の細胞内取込み抑制と血管安定化との関係

① 血管安定化における VASH1 誘導性 ΔY -チューブリン増加の必要性の検討

VASH1 や TTL の過剰発現により血管内皮細胞 (ECs) 内の ΔY -チューブリン量を人工的に操作し、血管の安定化に対する ΔY -チューブリンの影響を検討した。ZO-1 の細胞間局在化を安定化の指標とした共焦点レーザー顕微鏡観察から、TTL の過剰発現または VASH1 のノックダウンにより細胞内の ΔY -チューブリン量を減少させると、無刺激でも細胞間にギャップを生じた。また、VASH1 により ΔY -チューブリン量を増加させると、VEGF 及び

Ang2 刺激後の細胞間ギャップ形成がコントロール ECs よりも抑制された。したがって、VEGF や Ang2 で制御される血管安定化に VASH1 誘導性 ΔY -チューブリン増加が必要であると考えられた。

② VASH1 が VE-カドヘリン及び Tie2 の細胞内取込みに及ぼす影響の検討

細胞表面上タンパク質のビオチン化アッセイにより、VEGF または Ang2 刺激後に細胞内に取込まれた VE-カドヘリン量または Tie2 量を生化学的に検討した結果、VASH1 により ΔY -チューブリンを増加させると VEGF または Ang2 刺激による VE-カドヘリンまたは Tie2 の細胞内取込みが抑制された。次に、VEGF または Ang2 刺激前後の ECs において VE-カドヘリンまたは Tie2 を蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡観察によりそれぞれの局在を細胞生物学的に解析した。コントロール ECs において、無刺激時には VE-カドヘリン及び Tie2 はどちらも細胞間接着部位にライン状に局在していたが、VEGF または Ang2 刺激により、それぞれがベシクル状に細胞内に局在化し、それと共に細胞間にギャップを形成する様子が観察された。対照的に、VASH1 により ΔY -チューブリンを増加させると、コントロール ECs で見られた様な刺激依存的な VE-カドヘリン及び Tie2 の局在変化が抑制されており、細胞間ギャップ形成も抑制されていた。また、ビオチン化アッセイ及び顕微鏡観察の両方において、VASH1 と TTL を共発現することにより ΔY -チューブリン量を基礎レベルまで低下させると、VASH1- ΔY -チューブリン増加による VE-カドヘリン及び Tie2 の細胞内取込み阻害がキャンセルされ、ギャップ形成が復活した。したがって、VASH1 によって細胞内の ΔY -チューブリン量を操作することにより、血管の安定化を強制的に誘導することが出来ることを生化学的・細胞生物学的に明らかにした。

(2) VASH1 が Ang2/Tie2 の下流シグナル経路に及ぼす影響の検討

ECs において、血管不安定化が誘導される際に起こる Tie2 シグナル伝達活性化に及ぼす VASH1 の影響を検討した。コントロール ECs では Ang2 により Tie2 と Akt のリン酸化が誘導されたが、VASH1 を過剰発現させると Tie2 のリン酸化はコントロール ECs とほとんど差がなかったのに対して、Akt のリン酸化レベルは元々高く、Ang2 による変化はコントロール ECs よりも小さくなった。さらに、VASH1 と TTL の共発現により ΔY -チューブリン量を基礎レベルまで下げると、Akt リン酸化レベルの変化はコントロール ECs と同様に復活した。したがって、VASH1 は Ang2 刺激で起こる Akt の活性化を抑制し、その抑制機構は ΔY -チューブリンの増加を必要とすることが明らかになった。一方、VASH1 のノックダウンにより Ang2 刺激で起こる Akt の活性化が増大したことから、(1) -①での結果と合わせて考えると、VASH1 は Ang2 シグナル伝達を阻害することで血管の不安定化を抑制していると示唆された。

(3) VASH1 が VEGF/Src/VE-カドヘリンのシグナル経路に及ぼす影響の検討

VE-カドヘリンによる細胞間接着が崩壊する際には VEGF の下流で Src が活性化することが必要であることが知られているが (Kimura et. al., Cardiovasc. Res. 192: 149-158, 2011)、VASH1 の過剰発現は VEGF による Src のリン酸化レベルの変化を抑制した。この抑制は VASH1 と TTL の共発現により ΔY -チューブリン量を基礎レベルまで下げると解除され、コントロール ECs と同様に VEGF による Src のリン酸化上昇が復活した。したがって VASH1 は ΔY -チューブリン増加を介して VEGF-Src シグナル経路を阻害し、その下流で起こる VE-カドヘリンによる内皮細胞間接着が崩壊するのを抑制することで血管安

定化を誘導することが明らかとなった。

(4) VASH1 が ECs と血管平滑筋細胞 (SMCs) との相互作用に及ぼす影響の検討

安定化した血管は SMCs で被覆されており、血管の不安定化と共に SMCs が血管から離れることが知られている。ECs のスフェロイドを 3 次元培養して spouting を伸長させ、SMCs と共培養することにより ECs と SMCs との相互作用の様子を顕微鏡観察した。コントロール ESc スフェロイドでは sprouting した ECs やスフェロイド自体に SMCs が接着する様子がわずかに観察されたが、spouting を伸長させた後に VASH1 を過剰発現させた VASH1-ECs スフェロイドでは、SMCs の接着がコントロールよりも増加していた。一方、TTL 単独の過剰発現により細胞内の ΔY -チューブリン量を低下させた TTL- ECs スフェロイドでは ECs に接着した SMCs がコントロールに比べて減少していた。また、Ang2 または VEGF 刺激はコントロール ESc スフェロイドに対する SMCs 接着の減少を引き起こしたが、VASH1-ECs スフェロイドではこれら刺激による SMCs 接着の変化は見られなかった。したがって、ECs が発現する VASH1 は ECs と SMCs との接着を増加させ、血管不安定化刺激による ECs からの SMCs の剥離を抑制することが明らかとなった。

これらの結果から、VASH1 は ΔY -チューブリンの増加を通して Tie 及び VE-カドヘリンの細胞内取込みを抑制し、細胞間接着の崩壊を阻害していること、加えて VASH1 は Ang2 及び VEGF による血管不安定化シグナル伝達を抑制することで血管の安定化を更に誘導することが明らかになった。したがって、VASH1 が血管新生と血管不安定化の両方を同様の機構を通して抑制出来ることがわかり、腫瘍発展に対する治療の良好なターゲットと成り得ることが示唆された。

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 2 件)

- (1) Suwadee Phowichit, Miho Kobayashi, Yuriko Fujinoya, Yasufumi Sato, Kingkarn Sanphanya, Opa Vajragupta, Linda Chularojmontri and Suvara K. Wattanapitayakul. Antiangiogenic Effects of VH02, a Novel Urea Derivative: In Vitro and in Vivo Studies. *Molecules*, 査読有、21(9)、2016、e1258、e1258、DOI: 10.3390/molecules21091258、<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1258> 【国際共同研究】
- (2) Sachiko Horie, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kizaka-Kondoh, Tetsuya Kodama, Yasufumi Sato. Distinctive role of vasohibin-1A and its splicing variant vasohibin-1B in tumor angiogenesis. *Cancer Gene Therapy*, 査読有、23(5)、2016、pp. 133-141、DOI: 10.1038/cgt.2016.13、<http://www.nature.com/cgt/journal/v23/n5/full/cgt201613a.html>

[学会発表] (計 9 件)

<国際学会発表>

- (1) Miho Kobayashi, Yasuhiro Suzuki, Yasufumi Sato. The post-translational modification of microtubules mediates angiogenic signaling. The 2017 Japan-NIH joint Symposium, Feb. 2017、Seiry Auditorium, Seiry Campus, Tohoku University (宮城県・仙台市)
- (2) Miho Kobayashi, Yasuhiro Suzuki,

Yasufumi Sato. The post-translational modification of microtubules mediates receptor signaling. 56th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology (ASCB2016), Dec. 2016、Moscone Center (米国・サンフランシスコ)

<国内学会発表>

- (3) 小林美穂、VASH1 が誘発する微小管の翻訳後修飾とその役割. 第 12 回 Vasohibin 研究会、2017 年 2 月、ラフォーレ蔵王 (宮城県・蔵王町)
- (4) 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、微小管の翻訳後修飾による受容体シグナル伝達の制御. (Regulation of receptor signaling by MTs post-translational modification.) 第 39 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2016)、2016 年 12 月、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、【優秀ポスター賞 受賞】
- (5) 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、バソヒビン-1 による微小管の翻訳後修飾が内皮細胞に与える影響. 第 2 回血管生物若手研究会、2016 年 3 月、東北大学加齢医学研究所 (宮城県・仙台市)
- (6) 小林美穂、Vasohibin-1 による血管新生シグナル伝達阻害機構. 第 11 回 Vasohibin 研究会、2016 年 1 月、ラフォーレ蔵王 (宮城県・蔵王町)
- (7) 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、バソヒビン-1 による細胞内輸送阻害を介した VEGF 及び FGF2 シグナル伝達阻害. 第 23 回日本血管生物医学学会学術集会 (CVMW2015)、2015 年 12 月、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- (8) 小林美穂、鈴木康弘、佐藤靖史、バソヒビン-1 による VEGF 及び FGF2 シグナル伝達阻害と抗血管新生. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)、2015 年 12

月、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

- (9) 堀江佐知子、鈴木康弘、小林美穂、小玉哲也、佐藤靖史. Vasohibin-2 標的性 BAN 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた新規分子標的性肝がん治療. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 美穂 (Kobayashi, Miho)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号: 50630539

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし