

令和元年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09386

研究課題名(和文) バソヒビンによる血管新生と肝線維化抑制が誘導する肝癌制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of liver cancer after suppression of angiogenesis and hepatic fibrosis regulated by vasohibins expression levels

研究代表者

古谷 裕 (Furutani, Yutaka)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80392108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝線維化は血管新生と並行して起こることが知られており、バソヒビンは血管新生を調節する因子で、バソヒビンの発現量を調節することにより肝線維化を抑制できると考えた。バソヒビン-1,-2の発現細胞を同定するためにウサギポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体はHeLa細胞に高発現させたバソヒビン-1,-2蛋白質をそれぞれ特異的に検出できた。脳組織でバソヒビン-1,-2は高発現しており、抗体染色を行った結果、神経細胞に発現していた。肝臓では発現細胞を同定できなかった。バソヒビン-2欠損マウスを用いて胆管結紮による肝線維化モデルを作製し野生型マウスと比較したが、有意な差は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌により国内だけでも年間3万人が死亡し、100万人以上の患者がいる。これらの患者は一般的に肝線維化と肝硬変を経て肝癌へと進行していく、始めのステップである肝線維化を抑制することが重要となり、全世界的に肝線維化を抑制する薬剤の開発が進められている。肝線維化の分子機構を明らかにし、肝線維化の抑制から肝癌制御を目指すことは社会的に意義があり、迅速に取り組むべき研究課題である。また、バソヒビンはチューブリンの脱チロシン化を行うタンパク質であることが明らかとなり、細胞骨格と肝線維化・肝癌を結びつける重要なターゲット分子と考えられ特異的に認識するポリクローナル抗体の開発は学術的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis links hepatic fibrogenesis, and many reports show that angiogenesis concomitantly progresses with fibrogenesis. We assume that hepatic fibrosis could be suppressed by regulated expression levels of vasohibins, which mediates angiogenesis. To identify vasohibin-1,-2 expressing cells, we generated rabbit polyclonal antibodies against vasohibin-1, -2. Using these antibodies, transiently expressed vasohibin-1,-2 in HeLa cells were specifically detected. Vasohibin-1,-2 are highly expressed in the brain. Thus, we performed immunohistochemical staining of the brain tissues prepared from wild-type and vasohibin-1,-2-deficient mice. We identified that vasohibin-1,-2 were expressed from neurons. But, we could not detect vasohibin-1,-2-expressing cells in the liver. To show vasohibin-2 function in hepatic fibrosis, we performed bile duct ligation. We could not find significant difference in markers for hepatic fibrosis between vasohibin-2-deficient and wild-type mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：バソヒビン SVBP 肝線維化 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バソヒピン-1は2004年に東北大学佐藤教授らにより同定された VEGF により発現誘導されるタンパク質で、血管内皮細胞に発現し血管新生を抑制する作用が知られている (Watanabe et al. J Clin Invest, 2004)。バソヒピン 1 のファミリー分子としてホモロジー検索によりバソヒピン 2 が同定された。木村らは皮下の血管新生においてバソヒピン 1 と 2 が異なる局在を示し、それぞれのノックアウトマウスの解析によりバソヒピン 1 は血管新生を抑制したが、バソヒピン 2 はむしろ血管新生を促進することが示唆された (Kimura et al. Blood, 2009)。高橋らはバソヒピン 2 が卵巣癌で高発現し、血管新生を促進することにより癌を成長させていることを示し (Takahashi et al. Mol Cancer Res, 2012)、Xue らは肝癌でバソヒピン 2 の発現が誘導されると共に血管新生を促進していることを報告した (Xue et al. Oncogene, 2013)。

肝線維化は肝硬変から肝癌へと進行して行くため、肝線維化を抑制することが非常に重要となる。また、肝線維化に伴い血管新生が起こることが知られており、血管新生を制御することにより肝線維化を抑制できると考えられる (Thabut et al. J. Hepatology, 2010)。Coch らはバソヒピン 1 をアデノウイルスを用いて肝臓で過剰発現させると肝線維化を抑制すると報告した (Coch et al. Hepatology, 2014)。我々は血管新生抑制因子であるバソヒピン 1 欠損マウスを用いて胆管結紮による肝線維化モデルを作製し、バソヒピン 1 の発現を抑制することにより血管新生を促進させると肝線維化を促進できると考えて実験を行ったが、バソヒピン 1 の欠損に依存した肝線維化と血管新生促進効果は観られなかった (Furutani et al. BBRC, 2015)。従って、肝線維化はバソヒピン 1 の過剰発現により抑制が可能であることがわかり、発現抑制による効果は無いことが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

胆管結紮により肝線維化を誘導した際に、バソヒピン 1 とバソヒピン 2 mRNA の発現が上昇することを明らかにしている。しかし、バソヒピン 2 の肝線維化における働きは分かっていない。そこで、当申請課題ではバソヒピン 2 の肝線維化における働きを明らかにするために、バソヒピン 2 を過剰発現するトランスジェニックマウスと欠損したノックアウトマウスを用いて肝線維化モデルを作製し解析する。解析結果からバソヒピン 1 とバソヒピン 2 の発現またはそのシグナル伝達系で働く分子を調節することにより肝線維化、肝硬変、肝癌を抑制する方法の開発を目指す。

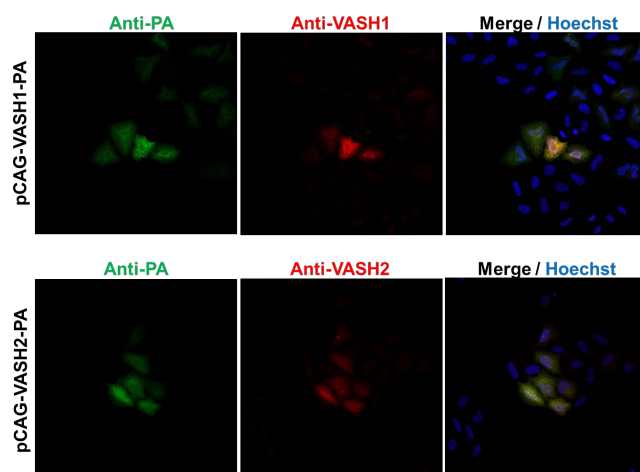
### 3. 研究の方法

#### (1) バソヒピン 1, 2 をそれぞれ特異的に認識するポリクローナル抗体の作製

バソヒピン 1, 2 を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を作製するために、配列を比較し相同性の低い部分から各 5 カ所のペプチドを選択し、これらのペプチドを抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製した。抗血清を採取し、ELISA により抗原としたペプチドを認識することを確認した。

#### (2) 抗体の特異性の確認

抗原ペプチドを用いて抗血清より抗体を精製した。バソヒピン 1, 2 をそれぞれ特異的に認識するか確認するために HeLa 細胞に PA タグを付けたバソヒピン 1 とバソヒピン 2 を発現し、抗体染色とウェスタンブロットを行った (図)。更に、バソヒピン 1, 2 が高発現する生後 3 日目の脳組織を野生型マウスとバソヒピン 1 または 2 欠損マウスより採取し、抗体染色とウェスタンブロットを行った。



図、HeLa 細胞に高発現させたバソヒピン (VASH)1-PA と VASH2-PA の抗体染色。

### (3)抗体染色によるバソヒビン 1, 2 発現細胞の同定

特異性の確認できた抗体を用いて、肝臓での発現細胞を同定するために抗体染色を行った。

### (4)バソヒビン 2 欠損マウスを用いた肝線維化モデルの解析

バソヒビン 2 欠損マウスと野生型マウスを用いて胆管結紮線維化モデルマウスを作製し、コラーゲン I mRNA の発現量の解析、肝組織切片のシリウスレッド染色による線維化領域の測定、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の抗体染色を行い肝線維化の進行度と血管新生を定量した。また、肝障害のマーカーである ALT を測定した。

### (5)バソヒビン 1, 2, SVBP を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製

バソヒビン 1, 2, SVBP を肝細胞特異的に発現させるため、アルブミンプロモーターとエンハンサー下で PA タグを付けたバソヒビン 1 または 2 と FLAG タグを付けた SVBP を発現するコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを作製した。

## 4. 研究成果

### (1)バソヒビン 1, 2 をそれぞれ特異的に認識するポリクローナル抗体の作製

平成 28 年度にバソヒビン 1, 2 よりそれぞれ 2 か所選択しペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。バソヒビン 1, 2 組換え蛋白質をウェスタンブロットで認識することをそれぞれ 1 か所に対するポリクローナル抗体で確認できた。しかし、これらの抗体はバソヒビン 1, 2 が高発現する脳と精巣の組織ライゼートを用いてウェスタンブロットを行うと、野生型とバソヒビン 1, 2 それぞれの欠損マウスでも検出できるバンドがあった。このため、これらの抗体はバソヒビン 1 または 2 以外の蛋白質も認識していることが明らかとなった。

平成 29 年度にバソヒビン 1, 2 よりそれぞれ 3 か所選択しペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。脳組織ライゼートを用いて確認したところ野生型では検出されるが、それぞれの欠損マウスでは検出されないバソヒビン 1, 2 に対応するバンドが確認できた。

### (2)抗体の特異性の確認

HeLa 細胞に PA タグを付けたバソヒビン 1 とバソヒビン 2 を発現し、抗体染色とウェスタンブロットを行ったところ、(1)で選択したポリクローナル抗体は特異的にバソヒビン 1 またはバソヒビン 2 を認識することを明らかにした。細胞の蛍光 2 重染色を行ったところ PA タグに対する抗体とバソヒビン 1, 2 に対するポリクローナル抗体で染色領域は一致していた。

### (3)抗体染色によるバソヒビン 1, 2 発現細胞の同定

これらのバソヒビン 1, 2 に対するポリクローナル抗体を用いて抗体染色を行った。バソヒビン 1, 2 が高発現している脳組織を用いて野生型とバソヒビン 1 または 2 欠損マウスとを比較し抗体染色を行った結果、脳の皮質、海馬、小脳などの領域で神経細胞にバソヒビン 1, 2 が発現していることを確認した。肝臓でも抗体染色を行ったが、野生型とバソヒビン 1 または 2 欠損マウスとを比較し差のある染色はなかった。

### (4)バソヒビン 2 欠損マウスを用いた肝線維化モデルの解析

バソヒビン 2 欠損マウスと野生型マウスを用いて胆管結紮線維化モデルマウスを作製し、線維化の進行度と血管新生を定量し比較した結果、コラーゲン I mRNA の発現量、シリウスレッド染色による線維化領域の面積に有意な差はなく、肝障害のマーカーである血中 ALT 量にも有意な差はなかった。

### (5)バソヒビン 1, 2, SVBP を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製

バソヒビン 1, 2, SVBP を肝細胞特異的に発現させるため、アルブミンプロモーターとエンハンサー下で PA タグを付けたバソヒビン 1 または 2 と FLAG タグを付けた SVBP を発現するコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを作製した。それぞれの発現を確認しトランスジェニックマウスのライン化を行った。

バソヒビン-1, -2 と SVBP は複合体を作ることによりチュープリンの脱チロシン化を行い重合の制御において重要な働きをすることが報告された (Aillaud et al. Science, 2017; Nieuwenhuis et al. Science, 2017)。チュープリンの形成は線維化の初期段階や上皮間葉転換などで重要な役割を果たしているため、肝線維化や肝癌の形成機構を調べる上でこれらのトランスジェニックマウスを用いてバソヒビンと SVBP 複合体の機能解析を行うことが重要である。今後、バソヒビンと SVBP 複合体を同時に発現するダブルトランスジェニックマウスを用いた解析により、肝線維化と肝癌におけるバソヒビンの働きを明らかにできると期待している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1)\*Y. Furutani, M. Toguchi, Y. Shiozaki-Sato, XY. Qin, E. Ebisui, S. Higuchi, M. Sudoh, H. Suzuki, N. Takahashi, K. Watashi, T. Wakita, H. Kakeya, S. Kojima. "An interferon-like small chemical compound CDM-3008 suppresses hepatitis B virus through induction of interferon-stimulated genes." **PLOS ONE** 14(6):e0216139 (2019) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0216139
- 2) N.Takahashi, K.Hayashi, Y.Nakagawa, Y.Furutani, M.Toguchi, Y,Shiozaki-Sato, M.Sudoh, S.Kojima, \*H.Kakeya "Development of an anti-hepatitis B virus (HBV) agent through the structure-activity relationship of the interferon-like small compound CDM-3008" **Bioorg Med Chem** 27(3):470-478 (2019) 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2018.11.039
- 3) M. Li, XY. Qin, Y. Furutani, I. Inoue, S. Sekihara, H. Kagechika, \*S. Kojima " Prevention of acute liver injury by suppressing plasma kallikrein-dependent activation of latent TGF- $\beta$ ." **Biochem Biophys Res Commun** 504(4):857-864 (2018) 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.026
- 4) X. Y. Qin, M. Hara, E. Arner, Y. Kawaguchi, I. Inoue, H. Tatsukawa, Y. Furutani, K. Nagatsuma, T. Matsuura, F. Wei, J. Kikuchi, H. Sone, C. Daub, H. Kawaji, T. Lassmann, M. Itoh, H. Suzuki, P. Carninci, Y. Hayashizaki; FANTOM consortium, N Kokudo, ARR Forrest, \*S. Kojima "Transcriptome Analysis Uncovers a Growth-Promoting Activity of Orosomucoid-1 on Hepatocytes" **EBioMedicine** 24: 257-266 (2017) 査読有  
DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.09.008
- 5) R. Norita, Y. Suzuki, Y. Furutani, K. Takahashi, Y. Yoshimatsu, K. A. Podyma-Inoue, T. Watabe, and \*Y. Sato "Vasohibin-2 is required for epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by modulating TGF- $\beta$  signaling" **Cancer Science** 108:419-426 (2017) 査読有  
DOI: 10.1111/cas.13157
- 6) R. Teraoka, M. Hara, K. Kikuta, Y. Hirooka, Y. Furutani, T. Shimosegawa, A. Masamune, \*S. Kojima "Plasma Kallikrein-dependent TGF- $\beta$  Activation in Patients With Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer" **Pancreas** 46: e20-e22 (2017) 査読有  
DOI: 10.1097/MPA.0000000000000736
- 7) Y. Furutani, M. Toguchi, R. Shrestha, \*S. Kojima "Phenosafuranin inhibits nuclear localization of transglutaminase 2 without affecting its transamidase activity" **Amino Acids** 49:483-488 (2017) 査読有  
DOI: 10.1007/s00726-016-2337-6
- 8) H. Tatsukawa#, Y. Furutani#, K. Hitomi, \*S. Kojima "Transglutaminase 2 plays opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death" **Cell Death & Disease** 2;7(6):e2244 (2016) #Equally contributed 査読有  
DOI: 10.1038/cddis.2016.150

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1)古谷 裕、戎井悦子、鈴木康弘、佐藤靖史、小嶋聡一、「肝線維化における VASH1 と VASH2 の機能解析」第 14 回 Vasohibin 研究会、2019 年
- 2)古谷 裕、井上育代、鈴木康弘、佐藤靖史、小嶋聡一、「肝線維化モデルマウスにおける VASH2 の機能解析」13 回 Vasohibin 研究会、2018 年
- 3)古谷 裕、井上育代、鈴木康弘、佐藤靖史、小嶋聡一、「肝線維化モデルマウスにおける VASH1 と VASH2 発現細胞の解析」第 12 回 Vasohibin 研究会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：抗 B 型肝炎ウイルス薬

発明者：掛谷秀昭、高橋伸明、林 恭平、小嶋聡一、古谷 裕

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/031825

出願年：2017

国内外の別： 外国

名称：抗 B 型肝炎ウイルス薬

発明者：掛谷秀昭、高橋伸明、林 恭平、小嶋聡一、古谷 裕

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：2016-173023

出願年：2016

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。