

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07812

研究課題名(和文)横紋筋肉腫における血管新生制御因子Vasohibin2の機能解析と新規治療法開発

研究課題名(英文)Analysis of the role of Vasohibi-2 in rhabdomyosarcoma and development of novel cancer therapy

研究代表者

鈴木 康弘 (SUZUKI, Yasuhiro)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教

研究者番号：60332277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋肉腫におけるVasohibin-2(VASH2)の役割について研究した。胞巣型横紋筋肉腫細胞株を用いて解析した結果、VASH2はがん細胞の細胞外マトリクスへの接着性・腫瘍形成能・がん免疫に関与することを新たに見出した。また、VASH2蛋白はsmall vasohibin binding protein (SVBP)との複合体形成により安定化し、ホスファチジルイノシトールへの結合性を有することを明らかにすると共に、新たな結合蛋白を複数単離・同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、VASH2が横紋筋肉腫の進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い軟部組織肉腫であり、中でも胞巣型の横紋筋肉腫は転移や再発頻度が高く予後不良とされる。VASH2は胞巣型で特に強い発現がみられることから、本研究による成果は、VASH2の横紋筋肉腫悪性化における作用機序の理解とVASH2を標的とした新規治療法をもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the role of Vasohibin-2 (VASH2) in rhabdomyosarcoma. Functional analysis of human alveolar rhabdomyosarcoma cells revealed that VASH2 was required for cell attachment to extracellular matrix, tumor formation ability, and tumor immunity. I then examined the properties of VASH2 protein and found that the interaction between VASH2 and small vasohibin binding protein (SVBP) enhanced the stability of VASH2 protein and provided the binding ability of VASH2-SVBP complex to phosphatidylinositol. I further isolated and identified novel proteins associated with VASH2 and/or SVBP.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Vasohibin SVBP 微小管翻訳後修飾 横紋筋肉腫 チューブリン脱チロシン化 がん免疫 がん微小環境 がん悪性化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属研究室では、世界に先駆けて新規の分泌性血管新生制御因子として Vasohibin (VASH) ファミリー (VASH1 と VASH2) とその分泌シャペロン small vasohibin binding protein (SVBP) を単離・同定し、がんをはじめとする様々な加齢疾患における機能やその治療応用に向けた基礎研究を行ってきた (図1)。VASH1 は VEGF や FGF-2 等の血管新生促進因子の刺激を受けた血管内皮細胞において産生・分泌されて内皮細胞自身の遊走・増殖を抑制して血管新生を抑制する作用とストレス耐性を亢進する働きがある。一方、VASH2 は VASH1 と高いアミノ酸相同性 (約 50%) を有するが、骨髄由来単核球やがん細胞に発現して VASH1 の作用とは反対に血管新生を促進することが確認されている。多くのがん種で VASH2 の高発現が確認され、VASH2 をノックダウンすることによって、血管新生・腫瘍成長・がん悪性化が顕著に抑制されること、VASH2 mRNA の 3' UTR は浸潤・転移に深く関わる miR-200 ファミリーの標的であることを報告した。また、家族性大腸腺腫症や胃がん発症のマウスモデルにおいて、腫瘍の発生と成長に伴い VASH2 の発現が亢進し、VASH2 ノックアウトマウスとの交配によって血管新生やがん関連線維芽細胞の進展などの腫瘍間質の活性化を抑制し腫瘍の発育を抑えることを明らかにした。VASH2 は血管新生を抑制するだけでなく、がん細胞の形質転換やがん関連線維芽細胞に対しても作用し、がん組織内の微小環境を調節することによってがん悪性化を制御していると考えられる (図1)。しかしながら、VASH2 がどのようなメカニズムを介して生理作用を発揮しているのかについては不明な点が多く、解明すべき課題となっている。

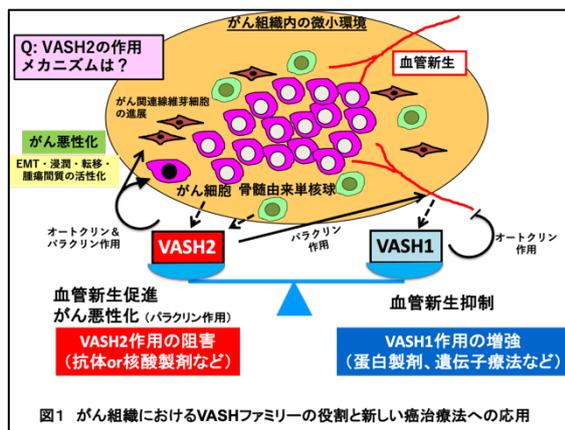


図1 がん組織におけるVASHファミリーの役割と新しい癌治療法への応用

横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い軟部組織肉腫であり、その中でも胞巣型は胎児型と比して転移や再発頻度が高く予後不良とされ、胎児型と比して有効な治療法がない。事前に行った実験の結果から、悪性度の高い胞巣型由来の細胞株において VASH2 が極めて高いレベルで発現することを確認しており、本研究において VASH2 に着目して横紋筋肉腫の悪性形質を詳細に解析することは、がん悪性化に関する新しい制御メカニズムの発見に繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

VASH2は種々のがん細胞に高発現し、腫瘍間質の活性化 (血管新生促進・癌関連線維芽細胞の進展)、癌細胞の浸潤・転移を亢進してがん悪性化に寄与する。VASHファミリーはSVBPと結合し細胞外に分泌されるが、生理作用を発揮する分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、VASH2を高発現する横紋筋肉腫細胞株を用いて、細胞機能の制御における役割を解析する。同時にVASH2及びSVBPと結合する蛋白や生体分子を新たに同定し、VASH2による横紋筋肉腫の悪性化の分子メカニズムを明らかにし、新規治療法の開発に向けた基礎研究を行うことを目的とする。

尚、本研究の申請期間中に他のグループから、VASHファミリーが α -チューブリン脱チロシン化酵素として微小管翻訳後修飾を制御することが報告されたことから、当初の計画に加えて α -チューブリンの脱チロシン化反応についても解析を加えた。

3. 研究の方法

(1) 横紋筋肉腫の悪性化におけるVASH2の機能解析

VASH2をノックアウト或はノックダウンしたヒト横紋筋肉腫細胞株RH30細胞を作製し、コラーゲンへの細胞接着能・スフェロイド (細胞凝集塊) 形成能・薬剤感受性に対する影響を調べる。マイクロアレイ解析或いはRNA-seq解析を行い、VASH2発現の有無により発現量が変動する遺伝子を網羅的に探索し生理的な役割を解析する。VASH2をノックアウト或はノックダウンしたヒト横紋筋肉腫細胞株をヌードまたはSCIDマウスの皮下移植し腫瘍形成能を比較し、腫瘍組織標本を作製して細胞増殖や腫瘍間質の変化を免疫染色にて解析する。

(2) 横紋筋肉腫におけるVASH2及びSVBPに結合する蛋白の同定とその機能解析

バキュロウイルス発現系で精製したVASH2-SVBP複合体をbait (餌) にしてGST-Pull down法にて横紋筋肉腫細胞の細胞抽出液中から結合蛋白を分取し、SDS-PAGEによる分離後に銀染色を行い、各バンドに含まれる蛋白を質量分析にて同定する。がん悪性化に関わると予想される結合蛋白に対しては、免疫沈降法やFar Westren Blot法によりVASH2やSVBPへの結合の有無を確かめる。また、VASH2のN末端側にPhox homologyドメインに類似した配列を有することから、バキュ

ロウイルス発現系で精製したVASH2-SVBP複合体とリン脂質の結合を確かめる。

(3) 中和抗体・ドミナントネガティブ変異体・阻害ペプチド・アンチセンスオリゴ・siRNAによる横紋筋肉腫の悪性化に対する抑制効果の検証

(2) において結合が確認された蛋白については、VASH2又はSVBPとの結合に必要なドメインを同定し、アミノ酸置換により結合に必須のアミノ酸を同定する。機能的に重要であると評価できた結合蛋白については、結合部位の阻害ペプチドやドミナントネガティブ変異体を作製し、阻害効果の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) 横紋筋肉腫の悪性化における VASH2 の機能解析

VASH2 の高発現する胞巣型横紋筋肉腫細胞 RH30 (親株) とその VASH2 欠損細胞株 (VASH2KO) を用いて、in vitro 及び in vivo の実験系で互いの性質の違いを比較検討した。VASH2KO は親株と比して、チューブリン脱チロシン化レベルが顕著に低下しており、細胞外マトリクスへの接着性が低下していた。同様の結果は、脱チロシン化阻害剤である Parthenolide を親株に処理した場合でも確認された (図 2A)。通常の二次元培養における細胞増殖能には両者に明確な差が認められなかったが、VASH2KO では三次元培養におけるスフェロイド (細胞凝集塊) 形成能が減弱する傾向が確認された (図 2B)。in vivo の評価のためヌードマウスへの皮下移植実験を行ったところ、VASH2KO は親株と比して腫瘍の発育が有意に抑制された (図 3)。親株由来の腫瘍組織では、TUNEL 染色陽性のアポトーシス領域が広範囲に確認され、腫瘍内に多くの血管が確認されるものの血管周囲はピモニダゾール陽性の低酸素状態だった。一方、VASH2KO の腫瘍組織は、親株と比してアポトーシス領域が顕著に減少しており、腫瘍内の血管周囲の低酸素状態が改善されていることが確認された (図 3)。

また、がん免疫への影響を解析するために、インターフェロン γ 刺激による PD-L1 の発現誘導性の違いをウェスタンブロットにて解析した結果、親株ではインターフェロン γ 刺激に反応して STAT1 のリン酸化と PD-L1 の発現が誘導されたが、VASH2 欠損株では STAT1 のリン酸化は誘導されるものの PD-L1 の発現誘導が親株と比して減弱化することを新たに見出した (図 4)。siRNA により VASH2 の発現をノックダウンした状況に反応して発現量に変化する遺伝子を次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行ったところ、サイトカインのシグナル伝達制御、リボヌクレオタンパク質、免疫応答に関わる因子群の変動が検出された。しかしながら、どの因子が重要なターゲットになっているのかについては不明で、現在解析中である。

(2) 横紋筋肉腫における VASH2 及び SVBP に結合する蛋白の同定とその機能解析

VASH2-SVBP 複合体蛋白と RH30 細胞の抽出液を用いて、アフィニティー精製により結合蛋白を探索したところ、チューブリンをはじめとする細胞骨格関連因子・核内因子・キナーゼ等を同定した (図 5)。同定した細胞骨格関連因子のクローニングを行い、VASH2-SVBP 複合体との結合を生化学的手法で確認したが、直接的な結合は確認されなかった。また、精製蛋白を用いた実験においては、VASH2 は SVBP と複合体を形成することによって、リン脂質結合性に変化が生じることを確認した (図 6)。

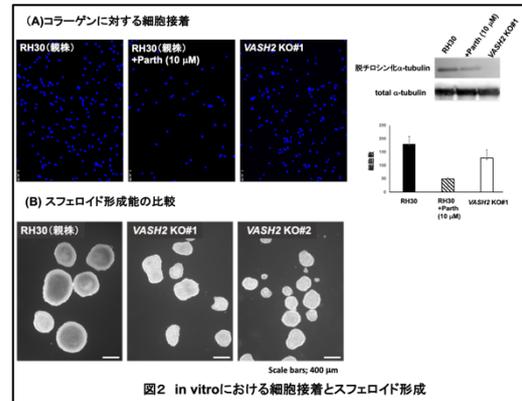


図2 in vitroにおける細胞接着とスフェロイド形成

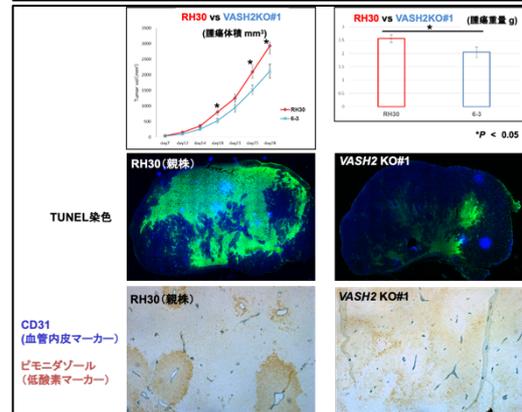


図3 in vivoにおける腫瘍形成と微小環境の比較

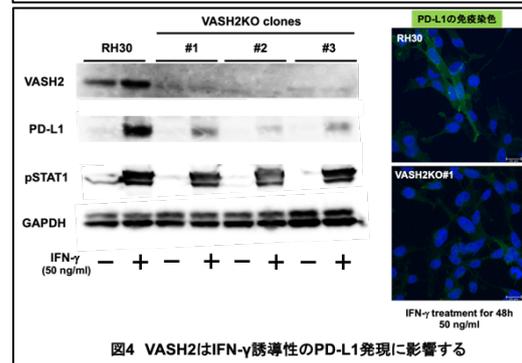


図4 VASH2はIFN- γ 誘導性のPD-L1発現に影響する

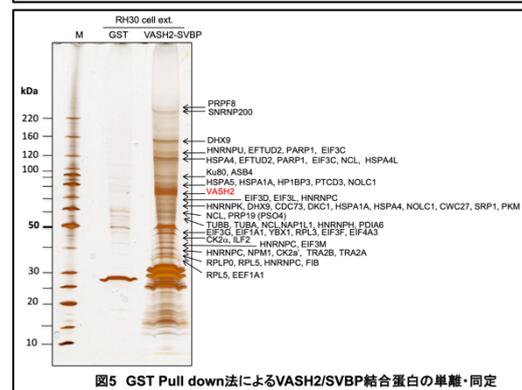


図5 GST Pull down法によるVASH2/SVBP結合蛋白の単離・同定

(3) 中和抗体・ドミナントネガティブ変異体・阻害ペプチド・アンチセンスオリゴ・siRNA による横紋筋肉腫の悪性化に対する抑制効果の検証
 VASH2 は細胞内で SVBP と複合体を形成して脱チロシン化酵素として機能するが、siRNA により SVBP をノックダウンして両者の結合を阻害すると、VASH2 の mRNA 発現レベルに変化はないが、VASH2 蛋白が不安定化し α チューブリンの脱チロシン化レベルが顕著に抑制されることを新たに確認した (図7)。一方、研究期間中に有効な合成阻害ペプチドやドミナントネガティブ変異体の作製には至らなかった。

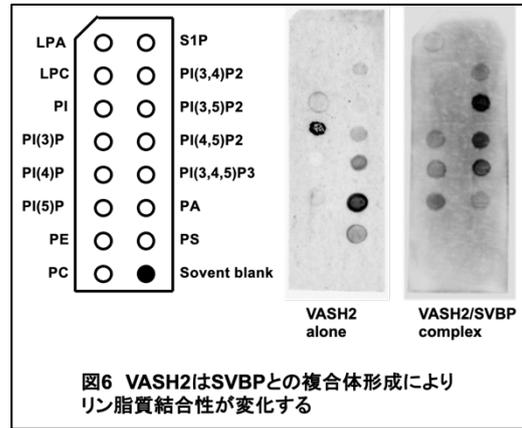


図6 VASH2はSVBPとの複合体形成によりリン脂質結合性が変化する

以上の結果は、横紋筋肉腫の悪性化における VASH2 の作用メカニズムを理解するために重要な成果であり、新規癌治療法への応用にも期待できる。そのためにも、今後のがん細胞における α -チューブリン脱チロシン化の意義と VASH2 の作用メカニズムとそのシグナルネットワークの解析をさらに進めていく必要がある。

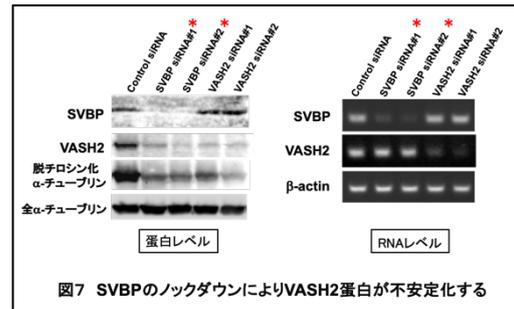


図7 SVBPのノックダウンによりVASH2蛋白が不安定化する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 康弘
2. 発表標題 Vasohibin-SVBP相互作用とチューブリン翻訳後修飾を介した細胞機能の解析
3. 学会等名 第14回Vasohibin研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 康弘
2. 発表標題 vasohibin研究の背景と動向
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 康弘
2. 発表標題 Vasohibin研究の動向と新規がん治療法の基礎解析
3. 学会等名 第15回Vasohibin研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 加齢医学研究所 腫瘍循環研究分野ホームページ
http://www.idac.tohoku.ac.jp/site_ja/admission-courses/overcoming-intractable-cancers/dept-vascular-biology/
東北大学 未来科学技術共同研究センター 難治がんに対する革新的治療法の開発
https://www.niche.tohoku.ac.jp/wp-content/uploads/2020/07/SatoPJ_2020.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------