

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590327
 研究課題名（和文） Int6-siRNA による正常血管誘導の解析と臨床応用
 研究課題名（英文） Analysis and clinical application of normal blood vessel inducement by Int6-siRNA
 研究代表者
 陳 リー（CHEN LI）
 財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・ 研究員
 研究者番号 30425681

研究成果の概要：酵母の Two Hybrid 系を用いて、低酸素反応因子 HIF2 α /EPAS1 に関して新規結合因子 Int6/eIF3e を同定し、解析の中で、Int6 は HIF2 α に特異的に結合し、HIF1 α とは異なった蛋白分解機序であることを判明した。また、Int6 に特異的な siRNA は HIF2 α の発現を安定化した為、各種増殖因子、血管新生因子の分泌されたことから、Int6siRNA をマウスの皮下に発現させたところに、非常に顕著な正常な動脈、静脈を誘導されたことが認められた。このことから、Int6 は HIF2 α を介した血管新生のマスタースイッチの一つであることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 病態医化学

キーワード：血管新生、siRNA、低酸素反応因子、癌抑制因子、虚血 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 低酸素ストレス応答に関与する遺伝子の中に転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor; 低酸素反応性因子) が報告されている。この因子は、腫瘍の血管新生に必須である VEGF (血管内皮細胞増殖因子) を作り出し、さらには、ミトコンドリアでのエネルギー代謝に関わる多くの解糖系酵素の転写制御を行うことが知られている。固形腫瘍 (例えば癌) では、血流が豊富にあるにも関わらず、腫瘍内部ではかなり低酸素状態となっており、この状態が更に血管新生を促す結果となっている。血管新生のほかにも、HIF は細胞内においてさまざまな役割を担っており、例えば低酸素時の赤血球増殖にはエリスロポエチン遺伝子の発現亢進が必要であり、血管

新生には VEGF 遺伝子の発現増加が重要であるうえ、HIF の転写活性の上昇との関係が認められている。

(2) HIF 自体は HIF1 α 、HIF2 α 、HIF3 α の3種に大きく分かれ、HIF1 α のユビキタスに発現するのと異なり、HIF2 α は血管内皮、脳のグリア、線維芽細胞、骨格筋や心筋に、HIF3 α は脳神経系に特異的に発現する。HIF1 α は脳梗塞あるいは心筋梗塞等の虚血疾患に関連することが明らかとなっている。一方、HIF2 α は、低酸素ストレスが関連する疾患の中でも癌の血管新生、またはマウスの胚細胞の正常な血管形成に両方とも関与すると報告されている。またそのメカニズムとしては：HIF1 α は、通常の酸素濃度(21%)ではユビキチン・プロテアソームによって分解され

ているが、低酸素状態ではこの分解から免れて核内に移行することにより転写因子としてさまざまな因子の誘導を惹起することが明らかにされたに対し、HIF2 α に関しては結合する因子が幾つか報告されているものの、その機能を制御する因子に関しては全く明らかにされていない。

(3) 従って、HIF2 α は血管新生に深く関与することから、その細胞内挙動を制御することにより、新たな血管新生の誘導が可能となることが予想されたため、このHIF2 α に関して新たな制御因子の解析を行った。

(4) 酵母 Two Hybrid 法を用いて、ヒトの心筋ライブラリーから、HIF2 α と相互作用を示す因子として新たに6因子の同定に成功した。この中で Int6 はマウス及びヒトにて乳がんの癌抑制因子として報告されてきたが、作用機序は全く不明のままであった。しかしながら、これまでの検討より、HIF との関連が血管新生や癌化に強く関連する可能性があると判断し、Int6 に関して解析を進める必要があった。

(5) これまで培養細胞での初歩的な検討の結果では、MMTV で変異した際に作られる C 末端の欠損した Int6 恒常不活化型 (dominant negative) 変異体は、Int6 野生型とは正反対に、HIF2 α の発現と転写活性を上昇させた。一方、Int6 野生型は HIF2 α を強く分解する機能があった。HIF2 α の制御は主として Int6 により行われていると考えられた。また、その制御は HIF1 α で報告されている pVHL、proline hydroxylase を介した分解系との同異点について解析しなければならぬと示唆されていた。

2. 研究の目的

新たな制御因子 (Int6) が HIF2 α の長期間にわたる活性上昇による細胞増殖、血管新生を誘導し、癌化に至るといった新たな癌化の機序を明らかにするものと目的にした。

具体的には、

(1) Int6 を介する HIF2 α の分解機序の解明 (pVHL, proline hydroxylase を介さない新たな機序)

(2) 乳がんにおける Int6 の役割解明
動物モデルを用いて、Int6-siRNA による正常動脈新生の機序と作用因子の同定、および治療薬や細胞移植療法としての開発に焦点を当て、本研究を推進する。

3. 研究の方法

酵母 Two Hybrid 系、細胞レベルの分子生物学、生化学の手法。そして、動物モデル、病理学的観察、解析方法を用いて、

(1) Int6 の HIF2 α 分解に関する基礎的な解析

Int6 および HIF2 α の各変異体作製を行っ

ており、この変異体を用いてそれぞれの結合サイトを詳細に検討するとともに、その結合に関わる調節機序を解析する。Int6 は C- 末端に PINT ドメインと呼ばれる signalosome 結合ドメインを持っている。この結合ドメインは、プロテアゾームの Lid の部分に結合することが報告されており、Int6 はこの結合を介してユビキチン・プロテアゾーム系と密接に関わっていることが予想される。そのため、Int6 による HIF2 α のユビキチン化や分解の機序を In vitro にて解析する。

(2) Int6-siRNA によって誘導される血管新生因子群の DNA アレイによる同定。

Int6-siRNA は内因性の Int6 を効率的に Knockdown し、この際内因性の HIF2 α の発現安定化に続き、HIF2 α により誘導される血管新生因子群が正常動脈の新生に関与していることが予想される。ただ、HIF2 α のみの過剰発現系では Int6-siRNA よりも 20% 程度の効果しかなく、HIF2 α 以外の機序も考えられる。このため、線維芽細胞を用いて、siRNA により誘導される因子群を DNA アレイを用いて解析する。

(3) Int6-siRNA 導入による血管新生誘導の検討

これまで、HGF や VEGF、bFGF などの血管新生因子による血管新生の報告があるが、持続的な投与が必要であり、頻回になりすぎると血中への漏れが起き、副作用の問題も指摘されている。このような問題に対して、int6-siRNA の導入では、局所の細胞から血管新生因子群が継続的に分泌され、正常血管が新生されることが判明している。この結果から、ラットやマウスの下肢閉塞モデルや心筋梗塞モデル、脳卒中モデルなど、血管の閉塞モデルを用いてさらに詳細に検討する。

さらに Int6-siRNA 導入した線維芽細胞は、細胞自身が産生する血管新生因子群が持続的に誘導され、この線維芽細胞を局所に導入することにより、これまででない効率的な正常動脈血管誘導が可能と予想される。いわば Int6-siRNA 処理線維芽細胞の自家移植による効果的な血管バイパス療法が可能になる。

本研究では臨床応用に向けた基礎的な評価を行う。

4. 研究成果

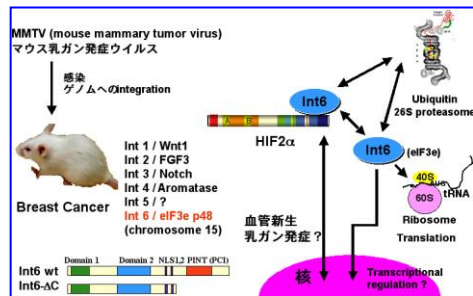
本研究では、Int6 の新たな標的として、癌化や血管新生と直接結びつく HIF2 α がその標的として同定された。これは世界でも初めてであり、さらに大きな発見は Int6 の siRNA による著明な正常動脈新生を惹起することであり、これまで不明であった動脈新生の機序が明らかになるとともに、siRNA を用いた血管新生により、閉塞性動脈疾患、脳梗塞、心筋梗塞などの疾患の治療に応用が可能となる。この方法が確立されると、新たな siRNA

薬の開発につながり、今後の新薬開発にも大きな影響を与えると確信している。

具体的には

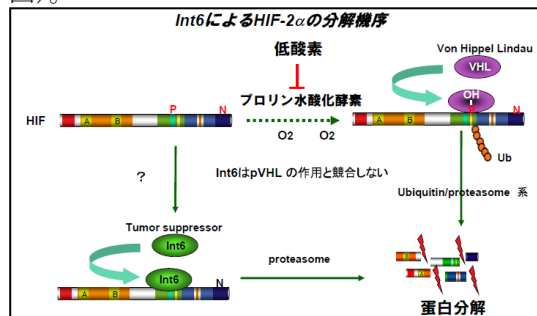
- (1) HIF2 α の新規結合因子 Int6/eIF3e を同定した。

酵母 Two Hybrid System 方法を用いて、HIF2 α の 571-582aa を餌として、Human heart cDNA library から Int6/eIF3e を同定した。



- (2) Int6 が HIF2 α の蛋白を分解する機序は非低酸素依存、非 VHL 依存である。

これまで培養細胞での詳細な検討の結果では、MMTV で変異した際に作られる C 末端の欠損した恒常不活化型 (dominant negative) 変異体は、野生型とは正反対に、HIF2 α の発現と転写活性を約 2 倍に上昇させた。一方、Int6 野生型は HIF2 α の発現と転写活性を 70% 以上抑制した。その分解作用は Von Hippel Lindau 遺伝子産物でユビキチンリガーゼである pVHL の非発現細胞 (786-0) にて認められたため、HIF2 α の Int6 による分解機序は：HIF1 α で報告されている pVHL、proline hydroxylase を介した分解系とは異なる (下図)。



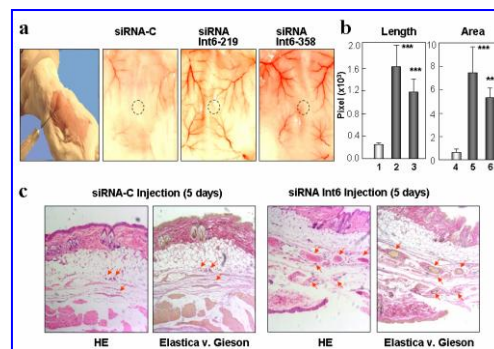
- (3) Int6 のプロモータの活性化は HIF2 α に依存することを判明した。

Int6-siRNA は内因性の Int6 を効率的に Knockdown し、この際内因性の HIF2 α の発現安定化に続き、HIF2 α により誘導される血管新生因子群が正常な静、動脈の新生に関与していることが判明された。ただ、HIF2 α のみの過剰発現系では Int6-siRNA よりも 20% 程度の効果しかなかったことから、In vitro または In vivo の解析により：過剰発現した HIF2 α は、HIF2 α のプロモーターの活性を上昇したと同時に、Int6 のプロモーターの活性も上昇させたため、Int6 が強く発現されに

り HIF2 α の過剰発現を分解し、予想した HIF2 α 過剰発現が減少され、HIF2 α により誘導される血管新生因子群が少なくなると考えられる。

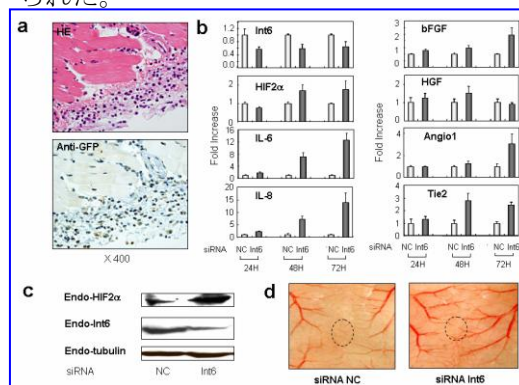
- (4) 動物モデルを用いて、Int6-siRNA 導入による血管新生誘導の検討

Int6 による血管新生の抑制作用について in vivo 解析を進めるために、Int6-siRNA の発現ベクターをマウスの皮下に GenomOne (HVJ-エンベロープ遺伝子導入試薬) を用い



て導入した。導入後 5 日には、血管面積、長さとも 7-10 倍の有為な増加を示す血管新生効果が認められた。これらの結果は導入したベクターの量に比例し、siRNA の効果依存性が明確に観察された。

更に、病理学的解析では、新生された血管は、内皮、弾力繊維を持つ正常な動静脈であり、腫瘍性血管新生で見られるような出血斑は皆無であった (上図)。また、Int6-siRNA は主として血管内皮の線維芽細胞に導入され、この線維芽細胞から血管新生因子群が分泌されていることが示唆された (下図)。さらに、マウスの線維芽細胞を ex vivo にて siRNA 発現ベクターを導入し、別のマウスの皮下に移植したところ、同様に強い血管新生が認められた。



上記の結果から、Int6 は HIF2 α を介する正常血管新生のマスタースイッチの一つであり、血管新生因子群の発現を抑制し、血管形成を調節している作用があると考えられた。

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4件)

- ① Futoshi Shibasaki, Li Chen, Kazuyo Uchida, Alexander Endler; Int6 as a novel regulator of normal vessel formation through hypoxia inducible factor 2 alpha. Exp. Mol. Med. 2009 in press
- ② 森實芳仁、石川雄一郎、Li Chen、内田和代、芝崎太 最新イムノPCR法: MUSTag法を用いた極微量タンパク質の同時多項目測定 実験医学26(11) 802-810, 2008.
- ③ 芝崎太、森實芳仁、石川雄一郎、槇坂典子、小俣結子、陳リー、内田和代 超高感度多項目解析(MUSTag)法による臨床診断への応用 臨床病理 56(9) 1759-1765, 2008
- ④ Chen L, Uchida K, Endler A, Shibasaki F. Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets HIF-2alpha to degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. J Biol Chem. 282(17):12707-16, 2007

[学会発表] (計8件)

- ① Li Chen、内田和代、Alexander Endler、芝崎太 siRNA-Int6による低酸素反応性(HIF2 α)の活性調節と正常血管との関係 第81回日本生化学会大会 第31回日本生化学会大会 2008.12.9-12 神戸ポートアイランド
- ② Li Chen, Masakazu Toi, Futoshi Shibasaki eIF3e/int6 Specifically Degrade HIF-2a By Hypoxia- And pVHL-Independent Regulation 第67回日本癌学会学術総会 2008.10.28-30 Nagoya Congress center
- ③ 陳リー、内田和代、Alexander Endler、芝崎太 Int6のノックダウンによる低酸素反応性因子(HIF2 α)の活性調節と正常血管創生 第6回 Cell Biology Summer Meeting 2008, 7.5-6 千葉・鴨川
- ④ Li Chen, Kazuyo Uchida, Alexander Endler, Shin-ichiro Horiguchi, Yosuke Suzuki and Futoshi Shibasaki: "Int6 Triggers Normal Angiogenesis in Mouse Skin Directly by Hypoxia-Independent Stabilisation of HIF-2a" 第66回. 日本癌学会学術総会 2007.10.3-5
- ⑤ 陳リー 内田和代、Alexander Endler、飯島修、芝崎太 Int6 Specifically Targets HIF-2a to Degradation By Hypoxia- And pVHL-Independent Regulation.. 第6回 Cell Biology

Summer Meeting 2007 2007.7.27-29

- ⑥ 陳リー 内田和代、飯島修、森實芳仁、芝崎太 “低酸素因子 HIF2a に関わる Int6 の Negative Feedback 制御” 第5回 がんとハイポキシア研究会 2007.12.1
- ⑦ 陳リー 内田和代、Alexander Endler、飯島修、芝崎太: 新規結合因子 Int6/eIF3e による HIF2a の低酸素非依存的な制御、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007.12.14 神奈川・横浜
- ⑧ Li Chen, Kazuyo Uchida, Alexander Endler, Osamu Iijima and Futoshi Shibasaki Int6; New Target for Angiogenesis(1) eIF3e/int6 Specifically Targets HIF-2a for Degradation By Hypoxia- And pVHL-Independent Regulation. 4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Science 2007 the Keystone Conference Center, Keystone, Colorado, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 細胞死を予防するための医薬剤
発明者: 芝崎太、陳リー
権利者: 財団法人 東京都医学研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2009-70529
出願年月日: 平成 21 年 3 月 23 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陳リー (CHEN LI)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号: 30425681

(2) 研究分担者

芝崎太 (SHIBASAKI FUTOSHI)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員
研究者番号: 90300954

戸井 雅和 (TOI MASAKAZU)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号: 10207516

(3) 連携研究者