

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07389

研究課題名（和文）Tetraspanin18によるVEGF受容体の膜輸送調節機構と生体における意義

研究課題名（英文）Role of Tspan18 in the intracellular trafficking of VEGF receptor

研究代表者

田井 育江 (Tai, Ikue)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90749508

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）：4回膜貫通タンパク質Tspan18が血管の正常発生および腫瘍血管形成に寄与する機構として、VEGFR2 shedding断片への作用を解析した。VEGFR2断片の核局在は検出されなかったが、HUVECへの過剰発現およびノックダウンにより、Tspan18はshedding断片量および全長VEGFR2のリン酸化を正に制御することが示された。

Tspan18欠損マウスの網膜、肺、腸間膜の血管内皮細胞のVEGFR2およびその断片を野生型マウスと比較したところ、全長VEGFR2のリン酸化は減弱したが、各断片の量には変化がなかった。さらに血管とリンパ管の分化、形成に重要な新規遺伝子を同定し、解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

より効果的で副作用の少ない、抗腫瘍血管新生療法の新たな分子標的を探索するため、VEGFシグナルの詳細を基礎研究により徹底的に見直そうという機運が世界的に高まっている。その中で、Tetraspaninというまだ知見の乏しいタンパク質によるVEGF受容体のtruncationという切り口はユニークと言える。特に、ノックアウトマウスの解析からTspan18のin vivoでの重要性は既に示されていることから、上記のVEGFシグナルの詳細の解明、次世代の抗腫瘍血管新生療法の開拓へ本研究が寄与するところは大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We are analyzing effects of Tspan18, a membrane protein with four transmembrane regions, on shedding of VEGFR2, as a mechanism by which Tspan18 contributes to normal retinal vascular development and development of tumor blood vessels. Though nuclear localization of VEGFR2 fragments was not detected, we have shown that Tspan18 increases the amount of VEGFR2 fragments and phosphorylation of full length VEGFR2 by overexpression and knockdown experiments using HUVECs. The amount of VEGFR2 fragments were normal in the postnatal retina, lung and mesentery endothelial cells of endothelial-cell-specific Tspan18 KO mice, but phosphorylation of full-length VEGFR2 was suppressed in those mice. We additionally identified a novel gene important for development of blood vessels and lymphatic vessels, and developed and analyzed its knockout mice.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 血管形成 リンパ管新生 tetraspanin Tspan18

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管は全身の恒常性維持に必須の組織であり、その異常は糖尿病と癌を含む種々の疾患に関わる。血管形成を制御する最も重要なシグナルは血管内皮成長因子 (VEGF) であり、そのメイン受容体である 2 型 VEGF 受容体 (VEGFR2) は、顕著な細胞内の膜輸送やタンパク質分解を受けているが、それが受容体のシグナルに与える影響については知見が乏しい。こうした背景で我々は、タンパク質の膜輸送を制御する tetraspanin のひとつである Tspan18 が正常な血管形成に必須の因子であること、また、Tspan18 は VEGFR2 の切断断片と結合するというのをこれまでに見出してきた。そこで、「VEGFR2 のタンパク質分解および膜輸送は、血管形成にどのような影響を与えるか？」を本研究の問いとして設定し、Tspan18 が血管形成に重要であることの意味として、VEGFR2 の挙動に着目して解析を進め、その分子機序の解明を目指した。

2. 研究の目的

我々は、血管が正常な形態および機能を持つことに関わる分子の探索、ノックアウトマウスを用いた表現型の解析、分子機序の解明を通じて、正常血管形成の理解を進めてきた。その1つとして同定された Tspan18 について、Tspan18 欠損マウスでは動脈形成不全を伴う血管形成の抑制が起こり、腫瘍血管の退縮 (正常化) 糖尿病網膜症モデルにおいて病的血管新生の抑制が起こることを見出してきた。この機序として、Tspan18 は VEGFR2 の shedding 後の切断断片と特異的に結合しており、何らかの仕組みによって VEGF シグナルの減弱に寄与することが推定された。血管形成の場で最も重要なシグナルである VEGF-VEGFR2 シグナルの減弱に関わる血管新生抑制機構の知見は、血管網の異常を伴う疾患に関する理解を深め、血管形成の異常を伴う疾患の分類と診断、ひいては治療標的の提案につながる可能性がある。

そこで、shedding によって生じる断片による転写制御、Tspan18 による shedding 調節の可能性、Tspan18 欠損マウス組織における VEGFR2 shedding の変化等について検証を進めた。

3. 研究の方法

一部の膜タンパク質では、shedding 断片およびそれがさらに分解された細胞内ドメイン断片が核に移行し、転写制御活性を示す例が知られている。そこでまず、VEGFR2 の各断片の細胞内局在を理解する目的で、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、定常時および VEGF 刺激時に細胞を回収して生化学的分画を行い、ウエスタンブロットにより各断片の分布を解析した。

Tspan18 が VEGFR2 の shedding を調節する可能性については、HUVEC で Tspan18 を過剰発現あるいは siRNA ノックダウンし、ウエスタンブロットにより断片量およびリン酸化の程度を評価した。

マウス個体での VEGFR2 shedding における Tspan18 の役割については、血管特異的 Tspan18 ノックアウトマウスを用い、生後 3-6 日において網膜、肺、腸間膜を回収してウエスタンブロットにより断片量およびリン酸化の程度を評価した。

4. 研究成果

HUVEC を核分画して VEGFR2 の shedding 断片の局在を調べた結果、75kDa、130kDa 断片、および細胞内ドメイン断片と思われるサイズのバンドのいずれも核画分からは検出されなかった。

また、HUVEC において Tspan18 を過剰発現あるいはノックダウンしたところ、Tspan18 の量と VEGFR2 断片(130kDa および 75kDa)の量が正に相関する結果が得られた。また、このとき、断片ではなく全長の VEGFR2 についてのみ、Tspan18 の過剰発現によりリン酸化が増強していた。ここから、Tspan18 が shedding を促進する、あるいは shedding 産物のさらなる分解を抑制すること、また、何らかの機序で全長 VEGFR2 のリン酸化を亢進させることが示された。

血管特異的 Tspan18 欠損マウスから網膜、肺、腸間膜(生後 3~6 日)の血管を回収して VEGFR2 の shedding 断片の量をウエスタンブロットにより解析したところ、野生型マウスと比べて VEGFR2 のリン酸化に減少傾向を認めたが、shedding 産物量およびその生後数日間の推移には特に変化がなかった。

さらに、ノックアウトマウスを用いた血管解析を進める中で、血管新生因子としてこれまで解析されていなかった新規分子について、血管とリンパ管が末梢で融合してしまう胎生致死となる表現型を見出した。この新規分子については、血管およびリンパ管特異的にノックアウトしたマウスを作製し、血管形成の組織学的解析を進め、尻尾、腸間膜など様々な組織においてリンパ管が拡張し(浮腫)、静脈に異所性にリンパ管分化スイッチである Prox1 が核内に発現することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsubara T, Iga T, Sugiura Y, Kusumoto D, Sanosaka T, Tai-Nagara I, Takeda N, Guo-Hua Fong, Ito K, Ema M, Okano H, Kohyama J, Suematsu M, *Kubota Y.	4. 巻 219(4)
2. 論文標題 Coupling of angiogenesis and odontogenesis orchestrates tooth mineralization in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 e20211789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211789.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ando T, Tai-Nagara I, Sugiura Y, Kusumoto D, Okabayashi K, Kido Y, Sato Kohji, Saya H, Navankasattusas S, Li DY, Suematsu M, Kitagawa Y, Seiradake E, Yamagishi S, *Kubota Y.	4. 巻 132(6)
2. 論文標題 Tumor-specific inter-endothelial adhesion mediated by FLRT2 facilitates cancer aggressiveness.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 e153626i
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI153626.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kido Y, Ando T, Iga T, Ema M, *Kubota Y, *Tai-Nagara I.	4. 巻 9440(21)
2. 論文標題 Genetic Deletion of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells Leads to Immediate Disruption of Tumor Vessels and Aggravation of Hypoxia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 00511-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.11.003.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tai-Nagara I, Hasumi Y, Kusumoto D, Hasumi H, Okabe K, Ando T, Matsuzaki F, Itoh F, Saya H, Liu C, Li W, Mukoyama YS, Marston Linehan W, Liu X, Hirashima M, Suzuki Y, Funasaki S, Satou Y, Furuya M, *Baba M, *Kubota Y.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Blood and lymphatic systems are segregated by the FLCN tumor suppressor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20156-6.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi M, Misaki M, Shibata S, Iga T, Shindo T, Tai-Nagara I, Hirata A, Ogawa M, Miyamoto T, Nakagawa T, Ema M, Ichiyama Y, Shima DT, Hozumi K, Nishimura S, *Kubota Y.	4. 巻 464(2)
2. 論文標題 Macrophages fine-tune pupil shape during development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 137-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.06.004.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naito H, Iba T, Wakabayashi T, Tai-Nagara I, Suehiro JI, Jia W, Eino D, Sakimoto S, Muramatsu F, Kidoya H, Sakurai H, Satoh T, Akira S, Kubota Y, *Takakura N.	4. 巻 48(2)
2. 論文標題 TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Cell.	6. 最初と最後の頁 151-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2018.12.002.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okabe K, Fukada H, Tai-Nagara I, Ando T, Honda T, Nakajima K, Takeda N, Fong GH, Ema M, Kubota Y.	4. 巻 459(2)
2. 論文標題 Neuron-derived VEGF contributes to cortical and hippocampal development independently of VEGFR1/2-mediated neurotrophism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.11.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------