

平成 29 年 9 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293096

研究課題名(和文)病態における細胞外プロテオグリカンの役割：細胞挙動制御と組織構築機構

研究課題名(英文) Role of proteoglycans in diseases: Regulation of cell behavior and maintenance of tissue structure

研究代表者

渡辺 秀人 (WATANABE, Hideto)

愛知医科大学・付置研究所・教授

研究者番号：90240514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞外マトリックスの主要なプロテオグリカン、Vcanの病態における役割を明らかにすることである。Vcanの局所発現を欠失させる遺伝子改変マウス実験系や機能回復実験を通じて、腫瘍間質に発現するVcanが腫瘍増殖抑制効果を有すること、その機能ドメインがG1とG3に存在することがわかった。Vcan沈着量と腫瘍間質のコラーゲン線維ならびに線維芽細胞数が正の相関を示すことが確認できた。また別のVcan遺伝子改変マウスの解析からVcanが胎生期の真皮形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Versican (Vcan) is a large chondroitin sulfate proteoglycan in the extracellular matrix (ECM). Here, we report that Vcan inhibits tumor growth. Local depletion of stromal Vcan expression in Vcan<flox/flox> mice by infecting cre-expressing adenoviruses facilitates growth of QRSP11 fibrosarcoma cells, which is observed as early as day 7, followed by tumor angiogenesis as early as day 14. Loss of local Vcan decreases tumor stroma including fibroblasts and dense collagen fibers, and alters localization of TGFbeta;. These results demonstrate that stromal Vcan inhibits tumor growth by maintaining the ECM structure and TGFbeta-signaling. We also analyzed Vcan<delta3/delta3> embryos, whose Vcan lacks the A subdomain of the G1 domain and exhibits less hyaluronan-binding activity, and found that Vcan plays an important role in formation of dermis. These results clearly demonstrate that Vcan contributes to ECM formation.

研究分野：分子病理学

キーワード：プロテオグリカン パーシカン 遺伝子改変マウス 創傷治癒 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

生体内組織には必ず細胞外マトリックス (extracellular matrix、以下 ECM) と呼ばれる構造体が存在し、組織形態を維持すると共に種々の生理活性分子の貯留・蓄積と濃度勾配の形成を通じて細胞挙動を制御している。ECM において、主としてコラーゲンからなる線維成分が組織骨格を構築するのに対し、線維間隙を充填するプロテオグリカン、ヒアルロン酸、その他の糖蛋白質は生理活性分子との特異的結合作用を通じて細胞機能を制御する。ECM のプロテオグリカン群のうち、巨大コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして知られるバーシカン (versican、以下 Vcan) は、その普遍的発現、他の ECM 分子群との特異的結合能、培養系にて観察される細胞挙動制御作用、遺伝子欠損マウスが重篤な表現型を呈するという事実 (Mjaatvedt CH, et al., Dev Biol, 1998) から、ECM において主体的機能を果たすプロテオグリカンと考えられている。

Vcan を世界で初めて発見した本研究室では Vcan のノックインマウス (*Vcan*^{3/3}) とコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを駆使して同分子の構造と機能に関する研究を遂行し、同分子が心内膜間葉転換 (Endocardial Epithelial Mesenchymal Transformation、Endocardial EMT) による心形態形成、心内膜細胞の遊走と心室中隔形成、心筋細胞の分化等、心形成の各段階において TGF β や BMP のシグナルを介して重要な役割を有すること (業績 2)、Vcan がヒアルロン酸との結合によって CD44 を介したシグナル伝達を制御すること (業績 15、16)、軽度の軟骨形成遅延と四肢指関節の形成異常を呈することを見出し、その詳細な解析結果から同分子が TGF β の細胞外集積に重要な役割を果たしていることを明らかにした (業績 10)。さらに申請者は、アレルギー性皮膚炎、皮膚創傷治癒、骨折治癒等のモデル実験を通じて病態における同分子の関与を明らかにするという研究計画を立案し、平成 22~24 年度科学研究費補助金・基盤 B の支援を受け研究を進めてきた。当初はタモキシフェン投与により Vcan を欠失する CAG-CreER/*Vcan*^{fllox/-}マウス系の樹立を目指したが漏出的 (leaky) Cre 発現のため成獣の実験群の獲得が困難であることが判明し、その後予定を変更し Cre 発現アデノウイルス (Ad-Cre) を用いた部位特異的 Vcan 発現欠失系を確立した。アレルギー性皮膚炎モデルでは炎症の程度に個体差が大きく、また骨折モデルでは Ad-Cre の局所への効率的感染が困難であったが、皮膚創傷治癒実験を行ったところ、Vcan 欠失により治癒が遅延することを見出した。形態学的観察からこの遅延にはコラーゲン線維形成の

低下と血管新生の遅延が関与しているものと思われた (未発表)。この観察結果は、Vcan がまさに病態における ECM の変容と組織改築の中核的役割を果たしていることを示唆している。しかしながら創傷治癒過程において Vcan が重要な役割を果たしているとの端緒は掴んだものの、その作用機構の解明には至っていない。

Vcan は、組織発生・器官形成期において細胞凝集部位に一過性に高発現して細胞分化を促進する一方、成人・成獣においては殆ど全ての組織に存在して ECM の構造分子として細胞外微小環境の維持に働く。同分子のコア蛋白質は両端に球状ドメインを、中央にコンドロイチン硫酸付加ドメインを持ち、N-末端の G1 ドメインはヒアルロン酸と、C-末端の G3 ドメインはテネイシン (tenascins)、フィブリリン (fibrillins)、フィビュリン (fibulins) 等の ECM 分子とそれぞれ結合する。また Vcan には 4 つのバリエーション (V0、V1、V2、V3) が存在し、これらのバリエーションの発現を変化させることによって一分子の持つ CS 鎖の本数を調節していると考えられる (図 1)。これらドメイン構造の機能から、Vcan は、(1) G1 ドメインによるヒアルロン酸高次構造形成を介したシグナル制御、(2) コンドロイチン硫酸の生理活性分子結合活性に基づくシグナル制御、(3) G3 ドメインと他の ECM 分子との複合体による成長因子 (特に TGF β) の貯留と分配という 3 つの作用点を介して ECM 構築と細胞挙動制御に寄与していると推測される (図 2)。

これまでに明らかにされた Vcan の性状と機能から、上記の病態において Vcan は 3 つの作用点を複合的に駆使して機能を発揮していると思われるが、その作用機構の解明には更なる詳細な検討が必要である。是非、本研究を進展させ各種病態における Vcan の機能を解明し、機能ドメインを同定すべく今回、引き続き当該研究費補助事業に申請することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞外マトリックスの主要なプロテオグリカン、Vcan の生体内機能とその作用機構を解明することである。胎生期の器官形成・組織発生における Vcan の役割を明らかにしてきた申請者は、近年病態の発症と進展における同分子の役割を研究し、同分子の欠失によって創傷治癒が遅延することを見出した。これを端緒に今回、トランスジェニックマウスによる機能回復実験を行い、Vcan の病態制御機構の解明と機能ドメインの同定を目指す。Cre 酵素発現アデノウイルスを用いた部位特異的 Vcan 発現欠失マウス系は確立済みであり本研究は支障なく遂行できる。当該マウス系と多面的解析技術を

駆使して研究を展開できるのは本申請者のみであり、細胞外プロテオグリカンの生体内機能を証明できるのは本研究しかない。

3. 研究の方法

研究 . 腫瘍の増殖における宿主間質 Vcan の機能

生後約 6-8 週齢の *Vcan*^{flx/flx} マウスに Ad-Cre (サンプル群) あるいは Ad-GFP (対照群) 溶液に懸濁した QRsP11 線維肉腫細胞株を皮下移植し、腫瘍の増殖を以下の手順で解析した。

1 (1) 腫瘍塊の大きさの経時的観察を行い、移植 7、14、21 日目に腫瘍塊を採取し腫瘍径と重量を測定した。(2) 上記の腫瘍塊を 10% 中性緩衝ホルマリンあるいは 4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液に 24 - 48 時間浸漬し、パラフィンブロックを作製した。同ブロックを薄切、未染スライドを調製し、通常の組織学的染色 (ヘマトキシリン・エオジン、アルシヤンブルー、エラスチカワンギーソン、マッソン・トリクローム等) を行った。(3) さらに免疫染色を行った。対象としては、ECM 分子群 (*Vcan*、デコリン、型コラーゲン、エラスチン、フィブリリン等) TGF 関連分子群 (LAP-TGF、T R、Smad2/3、phospho-Smad2/3 等) ヒアルロン酸シグナル関連分子群 (CD44 等) 血管新生関連分子群 (CD31、CD34、smooth muscle action 等) について免疫染色を行い、またヒアルロン酸に関してはビオチン化ヒアルロン酸結合分子 (b-HABP) を用いて各分子の発現強度と局在を検討した。

2. *Vcan* の G1-G3 ドメインから成る V3 パリアントを恒常性に発現する QRsP11 細胞 (QRsP11-V3) を作製し、上記同様に形態学的な解析を行う。

3. 腫瘍は細胞外微笑環境によって「教育」を受け、性状が変化する可能性がある。そこで腫瘍塊から腫瘍細胞を採取し、細胞培養系にて増殖速度等を検討した。

研究 . *Vcan*G1 ドメインの A サブドメインを欠失した *Vcan*^{3/3} マウスの解析

Vcan^{3/3} 胎児は E9.5~10.5 に心形成不全によって胎生致死となるため、他の臓器・組織の解析が不可能である。一方雑種系 *Vcan*^{3/3} 胎児は出生直前まで生存する。そこで雑種系 *Vcan*^{+/3} マウス同志を交配させ *Vcan*^{3/3} 胎児を獲得し、主として真皮の解析を行った。

研究 . 皮膚創傷治癒病態における *Vcan* の役割とその作用機構

生後約 6-8 週齢の *Vcan*^{flx/flx} マウスに Ad-Cre (サンプル群) あるいは Ad-GFP (対照群) を皮膚欠損予定部とその周囲約 5 mm の部分に皮内注射し、2 日後に 8 mm の生検トレパンを用いて皮膚全層欠損を創出した。

1. 形態学的解析

- 1) 翌日より創傷の治癒過程を肉眼的に観察し写真撮影にて記録した。
- 2) サンプル群と実験群とで有意差が出た時期に、健常部を含めて組織を採取した。組織を半切し、一方に対して X-Gal 染色を行い Cre 酵素の発現を確認したのちホルマリン固定しパラフィンブロックを作製した。もう一方は半切後ただちに固定し同様にパラフィン包埋する。パラフィンブロックから組織薄切標本を作製し、通常の染色 (ヘマトキシリン・エオジン染色等) を行った。

4. 研究成果

研究 . 腫瘍の増殖における宿主間質 *Vcan* の機能

マウス線維肉腫細胞株 QRsP11 を Ad-Cre と共に *Vcan*^{flx/flx} マウス皮下に移植すると、対照群と比較して腫瘍塊は有意に増大していた。この差は肉眼的には腫瘍移植後 7 日目より明らかとなり、組織学的には対照群では腫瘍細胞と宿主の線維芽細胞が混在し、一定のコラーゲン線維が観察されるのに対し、Ad-Cre 投与群では腫瘍塊はほぼ腫瘍細胞から成りコラーゲン線維と線維芽細胞数は減少していた。Ki67 免疫染色では、対照群と比較して Ad-Cre 群において高い腫瘍細胞増殖が確認された。移植後 14 日目には Ad-Cre 群で腫瘍血管の増生が目立っていた。腫瘍増殖と血管新生の亢進に関するシグナル経路を探索したところ、宿主 *Vcan* 発現欠失による ERK1/、TGF、VEGF 経路の亢進が確認された。ヒト *Vcan* の V3 パリアントを恒常的に発現する QRsP11 細胞 (QRsP11-V3) を作製した。同細胞が親株と同様の増殖速度を示すことを確認した後、上記同様の移植実験を行ったところ、Ad-cre、Ad-GFP いずれの感染例でも QRsP11-V3 の腫瘍塊は親株の腫瘍塊より小さかった。QRsP11-V3 の腫瘍間質にはヒト V3 が沈着し、コラーゲン線維と線維芽細胞が回復していた。また Ad-GFP を感染させた対象群では QRsP11-V3 で腫瘍塊は最も小さかった。これら一連の結果から、1) 宿主間質の *Vcan* が腫瘍増殖を抑制すること、2) コラーゲン線維を主体とする ECM による物理的障壁の維持ならびに腫瘍増殖に関するシグナル伝達の制御の二点が作用機序として挙げられること、3) 上記の腫瘍増殖抑制効果を発揮する *Vcan* の機能ドメインは G1-G3 であることがわかった (図 1)。

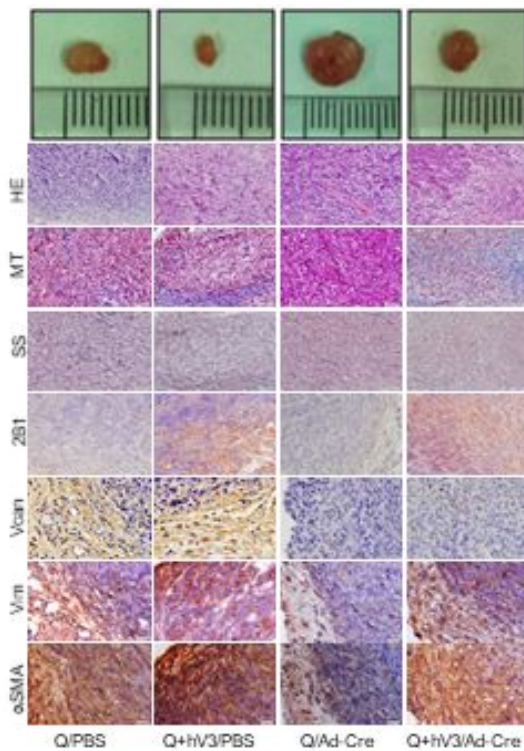


図1．宿主 Vcan 発現を欠失させると QRsP11 腫瘍細胞塊は大きくなる。ヒト Vcan V3 を強制発現させた QRsP11 細胞 (Q+hV3) を用いて同様の腫瘍移植実験を行うと宿主にて欠失したマウス Vcan を置換するように ECM にヒト V3 が沈着し同腫瘍塊は小さくなる。宿主 Vcan 存在下では Q+hV3 の腫瘍塊はさらに小さくなる。なお Vcan 沈着とコラーゲン線維量、線維芽細胞数は正の相関を示す。

腫瘍塊から採取した腫瘍細胞を培養して検討したところ増殖速度に有意差はみられなかった。このことは宿主間質に腫瘍細胞自体の性状を変化させる機能はないことを示している。

本研究は細胞外環境の人為的操作による腫瘍制御の可能性を示唆するものとして重要である。

研究 .VcanG1 ドメインの A サブドメインを欠失した Vcan^{3/3} マウスの解析

胎生期 Vcan^{3/3} マウスの皮膚の解析を行ったところ、Vcan 発現は Vcan^{3/3} マウスの皮膚で低下しており胎生期の進行に伴って発現減少は顕著となり P0 では Vcan は殆ど検出されなかった。P0 では真皮の細胞密度は低く ECM の構築も脆弱であったがコラーゲンの沈着量は野生型と Vcan^{3/3} とで有意な差はみられなかった。真皮線維芽細胞を採取して性状解析を行ったところ Vcan^{3/3} ではコラーゲン生合成能が低下し、TGF の ECM の蓄積と同シグナルの低下が観察された。マイクロアレイ解析を行ったところ、Early Growth Response (Egr) -2 と 4 の発現低下が観察された。両遺伝子は TGF の下流に位置する遺

伝子であり、Vcan^{3/3} 線維芽細胞における TGF シグナルの低下を支持する。

研究 . 皮膚創傷治癒病態における Vcan の役割とその作用機構

生後約 6-8 週齢の Vcan^{flox/flox} マウスに Ad-Cre (サンプル群)あるいは Ad-GFP (対照群)を皮膚欠損予定部とその周囲約 5 mm の部分に皮内注射し、2 日後に 8 mm の生検トレパンを用いて皮膚全層欠損を創出した。創作出後 3, 5, 7 日に組織を採取して解析を行った。Vcan^{flox/flox} マウスの創は治癒の遷延傾向がみられたが統計学的有意差は得られなかった。Ad-cre の局所注入の位置に関して至適条件の検討を行ったが技術的に困難であると結論づけ、ウイルスを用いない Vcan cKO 系を用いて創傷治癒実験を行うこととした。当初予定していた「研究 . 培養線維芽細胞を用いた Vcan の機能解析」、「研究 . Vcan G3 ドメインに基づく ECM 複合体形成機構の解析」は続行中である。

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 8 件)

1. Hatano S, Nagai N, Sugiura N, Tsuchimoto J, Isogai z, Kimata K, Ota A, Karnan S, Hosokawa Y, Watanabe H: Versican A subdomain is required for its adequate function in dermal development. *Connect Tissue Res*, in press.
2. Sugiura N, Clausen TM, Shioiri T, Gustavsson T, Watanabe H, Salanit A: Molecular dissection of placental malaria protein VAR2CSA interaction with a chemoenzymatically synthesized chondroitin sulfate library. *Glycoconj J*, 33, 985-994, 2016.
3. Shioiri T, Tsuchimoto J, Watanabe H, Sugiura N: Sequence determination of synthesized chondroitin sulfate dodecasaccharides. *Glycobiology*, 22, 596-602, 2016. DOI: 10.1093/glycob/cww008.
4. Iohara K, Fujita M, Ariji Y, Yoshikawa M, Watanabe H, Takashima A, Nakashima

- M: Assessment of pulp regeneration induced by stem cell therapy by magnetic resonance imaging. *J Endod*, 42, 397-401, 2016.
5. Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, Makino S, Nakamura T, Watanabe H: Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth. *Int J Cancer*, 138, 630-641, 2016. DOI: 10.1002/ijc.29804.
 6. Yamahara M, Sugimura K, Kumagai A, Fuchino H, Kuroi A, Kitagawa M, Itoh Y, Kawahara H, Nagaoka Y, Iida O, Kawahara N, Takemori H, Watanabe H: Callicarpa longissima extract, carnosol-rich, potently inhibits melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *J Nat Med*, 70, 28-35, 2016. DOI: 10.1007/s11418-015-0933-5.
 7. Ishimaru D, Sugiura N, Akiyama H, Watanabe H, Matsumoto K: Alterations in chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 22, 250-258, 2014.
 8. Sugiura N, Ikeda M, Shioiri T, Yoshimura M, Kobayashi M, Watanabe H: Chondroitinase from baculovirus Bombyx mori nucleopolyhedrovirus and chondroitin sulfate from silkworm Bombyx mori. *Glycobiology*, 23, 1520-30, 2013. DOI: 10.1093/glycob/cwt082.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 渡辺秀人、杉浦信夫、永井尚子、幡野その子、土本純、塩入達政
細胞外マトリックスのダイナミズムを司るプロテオグリカンとグリコサミノグリカン

第 48 回日本結合組織学会学術大会
2016 年 6 月 24 日 (長崎)

- Hideto Watanabe
The extracellular matrix: effects on ageing and disease
2nd HARC Conference May 12, 2016, Lodz, Poland
- Hideto Watanabe
Role of versican, and chondroitin sulfate in development and diseases
5th FEBS Advanced Lecture Course FEBS - MPST 2015
2015, September 24-29, Rhodes Island, Greece
- 渡辺秀人
真皮細胞外マトリックス:構築と病態による変容
第 41 回日本熱傷学会総会・学術集会教育講演 2015 年 6 月 19 日
名古屋観光ホテル (名古屋)
- ファンチャクサイ・カンダ, 岡田 太, 永井尚子, コンタウェラート・プラチャ, 幡野その子, 渡辺秀人
細胞外マトリックスプロテオグリカンによる腫瘍微小環境の形成と腫瘍制御
第 47 回日本結合組織学会学術大会 2015 年 5 月 16 日 (東京)
- 渡辺秀人, ファンチャクサイ・カンダ, 岡田 太, コンタウェラートプラチャ
宿主発現パーシカンによる腫瘍増殖制御 (Versican provides microenvironment that regulates tumor cell growth). 第 73 回日本癌学会学術総会 プログラム p276, 2014 年 9 月 25-27 日, パシフィコ横浜 (横浜)
- Kanda Fanhchaksai, Futoshi Okada, Sonoko Hatano, Prachya Kongtawelert, Hideto Watanabe
Host versican provides microenvironment that inhibits tumor

growth

第46回日本結合組織学会第51回マトリックス研究会合同学術集会 2014年6月6日 名古屋

- 幡野その子、牧野伸司、ミツタル ニシヤント、中邨智之、木全弘治、渡辺秀人
成長後の循環器に対するパーシカンの役割
第46回日本結合組織学会第51回マトリックス研究会合同学術集会
2014年6月6日 名古屋
- Hideto Watanabe
Role of chondroitin sulfate proteoglycans in development and disease
2014 KSBMB Annual Meeting 2014年5月14日 ソウル

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：歯科用前処理剤及び歯組織再生キット
発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、渡辺秀人
権利者：国立長寿医療研究センター、愛知医科大学

種類：特許出願

番号：PCT/JP2017/13572

出願年月日：2017年3月31日

国内外の別：国際出願(PCT)

名称：骨折治癒促進剤

発明者：小川寛恭、渡辺秀人、成松久、佐藤隆

権利者：国立大学法人岐阜大学、学校法人愛知医科大学、国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許出願

番号：特願 2017-007899

出願年月日：平成 29 年 1 月 19 日

国内外の別：国内出願

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺秀人(WATANABE Hideto)

愛知医科大学・分子医科学研究所・教授
研究者番号：90240514

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

杉浦信夫(SUGIURA Nobuo)

愛知医科大学・分子医科学研究所・准教授

研究者番号：90454420

永井尚子(NAGAI Naoko)

愛知医科大学・分子医科学研究所・助教

研究者番号：00367799

土本純(TSUCHIMOTO Jun)

愛知医科大学・分子医科学研究所・助教

研究者番号：70632868

(4)研究協力者

該当なし()