

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670390

研究課題名(和文)線維化・癌化を抑え、肝再生を可能にする食技術の開発

研究課題名(英文)Development of food technology to suppress fibrosis and cancer without affecting liver regeneration.

研究代表者

小嶋 聡一 (KOJIMA, SOICHI)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別ユニットリーダー

研究者番号：10202061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質架橋酵素TG2が、Rb/E2F/Ezh2経路を介して内在性血管形成阻害因子バソヒピン1の発現を抑制して癌の栄養血管形成に働くことを明らかにし、連携研究者の梶原と、腸に常在するカンジダ菌が活性酸素種(ROS)を産生して接触する肝細胞の核TG2活性を促進し、肝障害を誘導すること、フェノサフラニンがTG2の活性には影響を与えずTG2核局在を阻害することを見出した。これらの結果から、フェノサフラニンが核TG2を介する腫瘍血管新生や肝障害を阻害し、サイトゾルTG2活性依存の組織修復を可能にする可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Based on the previous findings, we studied molecular mechanisms by which 1-1) a protein crosslinking enzyme, transglutaminase 2 (TG2) promotes cancer angiogenesis and 1-2) co-culture with fungi induces nuclear TG2 activity in hepatic cells, and 2) screened a food-derived compounds that control the above clarified mechanisms. We found 1-1) TG2 inversely regulates the expression of an endogenous angiogenesis inhibitor, vasohibin 1, in lung endothelial cell cultures, animal models, and patients with lung carcinoma, 1-2) *C. albicans* and *C. glabrata* but not *S. cerevisiae* induces increased nuclear TG2 activity in hepatic cells via producing reactive oxygen species, and 2) phenosafranin inhibits nuclear transportation but not activity of TG2. These results suggest phenosafranin will be promising to suppress nuclear TG2-mediated pathogenesis such as cancer angiogenesis and hepatic injury, but not affect cytosolic TG2-mediated physiological role of TG2 such as promotion of tissue remodeling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：内科 癌 応用微生物 食品 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

現在使われているベバシズマブ(アバステン:血管内皮増殖因子に対するヒト化モノクローナル抗体)、E7080(エーザイ)、OCV-101(大塚製薬)等の「血管新生阻害薬」は、血管内皮増殖因子 MAP キナーゼ経路など血管新生基本的シグナルを標的とし、全ての血管新生を阻害する。発生・再生の段階で起こる生理的血管新生は阻害せず組織線維化や腫瘍に伴う血管新生のみを特異的に阻害する薬剤/方法の発見に全世界の研究者が挑戦し、申請者も作用機構を異にする血管新生抑制物質を報告してきた(*Blood* 2004; *Cancer Sci.* 2009; *Lab. Invest.* 2010; *Cancer Sci.* 2010)が、未だ良い方法は見つかっていない。

TG2 は、Gln-Lys 残基間に架橋結合を形成する酵素群の中で血管での発現が多いメンバーで、細胞外基質安定化に寄与する一方、細胞増殖・分化、細胞死に関与する(*Nat Rev Mol Cell Biol* 2003)。血管内皮細胞が TG2 を発現することは、申請者が世界で最初に報告した(*Biomed Res*1987)が、未だにその役割には不明な点が多かった。申請者は、TG2 が増殖因子ミッドカイン架橋 2 量体化(*JBC*1997)や LTBP を介した潜在型 TGF- 活性化反応の促進(*JCB*1993)に関与すること、TG2 遺伝子転写活性化に転写因子 Sp1 が関わること(*Mol Endocrinol*2001)、肝障害時にアルコールや遊離脂肪酸処理した肝細胞や抗癌剤処理した肝癌細胞では、TG2 が細胞核に移行し Sp1 の架橋不活性化を引起し、カスパーゼ非依存の肝(癌)細胞死を引き起こすことを見出した(*Gastroenterol* 2009; *Mol Cancer* 2011; *JCP* 2012)。

その過程で TG2 KO マウスでは皮

下に移植した癌細胞により誘導される血管新生が殆どみられないこと、BDL モデルで血管新生と線維化の形成が少ないことを見出した。TG2 KO マウスは正常に生まれ、発生に伴う血管形成には異常がないことから、TG2 が腫瘍や線維化に伴う血管形成に特異的に関与していることが示唆された(日本血管生物医学会 2012)。また、連携研究者の梶原が糖鎖改変研究に用いているワイルドタイプのカンジダ菌を肝細胞に振りかけたところ、TG2 の核局在と活性が誘導されることを見出し、本研究計画を策定した。

2. 研究の目的

蛋白質架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) が、発生に伴う生理的血管形成に影響なく、移植癌細胞による栄養血管形成に働くこと、TG2 欠損マウスでは、胆管結紮肝線維化(BDL)モデルに伴う血管新生と線維化の形成が少ないこと、さらに連携研究者の梶原と腸に常在するカンジダ菌を肝細胞に振りかけると、核 TG2 局在と活性が誘導されること、以上の分子機構を解明し、腫瘍や線維化に伴う核 TG2 を介する病的血管新生に特異的に作用する標的分子を同定して、核 TG2 並びに同標的分子の特異的阻害剤を食材より見つけ出すことによって、病的血管新生のみを特異的に抑えることにより、線維化・癌を増悪させず、組織修復を可能にする技術開発の可能性の有無を検討する。

3. 研究の方法

1) TG2 の関与が認められた肝細胞癌細胞移植血管新生、BDL 肝線維化に伴う血管新生、移植マトリゲル in vivo 疑似腫瘍血管新生や大動脈リング ex vivo 病理学的血管新生、並びに TG2 の関与が認められなかった鶏漿尿膜発生血管新生、肝再生に伴う血管新生

の各動物モデル系での TG2 の存在発現様式や基質蛋白質を生化学的、免疫化学的、分子生物学的に解析、違いを明らかにする。

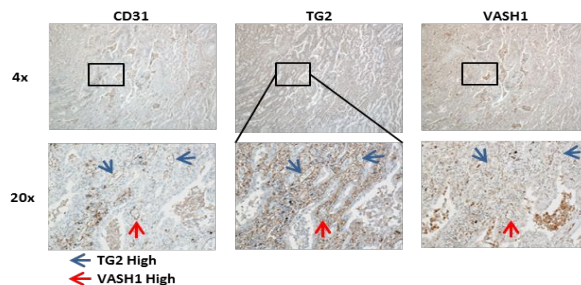
2) TG2 欠損血管内皮細胞で発現が亢進する血管新生抑制因子 VASH1 と発現が減少するその調節因子 EZH2 について Loss of Function/Gain of Function 実験を行い、TG2 欠損肝類洞壁内皮細胞を単離し、VASH1 を始めとする標的候補分子の発現変化に関わる TG2 の基質蛋白質を探索する。

3) TG2 は、細胞障害刺激を受けると、核外移行シグナルを有する D ドメインが切り取られ A-C ドメインからなる短い TG2 が核に局在し、Sp1 を架橋、細胞死を招くことを示唆する結果を得ている。この分子機構のどのステップが真菌細胞表面(糖鎖)分子による TLR/CLR 活性化(TLR2 活性化を予想)を介して誘導されるのかを調べる。野生型や種々の *Candida albicans* 変異株と TLR/CLR の siRNA/抗体により TG2 の alternative splicing variants や processing variants の生成を PCR やウエスタンブロットで調べる。

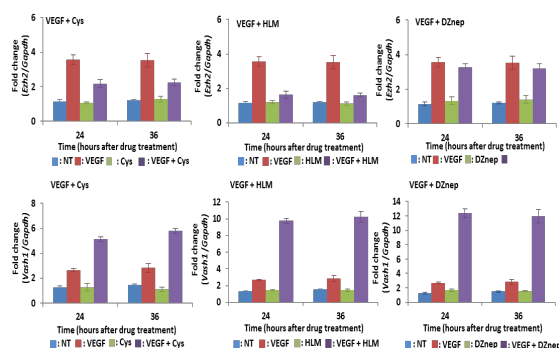
4) 生体に安全な TG2 阻害成分、並びに 2)~3) でみつけた標的分子に作用する成分を食品素材より探索し、その有効性を 1) の動物モデルで検証する。

4. 研究成果

1) 肺がんの組織の VASH1 と TG2 の発現を免疫染色法で確認した。その結果、肺がん組織の血管内皮細胞で VASH1 発現量と TG2 発現量が逆相関を示すことを見出した。

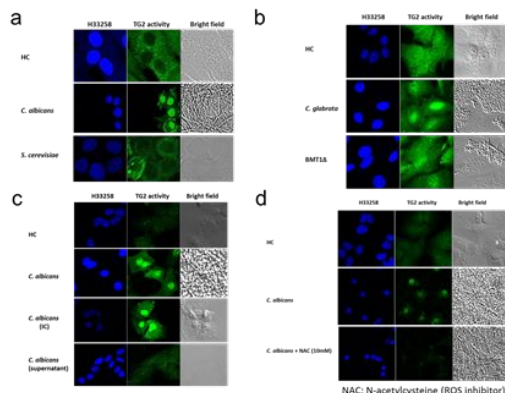


2) マウス大動脈血管内皮細胞は遺伝子導入効率が極めて悪いので、siRNA を用いた RB, E2F, EZH2 の遺伝子ノックダウンの代わりに E2F 活性阻害剤, HLM006474 や EZH2 活性阻害剤, DZnep を用いて TG2 の下流にある各シグナル分子の活性を阻害したところ、TG2 によって抑制されていた VASH1 の発現が回復する結果を得た。

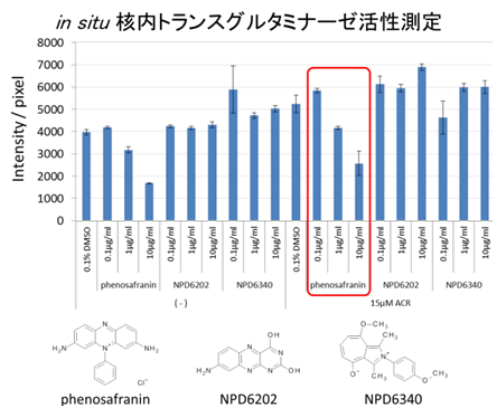


3) *C. albicans* と *C. glabrata* は核 TG2 活性を誘導し、*S. cerevisiae* は誘導しない事を共焦点顕微鏡 LSCM で確認した。DNA 配列を比較したところ、bmt1 遺伝子が *S. cerevisiae* でのみで存在しない事が分かったが、bmt1 欠損 *C. albicans* 変異株を作成してきたが、核 TG2 活性誘導作用への影響は見られなかった。Insert cup を用いた実験では核 TG2 活性誘導作用が見られたことに対し、培養上清では見られないことから、*C. albicans* が不安定な因子を介して核 TG2 活性を誘導することが考えられた。その因子の候補として活性酸素種 (ROS) に関する経路との関連を現在検討し

ている。



4) ヒト肝細胞癌細胞株 JHH-7 細胞を ACR で処理した際に誘導される核内 TG2 活性を阻害する化合物のスクリーニングを行ない、理化学研究所天然化合物バンク・NPDepo から phenosafranine をヒット化合物として見出した。



以上の結果から、phenosafranine は、核 TG2 の核移行を阻害することで、核 TG2 依存の癌栄養血管の形成を阻害し、腸内細菌の逆流による肝障害を阻害する一方、直接 TG2 の活性は阻害しないことから、サイトゾルや細胞表面 TG2 依存の組織再構築（創傷治癒）には影響を与えないことが期待される。

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 3 件)

1. Qin, X-Y., Fujii, S., Shimizu, A., Kagechika, H., and Kojima, S. Carboxylic derivatives of vitamin K2 inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through

caspase/transglutaminase-related signaling pathways. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. in press. (2015) 査読有

2. Konuma, K., Itoh, M., Suganami, T., Kanai, S., Nakagawa, N., Sakai, T., Kawano, H., Hara, M., Kojima, S., Izumi, Y., and Ogawa, Y. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin-4 receptor-deficient mice. Plos One. 10(3):e0121528. (2015) 査読有
3. Hara, M., Kirita, A., Kondo, W., Matsuura, T., Nagatsuma, K., Dohmae, N., Ogawa, S., Imajoh-Ohmi, S., Friedman, S. L., Rifkin, D. B., and Kojima, S. LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- activation in patients with hepatic fibrosis. SpringerPlus 3:221. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Xian-Yang Qin, Shinya Fujii, Naoto Ishibashi, Masahito Shimizu, Hisataka Moriwaki, Akimori Wada, Hiroyuki Kagechika, Soichi Kojima Novel acyclic retinoid and vitamin K2 derivatives inhibit hepatocellular carcinoma cell growth. FASEB 2nd International Conference on Retinoids. 2015年01月21日～2015年01月21日 ITASCA, IL USA
2. 秦成陽、神吉けい太、汐田剛史、本多政夫、石橋直人、清水雅仁、森脇久隆、鈴木治和、小嶋聡一 肝臓癌及び神経芽腫細胞における非環式レチノイドの新規標的バイオマーカーMYCNに関する検討 日本レチノイド研究会第25回学術集会 2014年12月14日～2014年12月14日 秋田大学（秋田県秋田市）
3. Rajan Shrestha、小嶋聡一 非環式レチノイドによるヒト肝細胞癌細胞における細胞死及びトランスグルタミナーゼ2の核蓄積の調節機構 日本レチノイド研究会第25回学術集会 2014年12月14日～2014年12月14日 秋田大学（秋田県秋田市）
4. Ronak Shrestha、梶原将、小嶋聡一 Effect of Candida albicans on Nuclear Transglutaminase 2 Activity in the Cultured Hepatic Cell 第21回肝細胞研究会 2014年04月15日～2014年04月15日 東京医科歯科大学（東京都文京区）
5. Rajan Shrestha、小嶋聡一 Role of Acyclic Retinoid in Nuclear Accumulation of Transglutaminase 2

and Cell Death of Human Hepatoma
第21回肝細胞研究会 2014年04
月15日~2014年04月15日 東京
医科歯科大学(東京都文京区)

〔図書〕(計 1件)

1. 秦咸陽、小嶋聡一 非環式レチノイドによる肝細胞癌の制御:基礎的検討、医学のあゆみ、249(11):1153-1158.(2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小嶋 聡一 (KOJIMA, Soichi)
理化学研究所・ライフサイエンス技術
基盤研究センター・特別ユニットリー
ダー
研究者番号: 10202061

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

梶原 将 (KAJIWARA, Susumu)
東京工業大学・生命理工学部・教授
研究者番号: 10272668