

報道関係各位

2020年10月16日

国立大学法人 東京医科歯科大学

## 「血管新生を抑制できる新規シグナル伝達調節機構を発見」 — 病的な血管新生を抑えながら副作用の少ない新規治療法への導出に期待 —

### 【ポイント】

- 長らく不明であった、血管新生抑制因子バソヒビン-1 (VASH1)<sup>※1</sup>が血管新生<sup>※2</sup>を抑制する機序をつきとめました。
- VASH1は新しい側面から血管新生因子受容体の細胞内輸送に作用することで、シグナル伝達を抑制することが明らかになりました。
- この仕組みは広範囲のターゲットを抑制できるため、副作用を回避しながら血管新生を標的とする新規治療法開発への応用が期待できます。

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 硬組織病態生化学分野の小林 美穂助教、渡部 徹郎教授の研究グループは、小林助教がこれまで所属していた東北大学 加齢医学研究所 腫瘍循環研究分野(現 東北大学 未来科学技術共同研究センター)の佐藤 靖史教授、鈴木 康弘助教、並びに Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Laboratory for Cell Polarity and Organogenesis の中山 雅敬グループリーダーとの共同研究で、バソヒビン-1 (vasohibin-1: VASH1)がタンパク質の輸送レールに作用することでシグナル伝達を抑制し、血管新生を抑えるという新たな制御機構をつきとめました。この研究は東京医科歯科大学 歯学部「最先端口腔科学研究推進プロジェクト」学部長裁量経費(研究開発代表者:小林 美穂)、及び文部科学省科学研究費補助金等の支援のもとでおこなわれたもので、その研究成果は国際科学誌 *Angiogenesis*(アンジオジェネシス)に、2020年10月14日にオンライン版で発表されました。

### 【研究の背景】

病的な血管新生は、腫瘍の成長や粥状動脈硬化、及び糖尿病性網膜症を含む様々な生活習慣病において疾患の進行に寄与することが分かっています。これら病的な血管新生を引き起こす主な促進因子としては、血管内皮成長因子(VEGF)や線維芽細胞成長因子-2(FGF2)がよく知られており、その中でも特に最も強力な促進作用を持つ VEGF に対する抗血管新生療法が多く開発され、治療に応用されています。ところが、VEGFには正常な血管を健やかに維持する機能もあるため、VEGFの働きを抑制すると正常血管への障害が引き起こされる場合があります。また、特に腫瘍では複数の血管新生促進因子が腫瘍血管新生<sup>※3</sup>を誘導しているため、VEGF 単独を抑制しても他の促進因子が血管新生を誘導してしまい、薬が効かなくなってしまうという薬剤耐性

の問題がありました。そのため、これらのような副作用を示さない新しい抗血管新生治療法の開発が待ち望まれています。

一方、生体内では恒常性を維持する仕組みにより、血管が過剰に形成されないようにする負のフィードバック調節<sup>※4</sup>が働いています。その生体内作用に基づいて同定されたのが VASH1 です。VASH1 は VEGF や FGF2 を始めとした多くの血管新生促進刺激に反応した血管内皮細胞で発現が上昇する遺伝子であり、培養血管内皮細胞やマウス生体内において血管新生を抑制して、腫瘍の進展を抑える機能があります (Watanabe et al., J Clin Invest 2004; Hosaka et al., Am J Pathol. 2009; Heishi et al., Am J Pathol. 2010)。さらに VASH1 は、血管内皮細胞が受けるストレスに対する耐性を向上させて、強く健やかな血管を維持する機能も持ちます (Miyashita et al., PLoS ONE 2012)。このように VASH1 はこれまでの抗血管新生療法が持つ問題点を克服するために有効利用できる可能性がありましたが、どのような細胞内制御機構を通して血管新生を抑制するのか、その詳細な仕組みが不明であったために、創薬ターゲットとするには困難でした。

## 【研究成果の概要】

近年、VASH1 が微小管の翻訳後修飾である脱チロシン化<sup>※5</sup>を誘導する酵素活性を持つことが報告されました (Nieuwenhuis et al., Science. 2017; Aillaud et al., Science. 2017)、その生物学的な役割については不明な点が多く残されていました。今回本研究グループは、VEGF 刺激に応じて血管内皮細胞内で VASH1 が産生されるに伴い、脱チロシン化型チューブリン ( $\Delta$ Y-チューブリン)が増加することを見出しました。さらに、VASH1 による  $\Delta$ Y-チューブリンの増加は、微小管を再チロシン化する酵素である TTL と共に作用させることによって、 $\Delta$ Y-チューブリン量を通常レベルと同程度にまで戻すことができました。このことから、VASH1 は血管内皮細胞の  $\Delta$ Y-チューブリン量を過剰に増加させ、細胞内チューブリンの  $\Delta$ Y/Y レベルのバランスを  $\Delta$ Y 側に偏らせることがわかりました (図 1)。

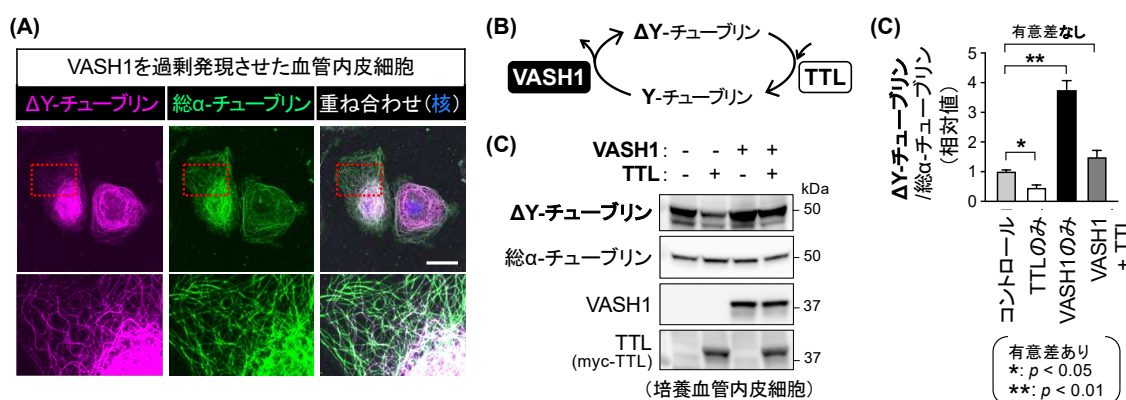


図 1. 微小管である  $\alpha$ -チューブリンの  $\Delta$ Y/Y サイクルと VASH1 による  $\Delta$ Y-チューブリン増加作用

(A) 血管内皮細胞に VASH1 を過剰発現させて  $\Delta$ Y-チューブリン等を染色した写真。下の写真は赤点線部の拡大図。  
 (B)  $\alpha$ -チューブリンでは、C 末端側の 1 つのチロシン残基 (Y) がカルボキシペプチダーゼとして機能する VASH1 により切断されると脱チロシン化型チューブリン ( $\Delta$ Y-チューブリン) になり、生成された  $\Delta$ Y-チューブリンはチューブリンチロシニリガゼ TTL により再チロシン化されて Y-チューブリンになる。この  $\alpha$ -チューブリンの  $\Delta$ Y/Y 反応は可逆的に起こる。  
 (C) 血管内皮細胞に VASH1 や TTL を過剰発現させた時の  $\Delta$ Y-チューブリン等についてのウェスタブロット解析。  
 (D) ウェスタブロット解析で得られた結果から、総  $\alpha$ -チューブリン量のうち  $\Delta$ Y-チューブリンになっていた割合を相対値として定量したグラフ。VASH1 の過剰発現により細胞内の  $\Delta$ Y-チューブリンレベルはコントロールに比べて4倍程度増加したが、VASH1 と共に TTL を過剰発現させると  $\Delta$ Y-チューブリンレベルはコントロールと同程度にまで下がった。

そこで、血管内皮細胞において VASH1 が引き起こす血管新生抑制的作用において、この  $\Delta\gamma$ -チューブリンの増加がどのような役割を果たすのかについて解析したところ、VASH1 によって  $\Delta\gamma$ -チューブリンを増加させると VEGF に誘導される血管内皮細胞遊走やシグナル伝達の活性化、さらに生体での血管新生が抑制されましたが、VASH1 と TTL を共に作用させて細胞内の  $\Delta\gamma$ -チューブリン量をコントロールと同程度にまで低下させると、VASH1 が導くこれら VEGF に対する全ての抗血管新生効果が見られなくなりました。この結果から、VASH1 による抗血管新生作用には  $\Delta\gamma$ -チューブリン量の増加が必要であることが明らかとなりました(図 2)。

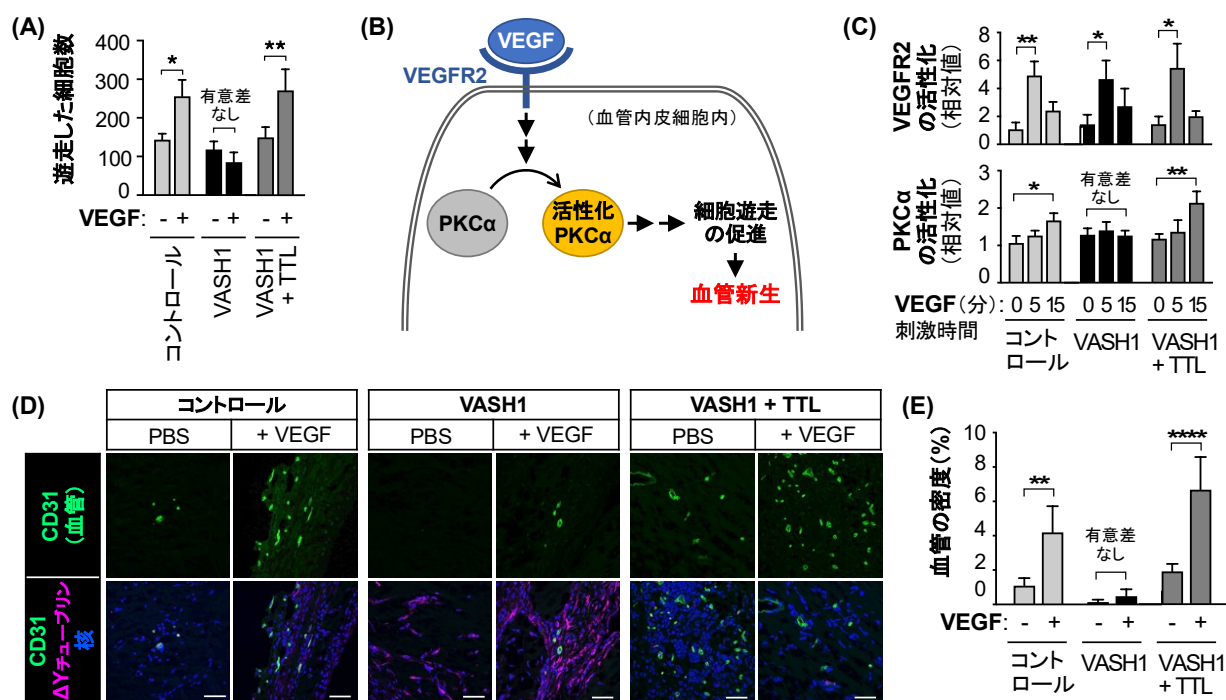


図 2. VASH1 による  $\Delta\gamma$ -チューブリン増加作用と抗血管新生作用との関係

(A) 血管内皮細胞における VEGF 誘導性の遊走解析。VASH1 は VEGF による遊走促進を阻害したが、VASH1 と TTL を共に発現させると VEGF による遊走促進効果が復活した。  
 (B) VEGF-VEGFR2 のシグナル経路。VEGF が細胞表面上に存在する受容体である VEGFR2 と結合すると、細胞内で PKC $\alpha$  を始めとする様々なシグナル分子の活性化を介して、細胞遊走とそれに伴う血管新生を促進する。  
 (C) VASH1 が VEGF-VEGFR2 シグナル経路に及ぼす影響。VASH1 は VEGF 刺激による VEGFR2 の活性化には影響しないが、その下流で起こる PKC $\alpha$  の活性化を抑制した。VASH1 によるこの効果は、細胞遊走と同様に VASH1 と TTL を共に発現させると復活した。  
 (D) 生体内マトリゲルプラグ血管新生アッセイでの血管等の写真。緑色の染色は血管を示す。  
 (E) 生体内マトリゲルプラグ血管新生アッセイでの血管密度を定量したグラフ。VASH1 は VEGF による生体内血管新生を阻害したが、VASH1 と TTL を共に発現させると VEGF による血管新生促進効果が復活した。

ここで本研究グループが注目したのが、微小管の翻訳後修飾である脱チロシン化量の変化によってシグナル伝達の下流部分に影響したことでした。細胞骨格である微小管は細胞運動において重要な働きをしますが、細胞内でのタンパク質の輸送レールとしても機能することが分かっています。一方、細胞外リガンド刺激によるシグナル伝達の活性化には、細胞表面上に存在する受容体がリガンドと結合し、細胞内へシグナルを伝達させる必要があります。そして特に VEGF や FGF2 といった成長因子については、これらリガンドと結合した受容体がエンドサイトーシス<sup>※6</sup>により細胞内に取り込まれて特定の場所に運ばれることが、シグナル伝達の活性化に必要であることが分かっています。VASH1 により血管内皮細胞での  $\Delta\gamma$ -チューブリン量を増加させておくと、

VEGF 受容体 2 (VEGFR2) のエンドサイトーシスと細胞内輸送の促進が見られなくなりましたが、VASH1 と TTL を共に作用させて細胞内の  $\Delta Y$ -チューブリン量をコントロールと同程度にまで戻すと、VEGF 刺激による VEGFR2 のエンドサイトーシスや細胞内輸送が復活しました。これらの結果から、VASH1 は血管内皮細胞において  $\Delta Y$ -チューブリン量を増加させることで、受容体のエンドサイトーシス阻害を通してシグナル伝達を抑制し、抗血管新生効果を発揮していることが明らかになりました(図 3)。また、このような VASH1 の効果は、脱チロシン化酵素活性を持たない VASH1 変異体では見られなかったことから、VASH1 による抗血管新生効果には脱チロシン化酵素活性が必要であることも明らかになりました。

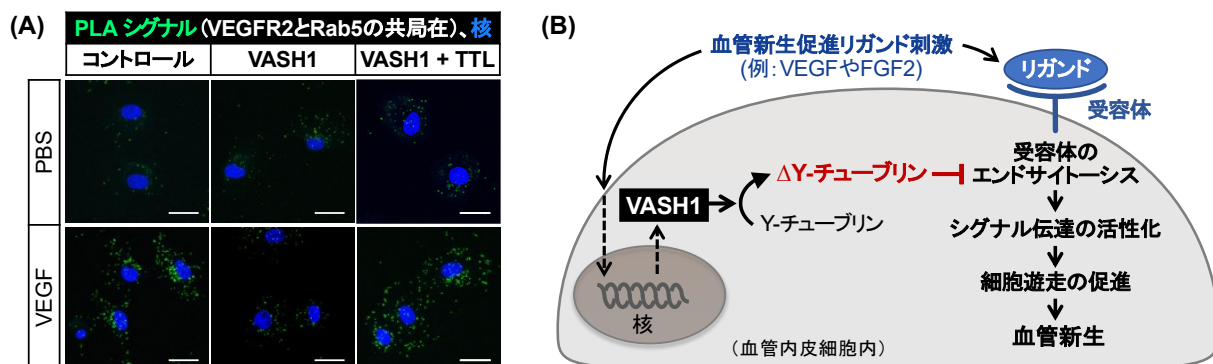


図 3. VASH1 による  $\Delta Y$ -チューブリン増加を介した血管新生シグナル伝達の抑制機構

(A) 血管内皮細胞における VEGFR2 のエンドサイトーシス解析。緑色の染色は Rab5 陽性シグナリングエンドソームに取り込まれた VEGFR2 を示す。VASH1 は VEGF 刺激に誘導される VEGFR2 のエンドサイトーシス促進を阻害したが、VASH1 と TTL を共に発現させると VEGF による VEGFR2 のエンドサイトーシス促進効果が復活した。

(B) VASH1 は  $\Delta Y$ -チューブリンの増加を通して VEGF や FGF2 といった血管新生促進リガンド刺激に誘導される受容体のエンドサイトーシスを阻害し、下流シグナル伝達の活性化を抑制する。この VASH1 によるエンドサイトーシス阻害を通じたシグナル伝達の抑制は、その後につながる細胞遊走と血管新生に対して抑制効果をもたらす。

### 【研究成果の意義】

特に腫瘍血管新生を対象にした VEGF のみを標的とした抗血管新生療法では、薬剤耐性をはじめとした副作用が問題になっていましたが、VASH1 は  $\Delta Y$ -チューブリン量の増加を通して VEGF だけでなく FGF2 による受容体のエンドサイトーシス、シグナル伝達の活性化および血管内皮細胞遊走の促進を抑制できました。VASH1 のこの仕組みを応用することで、病的な血管新生が及ぼす疾患に対して、副作用が少なく効果的な新たな抗血管新生療法への導出が期待されます。また、VASH1 による受容体のエンドサイトーシス阻害作用は、一般的な受容体において広く機能しているエンドサイトーシス駆動分子であるダイニンの働きに影響するものでした。そのため、VASH1 による  $\Delta Y$ -チューブリン量の増加の仕組みひとつで様々なリガンド/受容体の下流で活性化するシグナル伝達を抑制できる可能性があり、将来的にはシグナル伝達の異常な活性化により引き起こされる多様な疾患に対する治療に応用できる可能性を秘めています。



## 【用語の説明】

※<sup>1</sup> バソヒビン-1 (vasohibin-1: VASH1) : 血管内皮細胞が産生する血管新生の負のフィードバック制御因子として東北大学の佐藤靖史教授のグループにより同定され、現在では多くの種類のがんに対して腫瘍血管新生とそれに伴う腫瘍進展への抑制作用を有することが明らかになっている。さらに近年では、細胞内で微小管の翻訳後修飾である脱チロシン化を直接誘導する酵素であることが明らかになった。血管新生だけでなく、血管のストレス耐性や炎症抑制効果、さらには老化などにも関与し、がんの転移・血管炎症疾患から寿命の制御といった様々な生理学的現象において重要な役割を果たすことがわかっている。

※<sup>2</sup> 血管新生: 既存の血管から、血管を構成する血管内皮細胞が細胞間接着を緩めて出芽し、遊走・増殖しながら管腔を形成して、新しい血管が形成・伸長される現象。この現象のトリガーとなる、様々な血管新生促進因子が報告されている。通常は発生期にのみ見られるが、成長した後に起こる場合は病的な血管新生として分類される。

※<sup>3</sup> 腫瘍血管新生: 腫瘍が成長するためには栄養と酸素を供給して老廃物・代謝産物を運び出すことが必要であり、腫瘍内への新しい血管の侵入、すなわち血管新生が必要である。腫瘍内に侵入した新生血管はがん細胞の成長を促すだけでなく、遠隔臓器への転移の主要経路にもなる。このことから、腫瘍血管新生を抑制することで腫瘍の進展を止めることができると考えられており、様々な抗血管新生療法ががん治療に適用されている。

※<sup>4</sup> 負のフィードバック調節: 主に生体の恒常性を維持するために働く調節機構の動作原理のこと。ある現象が活性化して促進的作用をもたらすと、その作用が過剰に働かないように自身や他の物質が抑制的に制御することをいう。

※<sup>5</sup> 微小管の翻訳後修飾である脱チロシン化: 微小管はタンパク質として翻訳された後に様々な修飾(脱チロシン化、アセチル化、グルタミン化、ポリグルタミン化、グリシン化、ポリグリシン化等)を受けることで、その構造や特性を変化させて機能的に働く。その中でも脱チロシン化は、 $\alpha$ -チューブリンでのみ起こる現象であり、カルボキシル末端のチロシン残基1つが切断されることで生じる。脱チロシン化された $\alpha$ -チューブリン( $\Delta$ Y-チューブリン)は、チューブリンチロシン化酵素(tubulin tyrosine ligase:TTL)により再チロシン化される。このように細胞内では必要に応じて $\alpha$ -チューブリンの脱チロシン化/チロシン化反応が起きているが、通常は細胞内の $\alpha$ -チューブリンの大部分がチロシン化型で存在している。

※<sup>6</sup> エンドサイトーシス: 細胞が細胞外の物質を細胞膜ごと取り込む過程の一つ。その中でも、細胞外リガンドが細胞膜上の受容体と結合することで起こる受容体のエンドサイトーシスでは、細胞膜が窪んで受容体を包み込むように細胞質内に貫入して被覆小胞を形成し、受容体を含んだ被覆小胞は微小管をレールとして細胞内を輸送され、初期エンドソーム・後期エンドソーム・リサイクリングエンドソームなどに機能的に運搬される。

## 【論文情報】

掲載誌: Angiogenesis

論文タイトル: Tubulin carboxypeptidase activity of vasohibin-1 inhibits angiogenesis by interfering with endocytosis and trafficking of pro-angiogenic factor receptors

## 【研究者プロフィール】

小林 美穂 (コバヤシ ミホ) Kobayashi, Miho  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
硬組織病態生化学分野 助教

### ・研究領域

血管生物学、細胞生物学、生化学



佐藤 靖史 (サトウ ヤスフミ) Sato, Yasufumi  
東北大学 未来科学技術共同研究センター 教授  
東北大学 加齢医学研究所  
腫瘍循環研究分野 教授(兼任)

### ・研究領域

血管生物学、細胞生物学、生化学

## 【問い合わせ先】

### ＜研究に関すること＞

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
硬組織病態生化学分野 氏名 小林 美穂 (コバヤシ ミホ)  
TEL:03-5803-5449 FAX:03-5803-0187  
E-mail: miho-k.bch@tmd.ac.jp

### ＜報道に関すること＞

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係  
〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45  
TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272  
E-mail:kouhou.adm@tmd.ac.jp