

分子細胞病態学研究ユニット

Molecular Cellular Pathology Research Unit

ユニットリーダー 小嶋 聡 一
KOJIMA, Soichi

当研究ユニットは、ビタミンAを始めとするバイオブローブ(生物活性調節機能を持った低分子有機化合物)を用いたケミカルバイオロジー的手法により、血管の病気(動脈硬化、血管新生) 肝臓の病気(肝線維化・肝硬変、肝再生不全)、癌の病態形成の分子機構とそれに基づく新しい診断法、治療・予防法の確立に向けた基礎研究、また皮膚老化防止の分子機構解明の研究を行っている。転写レベルから、細胞レベル、個体レベルまで各レベルの実験を医学部や海外の研究機関、企業との共同研究で進めている。

1. 血管壁細胞の機能調節(小嶋、小見^{*1}、山村^{*2}、Sucov^{*3})

ビタミンA(レチノイン酸)は血管前駆細胞に作用しアンジオポエチン2の発現誘導を介して血管内皮細胞とそれととりまく血管平滑筋細胞との相互作用を阻害することによって血管リモデリング(血管の枝別れ構造の構築)を制御している。ビタミンAによるアンジオポエチン2のmRNA発現変化をウシ大動脈血管内皮細胞とES細胞由来血管前駆細胞とで比較した結果、ウシ大動脈血管内皮細胞では12時間で発現のピークが見られ、血管前駆細胞では32時間で発現のピークが見られ、成熟、未成熟の血管内皮細胞ではビタミンAの応答性が異なるデータを得た。一方、漢方薬“紫根”の主成分である-HIVSは、転写因子Sp1の活性化阻害を介しVEGF受容体の発現およびリン酸化を抑制していることをこれまでに報告した。本年度は-HIVSがSp1依存的なVEGF受容体並びにアンジオポエチン受容体Tie2のプロモーター活性化を阻害することで発現抑制を示すデータを得た。さらに、組織障害時に組織修復に働く転写因子KLF6とSp1、Smad3との物理的相互作用についてFRET解析を行ない、生きている細胞内において、Sp1とKLF6、Smad3が会合していることを示唆するデータを得た。

2. TGF-活性化反応を標的とした肝臓病の病態形成機構ならびに皮膚老化防止の制御(小嶋、原^{*4}、寺岡^{*2}、荒居^{*2}、梅平^{*5}、大原^{*5}、武田^{*5})

我々は以前、プラスミンと血漿カリクレインという2種類のプロテアーゼが病態によって(肝線維化・肝硬変:プラスミン;肝再生不全:血漿カリクレイン)働き、病態形成に中心的役割を担うサイトカインTGF-の放出・活性化を引き起こしており、この過程をプロテアーゼ阻害剤により抑えてやると病態形成を予防・治療できることを動物モデルで示した。この研究成果を基に、プロテアーゼ依存TGF-活性化反応を特異的に認識する抗体、すなわちプロテアーゼによって切断された潜在型TGF-の切断面を特異的に検出する抗体を作製した。さらに、同抗体を用いて、TGF-活性化反応の過程で生成する潜在型TGF-断片の血清中濃度を測定するsELISA系を確立した。

本年度は、sELISA系の有用性をラット肝障害モデル(BDLモデル)を用いて評価した。胆管結紮、未処理、偽手術の血清をsELISAにかけたところ、未処理、偽手術に比べてBDLの血清中には血漿カリクレインで切断されたLAP断片が多く存在することがわかった。さらに、肝組織の線維化の量をヒドロキシプロリン量として定量し、LAP断片量との相関関係を調べたところ、両者が比例関係にあることがわかった。これらの結果から、LAP断片量は肝線維化の進行度に比例しており、本sELISA法の有用性が示唆された。また、同反応を特異的に阻害するデコイペプチドを作製し、同ペプチドの効果を試験管内、培養細胞、動物モデルを用いて検討した結果、同ペプチドはTGF-活性化反応を抑制し、肝線維化の指標である肝星細胞の活性化を抑制し、動物モデルにおいて肝再生不全を改善した。

琥珀エタノール抽出物が皮膚構成細胞に与える影響を調べた結果、皮膚組織中のヒアルロン酸量を増加させる効果を持っているらしいことが示唆された。また、琥珀抽出物を配合した化粧品の実用化に向けて必要な検討(製造法の検討、安全性評価用サンプル調製等)を行なった。

3. トランスグルタミナーゼを介するアポトーシス誘導に関する研究(小嶋、深谷^{*6}、辰川^{*1}、Maden^{*7})

前年度までの研究において、非環式レチノイドは肝癌細胞内で起こる核内レチノイド受容体のリン酸化による機能喪失を防ぐことで内在性のレチノイドによる転写促進機能を回復させ、癌細胞の異常増殖を抑制し、タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ(TG)依存のアポトーシス(細胞の糊付け死:グルネーシスと命名)を引き起こすことを示した。また、エタノール処理した肝細胞でも同様に、核内に移行したTGにより転写因子Sp1が架橋され活性を消失する結果、その下流の遺伝子である細胞増殖因子受容体(c-Met)の発現低下によりアポトーシスが誘導されることを初代培養肝細胞や細胞株を用いた*in vitro*組織培養系、並びにFas抗体誘導性のマウス肝障害モデルを用いた*in vivo*動物モデルの実験で示した。

本年度は、アルコール投与により誘導される肝障害動物モデルにおいてもTGの核移行やSp1の架橋体が観察されることを示した。また、マイクロアレイを用いてエタノール刺激によりTG依存のもしくは、非依存的に発現が変動する遺伝子を網羅的に調べた。パスウェイ解析の結果、我々の予想どおりエタノール処理によりTG依存的に肝障害及び細胞死のシグナルが活性化され、昨年度の研究で標的遺伝子として同定されたc-Metの発現低下が深く関わっていることが分かった。

^{*1}JRA, ^{*2} 研修生, ^{*3} 訪問研究員, ^{*4} 協力技術員, ^{*5} 委託研究生, ^{*6} 研究補助員, ^{*7} 客員研究員,

This research unit is employing "Chemical Biological" approaches utilizing bio-probes such as vitamin A, and studying molecular mechanisms of diseases in blood vessels (atherosclerosis, angiogenesis), liver (hepatic fibrosis/cirrhosis, hepatic degeneration) and cancer, as well as molecular basis for prevention of the photo-aging of the skin, in order to establish novel diagnosis, therapy and prevention against these diseases and aging. We perform experiments at different levels (*i.e.* transcriptional, cellular, and animal levels) through collaboration with other research institutes, medical school of universities, and pharmaceutical companies in Japan as well as abroad.

1. Regulation of vascular cell functions

Retinoic acid suppressed the vascular remodeling by interfering with interaction between vascular endothelial and mural cells through induction of angiopoietin 2. We confirmed that peak times in induction of angiopoietin 2 by retinoic acid were different between in mature endothelial cells, and in immature progenitor cells. -HIVS, a major component of the herbal medicine "Shikon", suppressed the growth of endothelial cells via inhibition of the activity of VEGF receptor tyrosine kinases and the expression of VEGF receptor 2 via suppression of transactivation of by Sp1. We revealed that -HIVS inhibits Sp1-dependent transactivation of the *VEGFR2* and *Tie2* promoter with by lowering Sp1's binding activity to the GC box motif. We demonstrated the intracellular physical interaction between Sp1, KLF6, and Smad3 using FRET technique.

2. Regulation of liver fibrosis via controlling the activation of TGF- β

Transforming growth factor- β (TGF- β), a potent fibrogenic and growth-suppressing cytokine, is secreted in a latent form and activated proteolytically in a context-dependent manner before exerting the biological activities. We determined cleavage sites within latency-associated protein (LAP) of the latent TGF- β molecule, and made antibodies that specifically recognize plasma kallikrein-cutting ends in the damaged liver from patients with fulminant hepatitis.

This year, we successfully established the sELISA system to detect TGF- β degradation products present in mice sera, which were thought to be formed during TGF- β activation reaction by plasma kallikrein. In the rat bile duct ligation (BDL) model, 4 fold higher serum levels of LAP degradates were detected in BDL group than in no treatment group or in sham operation group. Moreover, serum levels of LAP degradates showed a good correlation with hepatic hydroxyproline contents, suggesting that the LAP degradates produced during TGF- β activation reaction may be a promising novel biomarker for hepatic fibrosis. We also produced decoy peptides efficiently suppressing the TGF- β activation reaction, preventing the activation of hepatic stellate cells in culture, and improving impaired liver regeneration observed in LPS-pretreated partially hepatectomized mice.

3. Studies on transglutaminase-mediated apoptosis

Acyclic retinoid prevented phosphorylation of the nuclear retinoid receptor, and restored its normal function to transactivate genes regulating cell growth and apoptosis including tissue transglutaminase (TG) in hepatocarcinoma cells. Using TG-targeting mice and their hepatocytes, we found that the TG-mediated apoptosis (referred *glunasis*) is induced in hepatocytes injured with ethanol and/or Fas antibody-treatment. We found that TG crosslinks and inactivates transcription factor, Sp1, which induces apoptosis by downregulation of c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor *in vitro* and *in vivo*.

We corroborated the induction of TG-dependent apoptosis also in an alcohol-treated liver injury model. To check whether Sp1 is the target gene affected by inactivation of Sp1, we performed the microarray analysis in ethanol-treated primary hepatocytes isolated from both wild-type and TG-knockout mice. The result of pathway analysis from microarray data showed that in ethanol-treated hepatocytes, the pathways of both liver injury and cell death were stimulated in a TG-dependent fashion, and that downregulation of c-Met was an important event with TG-induced apoptosis.

Staff

Head

Dr. Soichi KOJIMA

Members

Ms. Mituko HARA *1

Ms. Yayoi FUKAYA *2

Mr. Yusuke KOMI *3

Mr. Hideki TATSUKAWA *3

*1 Contract Technical Scientist *2 Technical Staff *3 Junior Research Associate

Visiting Member

Dr. Henry M. Sucoy (Univ. Southern California Keck Schl. Med., USA)

Guest Investigator

Dr. Malcolm Maden (King's College London, U.K.)

Trainees

Ms. Ayako ARAI (Biol. Sci., Tokyo Inst. Tech.)
Mr. Ryutaro TERAOKA (Sci. & Engineering., Saitama Univ.)
Ms. Ayano YAMAMURA (Fac.Sci, Tokyo Univ. Sci.)
Ms. Reiko TAKEDA (Yamano Beauty Mate. Co., Ltd.)
Mr. Kazutaka Umehira (Yamano Beauty Mate. Co., Ltd.)
Ms. Mayu Ohara (Yamano Beauty Mate. Co., Ltd.)