

200823025A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

血管新生とリンパ管新生の同時制御による
制癌法の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐藤 靖史

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
血管新生とリンパ管新生の同時制御による制癌法の確立に関する研究	--	1
佐藤靖史		
II. 分担研究報告		
1. 骨髄細胞・内皮前駆細胞に関する研究	-----	4
高倉伸幸		
2. リンパ管内皮細胞の遺伝子発現に関する研究	-----	5
渡部徹郎		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	7
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

血管新生とリンパ管新生の同時制御による制癌法の確立に関する研究

研究代表者 佐藤靖史 東北大学加齢医学研究所教授

研究要旨

Vasohibin-1 (VASH1) は、広いスペクトルで血管新生とリンパ管新生を同時に阻害し、腫瘍の発育とリンパ節転移を抑制する活性を有している。VASH1 は血管新生を抑制するが内皮細胞を障害せず、腫瘍血管を成熟化させるため、抗癌剤との併用が効果的である。また、VASH1 は内皮細胞を障害しないばかりか、内皮細胞のストレス耐性を増し、このことは他の血管新生阻害剤と際違った相違点である。治療応用の一環として、レコンビナント VASH1 蛋白の大量調整と体内安定化に目処がついた。

分担研究者

高倉伸幸・大阪大学微生物病研究所
教授

渡部徹郎・東京大学大学院医学系研究
科 助教

A. 研究目的

癌の治療標的として腫瘍血管新生と腫瘍リンパ管新生が注目されている。理想としては血管新生とリンパ管新生の双方を同時に制御することが望ましいが、そのような治療法は未だ確立していない。昨年度の研究において、研究代表者の発見した新規血管新生抑制因子 VASH1 は、血管新生とリンパ管新生の同時に、しかも広いスペクトルで阻害し、腫瘍の発育とリンパ節転移を抑制する活性を有していることを示した。本研究は、VASH1 の癌治療への応用を進めることで、本邦発の新しい治療法として国民の癌医療に大きく貢献することを目的としている。

B. 研究方法

(1) VASH1 ノックアウトマウスに癌細胞を皮下移植して、腫瘍の発育と血管新生の程度を野生型マウスと比較することで内因性 VASH1 の意義を検討する。野生型マウスに癌細胞を皮下移植し、ヒト VASH1 遺伝子搭載非増殖型アデノウイルスを尾静注して肝臓で発現させることで、外因性 VASH1 を腫瘍に作用させたときの効果を検討する。

(2) 培養内皮細胞の内因性 VASH1 の発現を siRNA でノックダウンするか、あるいは VASH1 遺伝子導入して高発現させ、VASH1 の内皮細胞の viability に与える影響を検討する。

(3) 大腸菌用コドンに置き換えることで大腸菌でのレコンビナントの VASH1 蛋白の産生を行い、その抗血管新生活性を角膜アッセイで確認する。

レコンビナント VASH1 蛋白をポリエチレングリコール (PEG) 化修飾し、活性を角膜アッセイで確認するとともに体内動態を検討する。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は所属施設での審査を受けた後に行う。

C. 研究結果

(1) VASH1 ノックアウトマウスでは、移植腫瘍は腫瘍血管新生に富んでおり、内因性 VASH1 は腫瘍血管新生制御に機能していることが確認された。

腫瘍を移植した野生型マウスにヒト VASH1 遺伝子搭載非増殖型アデノウイルスを尾静注すると、外因性 VASH1 は腫瘍血管を成熟化させた。また、その結果として血流が改善し、抗癌剤との併用効果が観察された。

(2) 一般に血管新生抑制因子は内皮細胞のアポトーシスを促進するが、VASH1 は内皮細胞のストレス耐性を増し、内皮細胞の生存を助長することが確認された。その機序として VASH1 は SOD2 の発現を介して ROS の生成量を制御すると共に、長寿遺伝子 SIRT1 の発現を増やすことが判明した。

(3) 治療応用に資するためレコンビナント VASH1 蛋白の大量調整法の検討を進め、大腸菌を用いて活性を有するレコンビナント蛋白の調整を可能とし、本蛋白が、動物実験においても活性を発揮することを確認した。さらに、レコンビナント VASH1 蛋白の PEG 化修飾による体内での安定性の改良を行った。

D. 考察

VASH1 は、広いスペクトルで血管新生とリンパ管新生を阻害するが、内皮細胞を障害せず、逆にストレス耐性を増やすことは他の血管新生阻害剤と際違った相違点である。腫瘍血管を成熟化させるため、抗癌剤との併用が効果的と考えられる。

E. 結論

内皮細胞が産生する血管新生・リンパ管新生抑制因子 VASH1 の特異な性質を明らかにし、さらに治療応用の一環としてのレコンビナント蛋白の大量調整と体内安定化に目処がたった。

F. 健康危険情報

健康に対する危険性を認めない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshinaga, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Nobuo Yaegashi, N., and Sato, Y. Vasohibin, a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor: its expression on endometrial carcinoma in relation to tumor vascularity. *Cancer Sci.* 99: 914-919, 2008.

Wakusawa, R., Abe, T., Sato, H., Yoshida, M., Kunitaka, H., Sato, Y., and Nishida K. Expression of vasohibin, an antiangiogenic factor, in human choroidal neovascular membranes. *Am. J. Ophthalmol.* 146:235-243, 2008.

Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, Ohuchi N, Sasano H. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci.* 100:88-94, 2009.

Lefter LP, Dima S, Sunamura M, Furukawa T, Sato Y, Abe M, Chivu M, Popescu I, and Horii A. Transcriptional silencing of ETS-1 efficiently suppresses angiogenesis of pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* 16:137-148, 2009.

Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y, and Nishida K. Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 52:359-361, 2009.

Nishida Y, Shibata K, Yamasaki M, Sato Y, and Abe M. A possible role of vimentin on the cell surface for the activation of latent transforming growth factor- β . *FEBS Lett.* 583: 308- 312, 2009.

Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, Ohta H, Fujiwara T, Shimosegawa T and Sato Y. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* (Epub ahead of print).

Naito H, Kidoya H, Sato Y, and Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J. Biochem.* (Epub ahead of print).

Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Moriya T, Suzuki S, Kondo T, Sato Y. Vasohibin-1 expressed in endothelium of tumor vessels regulates angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2009 (accepted for publication).

2. 学会発表

Sato, Y. The Role of Vasohibin in the Regulation of Angiogenesis. 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008.

Sato, Y. The Role of Vasohibin in the Regulation of Tumor Angiogenesis. 9th International Conference Angiogenesis: Basic Science and Clinical Applications, Patras, Greece, 2008.

Heishi T, Miyashita H, Takahashi T, Oike Y and Sato Y. Vasohibin Suppresses Lymph Node Metastasis via the Inhibition of Lymphangiogenesis in Mice. 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008.

佐藤靖史. 内因性血管新生抑制因子と癌. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.

佐藤靖史. がんにおける血管新生制御の分子基盤. 平成20年度がん特定領域研究5領域合同シンポジウム, 東京, 2009.

佐藤靖史. Common molecular basis for the regulation of angiogenesis and vascular aging. 第4回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 東京, 2009.

佐藤靖史. 血管新生阻害剤の分子標的. 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会, 名古屋, 2009.

宮下浩輝, 佐藤靖史. 血管内皮細胞におけるVasohibin-1の標的遺伝子の解析. 第81回日本組織培養学会大会, つくば, 2008.

鈴木康弘, 小林美穂, 宮下浩輝, 太田英樹, 園田光, 佐藤靖史. Vasohibin結合性低分子量蛋白SVBPの単離とその分泌における役割. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.

鈴木康弘, 小林美穂, 宮下浩輝, 太田英樹, 園田光, 佐藤靖史. Isolation of a small Vasohibin-binding protein (SVBP) and its important role in the secretion of Vasohibin. 第16回日本血管生物医学会学術総会, 名古屋, 2008.

宮下浩輝, 佐藤靖史. Vasohibin-1 is involved in the maintenance of vascular endothelial cells. 第16回日本血管生物医学会学術総会, 金沢, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

特許出願「バソヒビン1を認識するモノクローナル抗体および該抗体を用いるバソヒビンの免疫測定方法」

特願 2008-218581

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

骨髄細胞・内皮前駆細胞に関する研究に関する研究

分担研究者 高倉 伸幸 大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨：マウス骨髄細胞中の造血前駆細胞では骨髄破壊後の急速な骨髄造血の回復期にvasohibin-1の発現が誘導され、白血病細胞を用いた解析からこのvasohibin-1は造血前駆細胞の過剰な増殖を抑制する内因性ブレーキ因子であることが示唆された。

A. 研究目的

血管新生時において血管内皮細胞から分泌の亢進するvasohibin-1(以下vash1)は血管新生を抑制する内因性の血管新生抑制因子である。腫瘍環境においては造血幹/前駆細胞を含め、多くの血液細胞が骨髄から動員され血管新生に関わることが明らかにされてきた。そこで本研究では血液細胞におけるvash1の発現を詳細にし、その機能的な意義を解明することを目的とした。

B. 研究方法

vash1の発現を骨髄細胞において詳細に検討した。また、虚血におけるvash1の発現制御を解析するために、マウスの下肢虚血モデルを作成して、虚血部位における血液細胞のvash1の発現を解析した。さらに5-FU投与による骨髄破壊後のvash1の発現について解析し、白血病細胞におけるvash1のノックダウンにより機能的意義を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はマウスを用いた解析であり、実験動物の使用に関しては、大阪大学微生物病研究所の定める倫理規定に則って研究を行った。

C. 研究結果

骨髄では造血幹細胞にvash1の特異的な発現が解析された。しかし、虚血肢から採取した造血幹細胞、あるいは虚血を誘導後の骨髄中の造血幹細胞では、定常時に比べvash1の発現に差は観察されなかった。さらに5-FUによる骨髄破壊後の解析でも造血幹細胞におけるvash1の発現誘導は観察されなかった。しかし、この際骨髄前駆細胞においてvash1の発現が亢進した。白血病細胞へのvash1のRNAiによる発現抑制により白血病細胞の増殖が増強した。

D. 考察

血管内皮細胞とは異なり、血液でのvash1の発現は血管新生を誘導する低酸素条件下では発現が誘導されないが、vash1は造血前駆細胞が急速に増殖する際に内皮細胞と同様発現が亢進して細胞増殖を負に制御することが示唆された。

E. 結論

vash1は造血前駆細胞の骨髄内プールサイズの決定機構に関与しており、白血病において治療薬の対象となると考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Naito H, Kidoya H, Sato Y, Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. J Biochem. in press ほか8報

2. 学会発表

高倉伸幸 血管新生の基礎と臨床的進歩
日本血液学会総会 2008年10月10-12日京都
ほか7件

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

リンパ管新生調節因子 Ets-1 に関する研究

分担研究者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・助教

研究要旨 癌の悪性化を抑制するためには血管新生とリンパ管新生の両方を同時に制御できる治療法を開発することが急務であり、内因性の血管・リンパ管新生抑制因子である Vasohibin-1 に注目が集まっている。本研究では Vasohibin ならびにさまざまな調節因子による血管・リンパ管新生抑制作用の分子機構の解明を試みる。本年度は主にリンパ管新生を調節する Ets-1 転写因子の機能についての研究を行い、Ets-1 の機能を阻害することによってリンパ管新生が阻害されることを見出した。

A. 研究目的

リンパ管は末梢組織で血管から漏出した間質液、タンパク質、細胞などを血管系へと環流することにより血液の量や組成を一定に保ち、成体の恒常性を維持するとともに、癌組織から細胞を運んでリンパ節転移を引き起こしたりもする。このためリンパ管形成機構の解明は医学的に必要性が高いが、その研究の歴史は比較的新しく、未解明な点が多く残されている。本研究においては Vasohibin ならびに他の調節因子によるリンパ管新生抑制作用の分子機構の解明を試みるために、本年度は血管新生において重要な役割を果たす Ets-1 転写因子に注目し、リンパ管新生における作用について検討した。

B. 研究方法

我々はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) ならびにヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 (HDLEC) を用いて Ets-1 の作用を検討した。HUVEC ならびに HDLEC においてはアデノウィルスを用いて Ets-1 を発現させ、siRNA を用いて Ets-1 の発現を低下させた。さらに個体レベルで Ets-1 のリンパ管新生に対する作用を検討するためにマウス横隔膜上の新生リンパ管において腹腔内に注射したアデノウィルスにより Ets-1 または Ets-1 の機能を阻害する Tm-Ets を発現させた。

(倫理面への配慮)

ヒトの遺伝子解析ならびに相手方の同意を得る研究は本研究計画には含まれていない。

C. 研究結果

Ets-1 が血管新生を亢進することは報告されていたが、リンパ管新生における役割は未解明であった。我々は Ets-1 が血管内皮細胞 (HUVEC) のみならずリンパ管内皮細胞 (HDLEC) においても発現することを示した。またリンパ管内皮細胞における Ets-1 はリンパ管発生マスター因子である Prox1 と結合する。さらに Ets-1 は Prox1 と協調してリンパ管新生因子である VEGF-C の受容体である VEGFR3 の発現を誘導し、内皮細胞の VEGF-C に対する走化性を亢進することが明らかになった。さらにマウス横隔膜上における炎症性リンパ管新生に対する Ets-1 の効果を検討するために Ets-1 または Ets-1 の機能を阻害するドミナントネガティブ変異体である Tm-Ets を発現するアデノウィルスを腹腔内に注射したところ、Ets-1 がリンパ管新生を促進し、Tm-Ets が抑制することが示された (Yoshimatsu, Watabe et al., 投稿準備中)。

D. 考察

以上の結果から Ets-1 が血管新生のみならずリンパ管新生を抑制するための新たな標的となりうることを示唆された。

E. 結論

Ets-1 はリンパ管内皮細胞において発現し、Prox1 と結合することにより協調して VEGFR3 などの遺伝子の発現調節を行ない、リンパ管新生を誘導していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K: TTF-1 inhibits TGF- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Research* Mar 17. [Epub ahead of print], 2009
2. Yamazaki T, Yoshimatsu Y, Morishita Y, Miyazono K, Watabe T: COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. *Genes to Cells* 14:425-434, 2009
3. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, *Watabe T (*: corresponding author), Miyazono K: Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of Cell Science* 121:3317-3324, 2008
4. Nonaka H, Watabe T, Saito S, Miyazono K, Miyajima A: Development of stabilin2+ endothelial cells from mouse embryonic stem cells by inhibition of TGF β /activin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375:256-260, 2008
5. Kawasaki K, Watabe T, Sase H, Hirashima M, Koide H, Morishita Y, Yuki K, Sasaoka T, Suda T, Katsuki M, Miyazono K, Miyazawa K: Ras signaling directs endothelial specification of VEGFR2+ vascular progenitor cells *Journal of Cell Biology* 181:131-141, 2008
6. Oka M, Iwata C, Suzuki H, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T, Komuro A, Kano MR, Miyazono K: Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood* 111:4571-4579, 2008
7. Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, *Watabe T (*: corresponding author), Miyazono K: BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and Angiopoietin-1/Tie2 signals. *Journal of Biochemistry* 143:199-206, 2008

2. 学会発表

The 15th International Vascular Biology Meeting (Sydney, Australia) 2008年6月1~5日
Watabe T, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Roles of Ets family members in the regulation of Prox1-mediated lymphatic differentiation of endothelial cells. (Poster)

The 28th Sapporo Cancer Seminar International Symposium "TGF- β signaling and cancer" (Sapporo) 2008年6月26~27日

Watabe T, Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Miyazono K. Snail is required for TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells (Poster)

第29回日本炎症・再生医学会(東京)2008年7月8~10日

渡部徹郎: リンパ管発生における転写・シグナルネットワークの役割 (シンポジウム)

第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008年10月28~30日

Watabe T, Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Miyazono K. Snail is required for TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells (International session)

第16回日本血管生物医学会(金沢)2008年12月3~5日

Watabe T, Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Miyazono K. Snail is required for TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells (Poster)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshinaga, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Nobuo Yaegashi, N., and Sato, Y.	Vasohibin, a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor: its expression on endometrial carcinoma in relation to tumor vascularity.	<i>Cancer Sci.</i>	99	911-919	2008
Wakusawa, R., Abe, T., Sato, H., Yoshida, M., Kunitaka, H., Sato, Y., and Nishida K.	Expression of vasohibin, an antiangiogenic factor, in human choroidal neovascular membranes.	<i>Am. J. Ophthalmol.</i>	146	235-243	2008
Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, Ohuchi N, Sasano H.	Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis.	<i>Cancer Sci.</i>	100	88-94	2009
Lefter LP, Dima S, Sunamura M, Furukawa T, Sato Y, Abe M, Chivu M, Popescu I, and Horii A.	Transcriptional silencing of ETS-1 efficiently suppresses angiogenesis of pancreatic cancer.	<i>Cancer Gene Ther.</i>	16	137-148	2009
Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y, and Nishida K.	Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy.	<i>Diabetologia</i>	52	359-361	2009
Nishida Y, Shibata K, Yamasaki M, Sato Y, and Abe M.	A possible role of vimentin on the cell surface for the activation of latent transforming growth factor- β .	<i>FEBS Lett.</i>	583	308-312	2009

Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, Ohta H, Fujiwara T, Shimosegawa T and Sato Y.	Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis.	<i>Blood</i>	(Epub ahead of print)		
Naito H, Kidoya H, Sato Y, and Takakura N.	Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population.	<i>J. Biochem.</i>	(Epub ahead of print)		
Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Moriya T, Suzuki S, Kondo T, Sato Y.	Vasohibin-1 expressed in endothelium of tumor vessels regulates angiogenesis.	<i>Am. J. Pathol.</i>	(accepted for publication).		
Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N.	Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis.	<i>EMBO J.</i>	27	522-534	2008
Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N.	Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1.	<i>Nat Cell Biol.</i>	10	513-26	2008
Satoh N, Yamada Y, Kinugasa Y and Takakura N.	Angiopoietin-1 alters tumor growth by stabilizing blood vessels or by promoting angiogenesis.	<i>Cancer Sci.</i>	99	2373-2379	2008
Katoh SY, Ueno M, Takakura N.	Involvement of MDR1 Function In Proliferation of Tumor Cells.	<i>J Biochem.</i>	143	517-524	2008
Hayashi H, Kunisada T, Takakura N, Aoki M, Mizuta K, Ito Y.	Involvement of platelet-derived growth factor receptor-beta in maintenance of mesenchyme and sensory epithelium of the neonatal mouse inner ear.	<i>Hear Res.</i>	245	73-81	2008
Han Y, Ueno M, Nagahama Y, Takakura N.	Identification and characterization of stem cell-specific transcription of <i>PSF1</i> in spermatogenesis.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	380	609-613	2009

Ueno M, Itoh M, Sugihara K, Asano M, and <u>Takakura N.</u>	Both alleles of <i>PSF1</i> are required for maintenance of pool size of immature hematopoietic cells and acute bone marrow regeneration.	<i>Blood</i>	113	555-562	2009
Takakura N and Kidoya H.	Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells : involvement of apelin/APJ and Angiopoietin/Tie2 interactions in vessel caliber size regulation.	<i>Thrombosis and Haemostasis</i>	In press		
Naito H, Kidoya H, Sato Y, <u>Takakura N.</u>	Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population.	<i>J Biochem.</i>	In press		
Saito RA, <u>Watabe T,</u> Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K:	TTF-1 inhibits TGF- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells.	<i>Cancer Research</i>	Mar 17. [Epub ahead of print]		2009
Yamazaki T, Yoshimatsu Y, Morishita Y, Miyazono K, <u>Watabe T</u>	COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction.	<i>Genes to Cells</i>	14	425-434	2009
Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, <u>Watabe T,</u> Miyazono	Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells.	<i>Journal of Cell Science</i>	121	3317-3324	2008
Nonaka H, <u>Watabe T,</u> Saito S, Miyazono K, Miyajima A	Development of stabilin2+ endothelial cells from mouse embryonic stem cells by inhibition of TGF β /activin signaling.	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	375	256-260	2008
Kawasaki K, <u>Watabe T,</u> Sase H, Hirashima M, Koide H, Morishita Y, Yuki K, Sasaoka T, Suda T, Katsuki M, Miyazono K, Miyazawa K.	Ras signaling directs endothelial specification of VEGFR2+ vascular progenitor cells	<i>Journal of Cell Biology</i>	181	131-141	2008

Oka M, Iwata C, Suzuki H, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T , Komuro A, Kano MR, Miyazono K.	Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis	<i>Blood</i>	111	4571-4579	2008
Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, Watabe T , Miyazono K.	BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and Angiopoietin-1/Tie2 signals.	<i>Journal of Biochemistry</i>	143	199-206	2008

blood

Prepublished online Feb 9, 2009;
doi:10.1182/blood-2008-07-170316

Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis

Hiroshi Kimura, Hiroki Miyashita, Yasuhiro Suzuki, Miho Kobayashi, Kazuhide Watanabe, Hikaru Sonoda, Hideki Ohta, Takashi Fujiwara, Tooru Shimosegawa and Yasufumi Sato

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.
Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



**Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the
regulation of angiogenesis**

Short title: **Vasohibin family in the regulation of angiogenesis**

Hiroshi Kimura^{1,4}, Hiroki Miyashita¹, Yasuhiro Suzuki¹, Miho Kobayashi¹, Kazuhide
Watanabe,¹ Hikaru Sonoda², Hideki Ohta², Takashi Fujiwara³, Tooru Shimosegawa⁴,
and Yasufumi Sato¹

¹Department of Vascular Biology, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University,
Sendai, Japan; ²Discovery Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan; ³Department of
Biological Resources, INCS, Ehime University, Shitsukawa, Toon, Ehime, Japan; ⁴Department of
Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

Corresponding author: Yasufumi Sato, Department of Vascular Biology, Institute of Development,
Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan.
Phone: +81-22-717-8528. Fax: +81-22-717-8533, E-mail: y-sato@idac.tohoku.ac.jp

scientific category: VASCULAR BIOLOGY

ABSTRACT

We recently isolated a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin-1 and its homologue vasohibin-2. In this study we characterize the role of these 2 molecules in the regulation of angiogenesis. In a mouse model of subcutaneous angiogenesis, the expression of endogenous vasohibin-1 was low in proliferating ECs at the sprouting front, but high in non-proliferating ECs in the termination zone. In contrast, endogenous vasohibin-2 was preferentially expressed in mononuclear cells mobilized from bone marrow that infiltrated the sprouting front. When applied exogenously, vasohibin-1 inhibited angiogenesis at the sprouting front where endogenous vasohibin-1 was scarce, but did not influence vascularity in the termination zone where endogenous vasohibin-1 was enriched. Exogenous vasohibin-2 prevented the termination of angiogenesis in the termination zone and increased vascularity in this region. Angiogenesis was persistent in the termination zone in the *vasohibin-1* knockout mice, whereas angiogenesis was deficient at the sprouting front in the *vasohibin-2* knockout mice. Supplementation of deficient proteins normalized the abnormal patterns of angiogenesis in the vasohibin knockout mice. These results indicate that vasohibin-1 is expressed in ECs in the termination zone to halt angiogenesis, whereas vasohibin-2 is expressed in infiltrating MNCs in the sprouting front to promote angiogenesis.

INTRODUCTION

Angiogenesis, or the formation of new capillaries, is a key event in various developmental or remodeling processes that take place under physiological and pathological conditions. Angiogenesis is a dynamic phenomenon that involves sequential processes. The initial event is the detachment of mural pericytes from preexisting vessels for vascular destabilization. Subsequently, specialized endothelial cells (ECs) at the tip of sprout, called tip cells, degrade the basement membrane and extracellular matrices and actively migrate. The stalk cells follow the tip cells, proliferate, and form tubes. Finally, pericytes reattach to the new vessels as they mature. Through these processes, a new hierarchical vascular architecture will be constructed.¹

The local balance between angiogenesis stimulators and inhibitors determines whether angiogenesis will be switched on. Numerous endogenous angiogenesis inhibitors are found in the body and play distinctive roles.² For example, molecules such as pigment epithelium-derived factor,^{3,4} chondromodulin-1,^{5,6} and maspin^{7,8} are localized extrinsic to the vasculature and block the intrusion of new vessels as functional barriers. Thrombospondin-1 and thrombospondin-2 are deployed mainly by platelets and turn the angiogenic switch off.⁹ Moreover, a number of angiogenesis inhibitors including endostatin and tumstatin are generated via the degradation of the

basement membrane during angiogenesis.¹⁰ Besides them, ECs themselves have the capacity to synthesize certain inhibitors that autoregulate angiogenesis.²

By searching for novel and functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible molecules in ECs, we isolated one angiogenesis inhibitor and named it vasohibin-1 (VASH1).¹¹ VASH1 is induced in cultured ECs by representative angiogenic growth factors such as VEGF and fibroblast growth factor 2 (FGF-2), and is detected selectively in ECs at the site of angiogenesis *in vivo*.¹¹ The inducible expression of VASH1 in ECs is impaired by tumor necrosis factor- α , interleukin-1, or hypoxia.^{11,12} Human VASH1 protein is composed of 365 amino acid residues. VASH1 lacks a classical secretion signal sequence but is released extracellularly, indicating that VASH1 is an unconventional secretory protein.^{11,13} When applied exogenously, VASH1 inhibits the migration and proliferation of ECs stimulated with either VEGF or FGF-2.¹¹ This inhibitory effect is not due to the inactivation of growth factor-signals, because VASH1 does not affect VEGF receptor 2 (VEGFR2) or ERK1/2 phosphorylation in ECs upon VEGF stimulation.¹¹ VASH1 exerts anti-angiogenic activity under various pathological conditions such as those of tumors, retinal neovascularization, and arterial intimal thickening implying a possible clinical application.^{11,14,15}

Through a DNA sequence search of genomic databases, we found one gene

homologous to VASH1 and named it vasohibin-2 (VASH2).¹⁶ The genes for human VASH1 and VASH2 are located on chromosome 14q24.3 and 1q32.3, respectively.¹⁷ Human vasohibin-2 is composed of 355 amino acid residues, and the overall homology between human VASH1 and VASH2 is 52.5% at the amino acid level. Similar to VASH1, any known functional motifs are found in the primary structure of VASH2.

The expression of VASH2 in cultured ECs is very low and is not inducible, but VASH1 and VASH2 proteins are comparably detected in ECs in the developing organs of embryos.¹⁶ We have shown that VASH1 and VASH2 are diffusely expressed in ECs in embryonic organs during mid-gestation. After that time point, they become faint, but persisted to a certain extent from late-gestation to neonate. Nevertheless, the function of these 2 molecules remained to be elucidated.

Here, we examined the roles of VASH1 and VASH2 in the regulation of postnatal angiogenesis in detail. For this purpose, we employed a simple and reproducible model of postnatal angiogenesis in mice. To our surprise, the spatio-temporal expression patterns of VASH1 and VASH2 were distinct, with VASH1 present in ECs where angiogenesis terminated and VASH2 present in bone-marrow derived mononuclear cells (MNCs) at the sprouting front. Furthermore, a loss-of-function experiment using knockout mice, as well as a gain-of-function

experiment using adenovirus-mediated gene transfer showed that VASH1 and VASH2 play distinctive roles in the regulation of angiogenesis.

MATERIALS AND METHODS

A mouse model of hypoxia-mediated subcutaneous angiogenesis

All animal studies were reviewed and approved by the committee for animal study in the Institute of Development, Aging and Cancer at Tohoku University.

A mouse model of subcutaneous angiogenesis was performed in accordance with the method described by Tepper et al.¹⁸ Briefly, after anesthetization; bilateral incisions (2.5 cm in length and 1.25 cm in distance) were made on the dorsal skin of male C57BL/6 mice (Clea, Tokyo, Japan) which penetrated the cutis, dermis, and underlying adipose tissue. A silicon sheet was inserted beneath the flap, and the incisions were closed. In some experiments, adenovirus vector encoding the human VASH1 gene (AdvASH1),¹¹ AdvASH2 or adenoviral vector encoding β -galactosidase gene (AdLacZ) [1×10^9 plaque-forming units (PFU)] was injected via the tail vein.¹⁵ AdvASH2 was prepared in accordance with the method described.¹¹ Seven days after skin surgery, the mice were sacrificed and the skin flaps were collected for histological analyses.

For the detection of hypoxic areas, mice were intravenously injected with pimonidazole (Chemicon International, Temecula, CA, USA) 30 min before collecting the flap. Hypoxic areas were detected with the Hypoxyprobe-1 mAb1 (Chemicon