

201019025A

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

腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移と
がん幹細胞制御法の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 靖史

平成23(2011)年 7月

目 次

| | | |
|--------------------------------------|-------|----|
| I. 総括研究報告 | | |
| 腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移とがん幹細胞制御法の確立に関する研究 | ----- | 1 |
| 佐藤靖史 | | |
| II. 分担研究報告 | | |
| 1. アペリンを用いた腫瘍血管の成熟化に関する研究 | ----- | 3 |
| 高倉伸幸 | | |
| 2. Angpt1を標的とした腫瘍血管新生阻害に関する研究 | ----- | 4 |
| 尾池雄一 | | |
| 3. 腫瘍血管新生に関わるPI3Kの阻害による抗癌剤耐性克服に関する研究 | ----- | 5 |
| 矢野聖二 | | |
| 4. BMP9を標的とした腫瘍血管新生制御に関する研究 | ----- | 7 |
| 渡部徹郎 | | |
| 5. リンパ管新生に関わるLYVE-1のプロセッシングに関する研究 | ----- | 8 |
| 平川聡史 | | |
| 6. 腫瘍脈管系を標的とした網羅的ゲノムネットワーク解析に関する研究 | ----- | 9 |
| 南敬 | | |
| 7. 腫瘍血管の安定化に関する研究 | ----- | 10 |
| 望月直樹 | | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 12 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 17 |

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研究事業）
（総括）研究報告書

腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移とがん幹細胞制御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

当該研究者が発見したvasohibinファミリー分子のvasohibin-1とvasohibin-2について癌との関連について解析した。その結果、特にvasohibin-2は癌細胞に発現し、血管新生を促進して、癌の発育・進展を助長することから、癌治療の新たな分子標的となると考えられた。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名
高倉伸幸・大阪大学 教授
尾池雄一・熊本大学 教授
矢野聖二・金沢大学 教授
渡部徹郎・東京大学 准教授
平川聡史・愛媛大学病院 講師
南 敬・東京大学 准教授
望月直樹・国立循環器病センター研究所 部長

A. 研究目的

本研究の目的は、当該研究者が発見したvasohibinファミリー分子の特性を明らかにし、その成果を基に、本邦発の革新的ながん治療法を確立することである。

B. 研究方法

vasohibinファミリー分子の細胞や癌組織における発現を解析する。vasohibin-2の癌細胞での発現をshorthairpin RNAを用いてノックダウン、あるいはcDNAを安定導入し、癌細胞の特性や血管新生に与える影響を明らかにする。

（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

Vasohibin-1はマウスES細胞が血管を構築する時に発現亢進するが、Vasohibin-2はマウスES細胞出発現が高く、分化とともに減少する。多くの癌細胞はvasohibin-2を発現しており、発癌モデルでは発癌の初期からその発現は上昇する。癌細胞はvasohibin-2発現をノックダウンすると、移植癌の発育と腫瘍血管新生

は顕著に抑制される。

D. 考察

これまでvasohibin-1血管新生抑制因子の治療への応用の可能性を示して来たが、今回vasohibin-2の発現を制御することで抗腫瘍効果が得られたことから、Vasohibin-2が癌治療の新たな分子標的となると考えられる。

E. 結論

Vasohibin-2は多くの癌細胞で発現し、その発現は発癌初期から見られ、腫瘍血管新生促進に寄与しており、癌治療の新たな分子標的候補と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. **Cancer Sci.** 102, 446-51. 2011.(査読有)

Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y. Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. **J. Cell Sci.** 123: 3094-4101, 2010. (査読有)

2. 学会発表

佐藤靖史. 血管新生抑制とがん. 第 69 回日本癌学会学術集会. 大阪, 2010.

嵯峨泰, 高橋詳史, 竹井裕二, 町田静生, 鈴木光明, 佐藤靖史. 血管新生ネガティブフィードバック調節因子バソヒビン-1 による卵巣癌分子標的・遺伝子治療. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 2010.

高橋詳史, 嵯峨泰, 竹井裕二, 町田静生, 鈴木光明, 佐藤靖史. 癌細胞に発現する Vasohibin-2 は血管新生を誘導し腫瘍増殖を促進する. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 2010.

佐藤靖史. A system for the termination of angiogenesis. 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 大阪, 2010.

宮下浩輝, 佐藤靖史. 内皮ストレス耐性における splicing variant vasohibin-1 の意義. 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 大阪, 2010.

林英樹, 宮下浩輝, 鈴木康弘, 小林美穂, 佐藤靖史. Vasohibin は VEGF シグナル遮断による内皮細胞障害を防止する. 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 大阪, 2010.

鈴木康弘, 神吉康晴, 南敬, 佐藤靖史. 転写因子 GATA-2 による Vasohibin-1 遺伝子の発現調節. 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 大阪, 2010.

北原秀治, 森川俊一, 佐藤靖史, 江崎太一. 消化管腫瘍における微小循環系の変化は上皮の悪性化と相関するか? 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 大阪, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし。

アペリンを用いた腫瘍血管の成熟化に関する研究

研究分担者 高倉 伸幸 大阪大学微生物病研究所情報伝達分野教授

研究要旨

APJは内皮細胞に発現する7回膜貫通型のGPCRであり、血管成熟化に関与する。APJリガンドであるアペリンの過剰発現により、腫瘍血管の成熟化と腫瘍免疫効果の同時制御が可能であった。

A. 研究目的

近年、がん組織の血管の正常化を誘導することにより、腫瘍内血管の血管透過性をうまくコントロールして、抗がん剤との併用により治療薬の腫瘍深部への送達ができるような治療法の有効性が示唆されてきている。今回、腫瘍血管の正常化を生理的な因子で誘導が可能であり、がん治療に応用できるか否かを検討することを研究目的とした。

B. 研究方法

Apelinは血管内皮細胞に発現する7回膜貫通型のGPCR、APJのリガンドであり、我々はAPJの活性化が、血管径の拡大化や透過性の抑制など血管成熟化に関わることを明らかにしてきた。今回、apelinを腫瘍細胞に高発現させ腫瘍血管の成熟化が誘導できるか検討した。

（倫理面への配慮）

大阪大学の定める遺伝子組換えに関する取り決めに従い研究を遂行した。

C. 研究結果

Apelinにより腫瘍血管が成熟化し、そのことにより、活性化した樹状細胞を投与した際に、NKT細胞の腫瘍深部への浸潤が可能となり、腫瘍増殖を抑制することが明らかになった。

D. 考察

Apelinは13個のアミノ酸で構成されるペプチドであり、腫瘍への投与方法の開発が必要である。

E. 結論

腫瘍血管の正常化により、抗腫瘍免疫が亢進することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagahama Y et al. PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. **Cancer Res** 70, 1215-1224, 2010.

Nagahama Y, et al. PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. **Biochem Biophys Res Commun**, 392, 150-154, 2010.

他2件

2. 学会発表

Takakura N. Cancer stem cell and their Vascular niche. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日大阪

G. 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

Angptl2を標的とした腫瘍血管新生阻害に関する研究

研究分担者 尾池 雄一 熊本大学大学院教授

研究要旨

当該研究者が発見したアンジオポエチン様因子2（Angptl2）は癌細胞から分泌され、血管・リンパ管新生の促進因子であると同時に、癌細胞自身に作用し走化能、浸潤能を亢進させるオートクライン、パラクライン的に転移を促進する因子であることを明らかにした（投稿準備中）。また、癌細胞におけるAngptl2の発現を抑制したところ癌細胞自身の運動能・浸潤能が抑制され、他臓器への転移も抑制された。これらの結果より、癌細胞のAngptl2を抑制することが癌細胞の悪性度を低下させ転移を抑制することが明らかとなり、Angptl2を標的とした新規治療法開発の可能性が示唆された。

A. 研究目的

癌浸潤転移におけるAngptl2の機能解析

B. 研究方法

siRNA法を用いてAngptl2をノックダウンしたヒト肺癌細胞株（Angptl2 KD）を樹立し、それらの細胞株を免疫不全マウスに移植するマウス担癌モデルを作成し、癌浸潤、転移について解析した。さらに、皮膚ケラチノサイトに特異的にAngptl2を発現するマウス（K14-Angptl2）、Angptl2ノックアウトマウス（Angptl2 KO）を用いて、化学物質誘発皮膚癌モデルを作成し、皮膚癌の浸潤転移、癌周囲の血管・リンパ管新生について検討を行った。

（倫理面への配慮）

動物操作にあたっては、熊本大学実験動物施設の動物実験指針に従って行っている。また基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを使用するにあたって、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律に基づき研究を実施している。

C. 研究結果

Invasionアッセイを用いて、Angptl2 KD細胞株とコントロール株の浸潤能を比較したところ、Angptl2 KD細胞株では浸潤能が低下していた。次に、Angptl2 KD細胞株を、免疫不全マウスの皮下に移植し、肺転移を検討した。Angptl2 KD細胞株はコントロール株と比較して、肺転移が減少しており、担癌マウスの生存期間も延長した。また、腫瘍原発巣における血管浸潤も、Angptl2 KD細胞株では減少していた。次に、K14-Angptl2、Angptl2 KOマウスを用いて、化学物質誘発皮膚癌モデルを作成し、皮膚癌の浸潤転移、癌周囲の血管・リンパ管新生について検討を行った。K14-Angptl2マウスでは、化学物質誘発による皮膚癌がWildマウス

と比較して生じやすくなっており、また肺などの他臓器への転移が多くみられた。一方、Angptl2 KOマウスでは、化学物質誘発による皮膚癌がWildマウスと比較して生じにくくなっており、他臓器への転移も見られなかった。

D. 考察

Angptl2発現癌細胞では、浸潤・転移が促進されるが、逆にAngptl2 KD細胞では、浸潤・転移が抑制されることが明らかとなった。また、K14-Angptl2、Angptl2 KOマウスを用いた解析より、Angptl2は癌の浸潤・転移のみならず、発癌にも関与することが明らかとなり、Angptl2を標的とした新規治療法の開発が有用である可能性が示唆された。

E. 結論

Angptl2は癌細胞の増殖・進展転移に必要な腫瘍血管新生の促進因子であると同時に、癌細胞自身に作用しオートクライン、パラクライン的に転移を促進する因子であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

腫瘍血管新生に関わる PI3K の阻害による抗癌剤耐性克服に関する研究

研究分担者 矢野 聖二 金沢大学がん進展制御研究所・教授

研究要旨

血管新生作用を有する HGF が EGFR 遺伝子変異を有する肺がん細胞の EGFR チロシンキナーゼ阻害薬ゲフィチニブ耐性を誘導することを見出した。そこで HGF の受容体 MET の下流分子である PI3K に着目し、PI3K 阻害薬が HGF によるゲフィチニブ耐性を解除することを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞の EGFR-TKI 感受性における間質細胞が果たす役割を検討した。

B. 研究方法

EGFR 遺伝子変異 (Exon 19 の欠失) を有する肺癌細胞株 (PC-9、HCC827) と線維芽細胞を共培養し、*in vitro* におけるゲフィチニブ感受性を MTT 法で検討した。また *in vivo* における検討として、PC-9 と線維芽細胞をあらかじめ混ぜた後に SCID マウスの皮下に移植し、4 日後からゲフィチニブを連日経口投与し治療効果を評価した。HGF 産生は ELISA 法で測定した。線維芽細胞の遊走能はダブルチャンバー法で検討した。

(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

線維芽細胞株および肺癌患者の腫瘍組織から樹立した初代培養線維芽細胞は種々の濃度の HGF (hepatocyte growth factor) を産生した (図 1)。肺癌細胞株は線維芽細胞の遊走を著明に誘導した。肺癌細胞株 PC-9 と HCC827 はゲフィチニブに高い感受性を示したが、線維芽細胞と共培養することで耐性となった。線維芽細胞によるゲフィチニブ耐性は、抗 HGF 中和抗体や NK4 (HGF の受容体結合阻害物質) により解除された。さらに、PC-9 の皮下腫瘍はゲフィチニブ治療に高い感受性を示したが、線維芽細胞をあらかじめ混ぜて接種するとゲフィチニブ治療によっても縮小せず、耐性化がみられた (図 2)。しかし、抗 HGF 中和抗体や NK4 を併用することで耐性は解除され、腫瘍は著明に縮小した (図 3)。

図 1

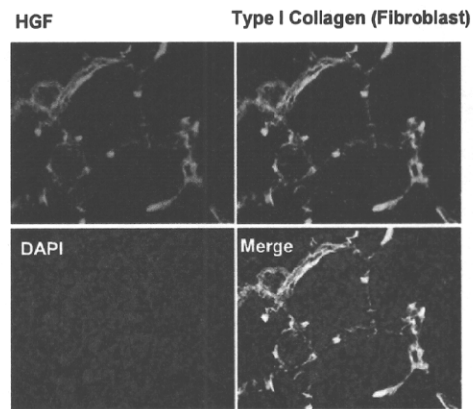


図 2

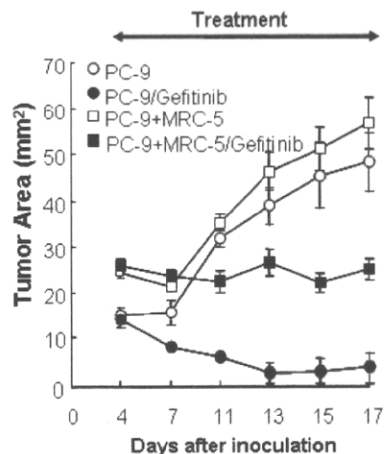
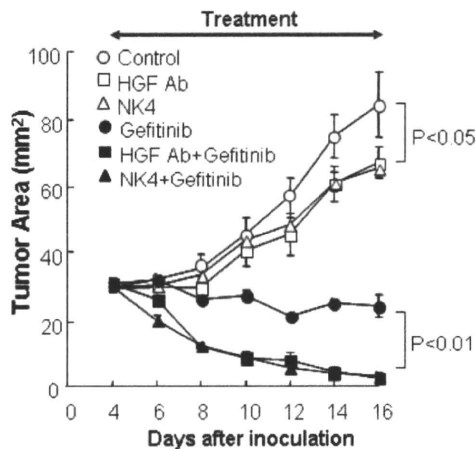


図 3



D. 考察

E. 結論

これらの結果から、線維芽細胞は肺癌細胞により腫瘍局所にリクルートされ種々の濃度のHGFを産生するが、HGFを高産生する場合にはEGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞のEGFR-TKI耐性を誘導することが明らかとなった。宿主間質細胞との相互作用は癌細胞のEGFR-TKI感受性において非常に重要な役割を果たしており、耐性克服の治療標的となることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Donev IS, **Wang W**, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** 2011 Jan 10. [Epub ahead of print] 査読有

2. 学会発表

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 13th Japanese Association for Molecular Target Therapy of Cancer. 第13回日本がん分子標的治療学会. June 24-26, 2009. (Tokushima)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 第18回日本がん転移学会. July 23-24, 2009. (Asahigawa, Hokaido)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors.

2009 Asia-Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine and Fourth Forum of Chinese Young and Middle-aged Oncologists. Oct 24-27, 2009. Xi'An, (CHINA)

Seiji Yano, **Wei Wang, Qi Li, Ivan S. Donev, Shinji Takeuchi, Tadaaki Yamada, Kunio Matsumoto, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone.** Therapeutic effect of HGF inhibitors against HGF-induced EGFR-TKI resistance in lung cancer harboring EGFR mutations. AACR 101st Annual Meeting 2010. April 17-21, 2010. Washington, DC, (USA)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Stromal Fibroblasts Induce Resistance of Lung Cancer to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. April 23-25, 2010. (Kyoto)

Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. Novel gefitinib resistance mechanism and its therapeutic strategy for lung adenocarcinoma with EGF receptor activating mutations. 第19回日本がん転移学会. July 16-17, 2010. (Kanazawa, Ishikawa)

G. 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

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）
（分担）研究報告書

BMP9を標的とした腫瘍血管新生制御に関する研究

研究分担者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨

骨形成因子(BMP)ファミリーの新しいメンバーであるBMP9は血管内皮細胞の増殖を促進することにより、腫瘍血管新生を亢進した。BMP9シグナルは腫瘍血管新生を抑制し、がんの治療を行うための新たな標的となることが期待される。

A. 研究目的

骨形成因子(BMP)ファミリーの新しいメンバーであるBMP9の腫瘍血管新生における役割を検討することにより、がん治療の新たな標的を同定する。

B. 研究方法

胚性幹細胞由来の血管内皮細胞、マトリゲルプラグアッセイならびに膵臓がん細胞マウス皮下移植モデルを用いて、BMP9の血管新生に対する効果を検討した。

（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含まれていない。

C. 研究結果

BMP9は胚性幹細胞由来の血管内皮細胞の増殖を亢進した。さらにマトリゲル内の炎症性血管新生と移植して得られた膵臓がんにおける腫瘍血管新生をBMP9は亢進した。

D. 考察

BMP9はALK1受容体を介してシグナルを伝達するが、ALK1遺伝子は遺伝性出血性毛細血管拡張症の原因遺伝子ということから、BMP9/ALK1シグナルの血管の形成における役割について研究が進んでいた。本研究により、BMP9の腫瘍血管新生における役割が明らかになったことはがん治療法の開発において意義が大きい。

E. 結論

BMP9は血管内皮細胞の増殖を促進することにより、腫瘍血管新生を亢進した。BMP9シグナルは新たながん治療法のための標的として期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., Watabe, T. (2010) BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science* 123,1684-1692.

2. 学会発表

渡部徹郎、鈴木夕佳、吉松康裕、大賀則孝、森下保幸、樋田京子、宮園浩平.
Physiological and pathological roles of BMP-9/ALK-1 signals in the proliferation of endothelial 第18回
日本血管生物医学会（大阪）2010年12月1～3日（シンポジウム）

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

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

リンパ管新生に関わるLYVE-1のプロセッシングに関する研究

研究分担者 平川 聡史 | 愛媛大学医学部附属病院・講師

研究要旨 毛細リンパ管に特異的に発現するヒアルロン酸受容体LYVE-1のプロセッシングを検討し、VEGF-Aによるectodomain sheddingを同定した。このプロセスはVEGFR-2、MAPKを介して、膜表面のADAM17またはADAM10に依存していた。

A. 研究目的

リンパ管新生のプロセスに、リンパ管内皮細胞特異的に発現するヒアルロン酸受容体LYVE-1が関わっていることを同定し、sheddingの分子機構を解明する。

B. 研究方法

アルカリフォスファターゼ/LYVE-1融合蛋白を発現するアデノウイルスを構築し、ヒトリンパ管内皮細胞に感染後、VEGF-Aで刺激した。Shedding効率を培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞で定量した。

（倫理面への配慮）
学内組換えDNA実験委員会の承諾あり。

C. 研究結果

VEGF-A刺激により、LYVE-1のectodomain sheddingが誘導された。このプロセスは、VEGFR-2、MAPキナーゼを介して膜表面のADAM17またはADAM10に依存していた。

D. 考察

リンパ管新生は、がん組織でリンパ管内皮細胞が増殖・遊走する生物像である。リンパ管内皮細胞が遊走するためには、まずcell-cell contactあるいはcell-matrix contactが減弱しなければならない。LYVE-1は、ヒアルロン酸に対する受容体であり、VEGF-Aを始めとする炎症性サイトカインがLYVE-1を切断することにより、リンパ管新生が起きる可能性がある。

E. 結論

LYVE-1は、ectodomain sheddingを受ける。このプロセスは、癌組織でリンパ管新生が起きる際、リンパ管内皮細胞が膜蛋白を消化する合目的な生物像である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirakawa S. Regulation of pathological lymphangiogenesis requires factors distinct from those governing physiological lymphangiogenesis. *J Dermatol Sci*. 2011; 61:85-93.

2. 学会発表

平川聡史 東山繁樹 VEGF-A induces the ectodomain shedding of LYVE-1 via MAPK pathway in cultured lymphatic endothelial cells 第69回日本癌学会学術総会平成22年9月22-24日

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

国立大学法人愛媛大学発明等
届出書番号：22-048
発明等の名称：皮膚モデル組織の構築方法

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

腫瘍脈管系を標的とした網羅的ゲノムネットワーク解析に関する研究

研究分担者 南 敬

研究要旨：がん微小環境での活性化血管内皮細胞変動を網羅探索し、活性中心候補である NFAT のChIP-seq から NFAT 依存性の Angiopoietin-2 の誘導機構を見出し、DSCR-1 欠損では特に NFAT 活性化が強くなるために、肺がん転移が促進する。

A. 研究目的

がん微小環境下、活性化される血管内皮細胞での発現変動を網羅探索し、活性中心となる転写因子やエピゲノム変化、さらには顕著な誘導因子である DSCR-1 の抗がん活性を解明する。

B. 研究方法

ゲノムワイドな転写解析にはヒト由来の臍帯静脈内皮細胞や皮膚微小血管内皮細胞を用い、RNA からの発現アレイや転写因子、ヒストン修飾因子での抗体を用いた ChIP-seq を先端研にて固定された手法でもって解析する。DSCR-1 機能解析には本因子の欠損マウスや内皮特異的 transgenic マウス、promoter knock-in マウスを用いて行う。

（倫理面への配慮）

ヒト内皮細胞は市販されているもので、特定の個人に由来するものではなく、倫理上の問題は発生しない。またマウスでのがん転移実験は東京大学で規定された動物実験指針にのっとり、解析を行っている。

C. 研究結果

NFAT による内皮活性化の阻害作用を有するダウン症因子 (DSCR)-1 の欠損マウスにおいて、がんの肺転移が迅速に進行すること、その一因として Angiopoietin-2 が DSCR-1 欠損にて高発現していることを見出し、soluble Tie2 の投与によってがん転移の促進効果が完全に中和されることを明らかにした。さらに、DSCR-1 の転写誘導の中心的役割を解明した。

D. 考察

DSCR-1 欠損マウスでは NFAT シグナルが入りすぎる傾向がある。これは knock out由来の肺から単離した血管内皮細胞の性質や NFAT 依存性の luciferase アッセイでも裏付けられている。そのため、NFAT によって誘導される Angiopoietin-2 を始め、VCAM-1 や E-selectin の発現が肺微小環境でもともと高く、より転移しやすいことが示唆される。

E. 結論

NFAT の活性化によって Angiopoietin 2 が転写誘導され、がん転移が促進した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suehiro, J., Hamakubo, T., Kodama, T., Aird, W.C, and Minami, T. (2010). *Blood* **115**:2520-32

Tozawa, H., Kanki, Y., Suehiro, J.I., Aird, W.C. Kodama, T., and Minami, T (2011) *Mol.Cell.Biol.* **31**.2196-209

2. 学会発表

Takashi Minami, UCLA, June 20-24, 2010, 16th International Vascular Biology Meeting 一般講演

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: 現在なし
2. 実用新案登録
3. その他

腫瘍血管の安定化に関する研究

研究分担者 望月直樹 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨：経血管的に抗癌薬の癌への効果的な到達には、癌血管の脆弱性が問題となっている。新生血管の安定化を目指した治療が考えられ、我々も如何に血管安定化が制御されているかを検討した。血管安定化因子のAngiopoietin-1がDelta-Notchを介して細胞間接着の安定化を調節することを突き止めた。

A. 研究目的

腫瘍血管は、血管の脆弱性のために抗癌薬が血流にしたがって腫瘍まで到達しないという弱点がある。また、リンパ管内皮への腫瘍の浸潤が容易に起きやすくするリンパ管の細胞情報伝達系によりリンパ節転移が容易に生じることも臨床的には特に問題となっている。本研究では、血管内皮細胞の透過性調節機構と内皮細胞の安定化機構を解明する。さらに腫瘍血管安定化による癌治療の至適化を目指した向血管薬の開発に資する研究を目指す。

B. 研究方法と材料

・血管内皮細胞培養

HUMEDIA-EG2（クラボウ）培養液で、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVECs）を維持してこれを使用した。

・ゼブラフィッシュの血管可視化を行うためのトランスジェニックフィッシュの維持は、研究所内の小型魚類飼育室で行った。血管内皮細胞特異的にEGFPを発現するトランスジェニックフィッシュ Tg (Flil:EGFP)による血管の発生・可視化は共焦点レーザー顕微鏡(Olympus, FV-1000)を用いて行った。

(1)Angiopoietin-1による血管内皮細胞安定化機構の解明—血管内皮細胞を細胞間接着の有無の条件で培養し、Angiopoietin-1による刺激依存性に活性が上昇あるいは、転写が増加する分子に着目して実験を行った。

(2)血管の可視化

受精卵に Tie2 モルフォリーノや、情報伝達系の分子のモルフォリーノを顕微注入して、その効果を Tg (Flil:EGFP) で血管を観察することにより検討した。

(3) 通常の分子生物学的実験に用いた試薬類、抗体はこれまでのAngiopoietin-1/Tie2の研究に用いたものと同様に行った。

(4) 血管内皮細胞の3次元培養により、血管新生を培養条件で誘導し、angiopoietin-1の刺激の有無によって血管新生への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト臨床サンプルは用いていない。ゼブラフィッシュを用いた動物実験は、遺伝子組換え実験の申請を行い(承認番号10-14)、動物実験も動物実験委員会への申請が受理された(10070)後に行った。国立循環器病研究センターの動物取扱の規則を順守し、愛護的に実験を行った。

C. 研究結果

(1) Angiopoietin-1はDil4の発現を増加させる。

HUVECsを細胞間接着が密の状態に培養して遺伝子発現をmicroDNAアレイで調べたところ、培養条件が疎の時には認めないDil4の発現上昇が顕著に認められた。Reverse transcription-PCR法によってもDil4の発現増加を確認できた。また、anti-Dil4抗体を用いて発現確認を行ったところ時間経過依存性に発現量が増加することも確認できた。Angiopoietin-1投与後2-4時間をピークに発現が増えることがわかった。

(2) Dil4の発現は細胞間接着依存性である。

Angiopoietin-1によるDil4の発現増加は、細胞間接着がないときには認められないこと、またDil4のノックダウンによってもDil4の発現が認められないことから

Dll4 の発現には Dll4-Notch 系が必須であることも突き止めた。

(3) Dll4 の生体での意義

Dll4 の発現をゼブラフィッシュで抑制すると Fli1:EGFP で血管を可視化すると走行異常（分枝数の増加と DLAV 形成の異常）を認めた。Dll4 が細胞間接着の安定化、血管の成熟過程に重要であることがわかった。

(4) Angiopoietin-1 は Dll4 を介してコラーゲン Type IV の発現を増加させる。

3次元の血管新生システムで血管新生を観察しさらに、anti-コラーゲン I V 抗体で染色をしたところ、Angiopoietin-1 が存在していると血管周囲のコラーゲンの増加が観察された。

D. 考察

Angiopoietin-1/Tie2 の血管安定化機構として、Dll4-Notch 系の重要性を突き止めた。以前から Dll4-Notch は血管透過性を上げる VEGFR2 受容体の発現を抑制することが知られていた。今回これに加えて Dll4-Notch 系がコラーゲン Type IV の発現を増加させることで、内皮細胞と細胞外基質の接着増加による血管の安定化をもたらす可能性が考えられた。

ゼブラフィッシュを用いた安定化の観察によっても Dll4 の発現抑制が節間血管の分枝の増加を引き起こすことから Dll4-Notch 系の血管安定化での重要性が確認できた。腫瘍血管での VEGF による透過性の増加が抗腫瘍薬の腫瘍への到達を減弱していることを考えると Angiopoietin-1 による腫瘍血管の安定化は抗腫瘍薬のデリバリーを促進させる可能性が示唆された。これはマウスの腫瘍移植モデルなどで、抗腫瘍薬の効果を Angiopoietin-1 の有無により検討可能である。

E. 結論

血管内皮細胞の安定化機構で Angiopoietin-1/Tie2 系が Dll4-Notch 系を活性化することが重要であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Zhang J, Fukuhara S, Sako K, Takenouchi T, Kitani H, Kume T, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 Signal Augments Basal Notch Signal Controlling Vascular Quiescence by Inducing Delta-Like 4 Expression through AKT-mediated Activation of β -Catenin. **J. Biol. Chem.** 286; 8055-8066, 2011

Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. **Histol Histopathol.** 25: 387-396, 2010

2. 学会発表

Mochizuki N, Fukuhara S. Angiopoietin-Tie2 signal-mediated vascular maturation and quiescence are regulated by Dll4-Notch signaling. 6th International Kloster Seeon Meeting Angiogenesis. Kloster Seeon, Germany September 18-21, 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
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

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 |
|-----------|---|-------------------|--|---------|-----|------|-------------|
| 平川聡史 | リンパ管新生とリンパ節転移 | 丸 義朗 | がん転移 | 秀潤社 | 東京 | 2010 | 214-218 |
| Minami, T | Down syndrome expressed protein; DSCR-1 deters cancer and septic inflammation | Prof. Subrata Dey | Genetics and Etiology of Down Syndrome | In Tech | EU | 2011 | In printing |
| | | | | | | | |

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 |
|---|--|-----------------|-----|-----------|------|
| Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y | Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. | J. Cell Sci. | 123 | 3094-3101 | 2010 |
| Sato, Y | The vasohibin family. | Pharmaceuticals | 3 | 433-440 | 2011 |
| Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y | Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. | Cancer Sci. | 102 | 446-451 | 2011 |
| Miyashita H, Suzuki H, Ohkuchi A, Sato Y | Mutual balance between vasohibin-1 and soluble VEGFR-1 in endothelial cells. | Pharmaceuticals | 4 | 782-793 | 2011 |
| Sato, Y | Is Vasohibin-1 for more than angiogenesis inhibition? | J. Biochem. | 149 | 229-230 | 2011 |
| Sato Y | Persistent vascular normalization as an alternative goal of anti-angiogenic cancer therapy. | Cancer Sci. | 102 | 1253-1256 | 2011 |
| Nakahara I et al | Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells. | Genes Cells | 15 | 1015-1024 | 2010 |
| Murakami A et al | Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. | Mol Pharmacol | 77 | 704-713 | 2010 |

| | | | | | |
|--|---|----------------------------|-------|-----------|------|
| Nagahama Y et al | PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. | Biochem Biophys Res Commun | 392 | 150-154 | 2010 |
| Nagahama Y et al | PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. | Cancer Res | 70 | 1215-1224 | 2010 |
| Sakaguchi S, Goto H, Hanibuchi M, Otsuka S, Ogino H, Kakiuchi S, Uehara H, Yano S, Nishioka Y, Sone S | Gender difference in bone metastasis of human small cell lung cancer, SBC-5 cells in natural killer-cell depleted severe combined immunodeficient mice. | Clin Exp Metastasis | 27 | 351-359 | 2010 |
| Yamada T, Ohtsubo K, Izumi K, Takeuchi S, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, Ghenev P, Kitagawa S, Yano S | Metastatic renal cell carcinoma complicated with diffuse alveolar hemorrhage: a rare adverse effect of sunitinib. | Int J Clin Oncol | 15 | 638-641 | 2010 |
| Izumi K, Narimoto K, Sugimoto K, Kobori Y, Maeda Y, Mizokami A, Koh E, Yamada T, Yano S, Namiki M | The role of percutaneous needle biopsy in differentiation of renal tumors. | Jpn J Clin Oncol | 40 | 1081-1086 | 2010 |
| Tanaka S, Nakada M, Hayashi Y, Nakada S, Kitamura-Sawada S, Furuyama N, Suzuki T, Kamide T, Hayashi Y, Yano S, Hamada JI | Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma -the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence -. | Brain Tumor Pathol | 28(1) | 59-64 | 2011 |

| | | | | | |
|--|--|-----------------|--------|-----------|------|
| Kanematsu T, Hanibuchi M, Tomimoto H, Sakiyakma S, Kenzaki K, Kondo K, Bando H, Haku T, Yoneda K, Hirose T, Toyoda Y, Goto H, Sakaguchi S, Kinoshita K, Azuma M, Kakiuchi S, Kishi J, Azuma M, Tada H, Sumitomo M, Nishioka Y, Yano S, Sone S | Epidemiological and clinical features of lung cancer patients from 1999 to 2009 in Tokushima Prefecture of Japan. | J Med Invest | 57 | 326-333 | 2010 |
| Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K | Reaction of plasma hepatocyte growth factor level in lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. | Int J Cancer | Feb 24 | | 2011 |
| Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S | Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. | Clin Cancer Res | 17 | 2260-2269 | 2011 |
| Shiirevnyamba A, Takahashi T, Shan H, Ogawa H, Yano S, Kanayama H, Izumi K, Uehara H. | Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. | Br J Cancer | 104 | 505-13 | 2011 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------------|----------|-----------|------|
| Tomimoto H, Hanibuchi M, Ogushi F, Okano Y, Shinohara T, Doi H, Yamamoto A, Takeuchi E, Yamamoto A, Azuma M, Tada H, Kanematsu T, Kakiuchi S, Goto H, Yano S, Nishioka Y, Sone S | A multi-institutional phase II study of combination chemotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. | Oncology Letter | March 10 | | 2011 |
| Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Tacheuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K, Yano S. | The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXCR4-expressing gastric cancer. | Clin Cancer Res | 17 | 3619-30 | 2011 |
| Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung Van The, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, Sone S. | E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. | Mol Cancer Ther | 10(7) | 1218-28 | 2011 |
| Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yano S. | Pleural mesothelioma instigates tumor associated fibroblasts to promote progression via malignant cytokine network. | Am J Pathol | in press | | |
| Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., Watabe, T | BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. | Journal of Cell Science | 123 | 1684-1692 | 2010 |
| Hirakawa S | Regulation of pathological lymphangiogenesis. | J Dermatol Sci | 61 | 85-93 | 2011 |
| Hirakawa et al. | Multiple lymphadenopathy. | Br J Dermatol | 164 | 200-203 | 2011 |

| | | | | | |
|---|---|------------------------|-----|-----------|------|
| Hirakawa et al. | Possible association of VEGF in DIHS. | J Dermatol | 38 | 292-294 | 2011 |
| Tozawa, H., Kanki, Y., Suehiro, J.I., Tsutsumi, S., Kohro, T., Aburatani ,H., Aird, W.C., Kodama, T., Minami, T | Genome-wide approaches reveal functional IL-4 inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule-1 promoter. | <i>Mol Cell Biol.</i> | 31 | 2196-2209 | 2011 |
| Shioyama, W., Nakaoka, Y., Higuchi, K., Minami, T., Taniyama, Y., Nishida, K., Kidoya, H., Sonobe, T., Naito, H., Arita, Y., Hashimoto, T., Kuroda, T., Fujio, Y., Shirai, M., Takakura, N., Morishita, R., Yamauchi- Takahara, K., Kodama, T., Hirano, T., Mochizuki, N., Komuro, I | Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling. | <i>Circ. Res.</i> | 108 | 664-75. | 2011 |
| Suehiro, J., Hamakubo, T., Kodama, T., Aird, W.C, Minami, T | Vascular endothelial growth factor activation of endothelial cells is mediated by early growth response-3. | <i>Blood</i> | 115 | 2520-32 | 2010 |
| Zhang J, Fukuhara S, Sako K, Takenouchi T, Kitani H, Kume T, Koh GY, Mochizuki N | Angiopoietin-1/Tie2 Signal Augments Basal Notch Signal Controlling Vascular Quiescence by Inducing Delta-Like 4 Expression through AKT-mediated Activation of β -Catenin. | J. Biol. Chem. | 286 | 8055-8066 | 2011 |
| Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N | Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. | Histol Histopathol. | 25 | 387-396 | 2010 |

Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion

Yasuhiro Suzuki¹, Miho Kobayashi¹, Hiroki Miyashita¹, Hideki Ohta², Hikaru Sonoda² and Yasufumi Sato^{1,*}

¹Department of Vascular Biology, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

²Discovery Research Laboratories, Shionogi and Company Limited, Osaka 567-0085, Japan

*Author for correspondence (y-sato@idac.tohoku.ac.jp)

Accepted 31 May 2010

Journal of Cell Science 123, 3094–3101

© 2010. Published by The Company of Biologists Ltd

doi:10.1242/jcs.067538

Summary

Upon stimulation with angiogenic factors, vascular endothelial cells (ECs) secrete a negative-feedback regulator of angiogenesis, vasohibin-1 (VASH1). Because VASH1 lacks a classical signal sequence, it is not clear how ECs secrete VASH1. We isolated a small vasohibin-binding protein (SVBP) composed of 66 amino acids. The level of *Svbp* mRNA was relatively high in the bone marrow, spleen and testes of mice. In cultured ECs, *Vash1* mRNA was induced by VEGF, and *Svbp* mRNA was expressed constitutively. The interaction between VASH1 and SVBP was confirmed using the BIAcore system and immunoprecipitation analysis. Immunocytochemical analysis revealed that SVBP colocalized with VASH1 in ECs. In polarized epithelial cells, SVBP accumulated on the apical side, whereas VASH1 was present throughout the cells and partially colocalized with SVBP. Transfection of SVBP enhanced VASH1 secretion, whereas knockdown of endogenous SVBP markedly reduced VASH1 secretion. SVBP increased the solubility of VASH1 protein in detergent solution and inhibited the ubiquitylation of VASH1 protein. Moreover, co-transfection of SVBP significantly augmented the inhibitory effect of VASH1 on EC migration. These results indicate that SVBP acts as a secretory chaperone for VASH1 and contributes to the anti-angiogenic activity of VASH1.

Key words: Vasohibin, Secretion, Angiogenesis, Molecular chaperon, Ubiquitylation, Endothelial cell

Introduction

Angiogenesis is essential for physiological events, such as development, reproduction, and wound healing. It is also involved in various pathological processes, including tumor growth and ischemic retinopathy (Carmeliet, 2003). Angiogenesis is tightly regulated by stimulators, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2); angiogenesis inhibitors, such as angiostatin, endostatin and thrombospondin-1; and factors that modulate vascular maturation, such as angiopoietin-1 and transforming growth factor- β (Kerbel, 2008; Sato, 2006). Recently, ECs were shown to produce factors that regulate angiogenesis in an autocrine manner. The expression of Delta-like 4 and its cognate receptor Notch1 are detected mainly in tip cells and stalk cells, respectively, and contribute to their regulation during sprouting angiogenesis (Hellstrom et al., 2007; Leslie et al., 2007; Siekmann and Lawson, 2007).

We previously isolated the angiogenesis inhibitor, vasohibin-1 (VASH1), which is produced and secreted by vascular ECs upon stimulation by VEGF and FGF-2 (Hosaka et al., 2009; Kimura et al., 2009; Nasu et al., 2009; Sato et al., 2009; Sato and Sonoda, 2007; Shibuya et al., 2006; Shimizu et al., 2005; Tamaki et al., 2009; Wakusawa et al., 2008; Watanabe et al., 2004; Yamashita et al., 2006; Yoshinaga et al., 2008). VASH1 regulates EC proliferation and migration in an autocrine manner by acting as a negative-feedback regulator of angiogenesis. Purified VASH1 protein has been shown to inhibit the migration and network formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in vitro. The administration of exogenous VASH1 strongly inhibits pathological and physiological angiogenesis without any significant side effects (Hosaka et al., 2009; Kimura et al., 2009; Shen et al., 2006;

Watanabe et al., 2004; Yamashita et al., 2006). Most recently, we showed that VASH1 exhibits anti-lymphangiogenic activity and inhibits lymph node metastasis (Heishi et al., 2010). We also isolated VASH2, a homologue of VASH1 that displays more than 50% amino acid similarity to VASH1 (Kimura et al., 2009; Sato and Sonoda, 2007; Shibuya et al., 2006).

VASH1 protein is post-translationally processed into several truncated forms in ECs (Sato and Sonoda, 2007; Sonoda et al., 2006). Each VASH1 protein has at least two proteolytic cleavage sites in each terminus. Biochemical and functional analyses of VASH1 have revealed that some basic residues at the C-terminus are important for heparin binding and anti-angiogenic activity.

To elucidate the biological functions of VASH1 in detail, clarification of how newly synthesized VASH1 is secreted from ECs and acts on ECs is necessary. However, VASH1 protein does not contain a classical signal sequence typical of secreted proteins (Hegde and Kang, 2008). Also, it does not colocalize with the endoplasmic reticulum (ER) marker calnexin, suggesting that VASH1 might be transported and released into the extracellular space via an unconventional secretory pathway (Watanabe et al., 2004). In the present study, we characterized a VASH1 binding partner, which we designated small vasohibin-binding protein (SVBP), and determined a unique chaperone-like function for regulating VASH1 secretion.

Results

Isolation of the VASH1 binding factor

We performed yeast two-hybrid analysis to isolate potential VASH1 binding partner(s). Four strongly positive clones were obtained, each encoding hypothetical protein LOC374969 cDNA. This

hypothetical protein is also registered as coiled-coil domain containing 23 (CCDC23; GenBank accession number NP_955374). Because the protein is composed of only 66 amino acids, we named it small vasohibin-binding protein (SVBP). SVBP is highly conserved among mammals, and the amino acids corresponding to residues 32–52 are predicted to form a coiled-coil structure (Fig. 1A). Similarly to VASH1 and VASH2, SVBP does not have any classical signal sequences in the N-terminal region. We prepared recombinant human VASH1 (Watanabe et al., 2004), human VASH2 (Shibuya et al., 2006) and human SVBP proteins (Fig. 1B) and examined their direct interaction using the BIAcore system. SVBP bound strongly to VASH1 ($K_D=3.1 \times 10^{-8}$ M; Fig. 1C). We found that SVBP also bound to the VASH1 homologue, VASH2 ($K_D=8.7 \times 10^{-8}$ M; Fig. 1D).

Expression of *Svbp* mRNA in various organs and ECs

Because SVBP is a hypothetical protein, we performed Northern blot analysis to determine whether *Svbp* mRNA was actually expressed. The mouse EC line MS1 expressed a possible band of *Svbp* mRNA, and the intensity of this band was reduced by three different specific siRNAs (Fig. 2A). We also detected the expression of *Svbp* mRNA in various mouse organs (Fig. 2B). *Svbp* mRNA expression was especially high in the bone marrow, spleen and testes. We then evaluated changes in the expression of VASH1 and SVBP in ECs upon VEGF stimulation. As shown in Fig. 2C, a low level of *Vash1* mRNA was expressed under basal conditions, and it was induced by VEGF stimulation, as previously reported (Shimizu et al., 2005; Watanabe et al., 2004). By contrast, a high level of *Svbp* mRNA was expressed, even under basal conditions. These results, together with the steady state expression of SVBP in various organs, suggest that *Svbp* mRNA is expressed constitutively.

Interaction of SVBP and VASH1 in cultured ECs

We prepared mouse monoclonal antibodies against SVBP peptides (Asp2–Lys13). One of antibodies was able to detect recombinant SVBP protein by western blotting (Fig. 1B). Using this antibody, we tried to detect SVBP protein transiently expressed in MS1 cells. As shown in Fig. 3A, SVBP was detected in both the conditioned medium (CM) and cell lysate. The amount of SVBP in the CM was gradually increased in a time-dependent manner, implying that SVBP is constantly secreted in the medium. To characterize the interaction between VASH1 and SVBP, we performed co-

immunoprecipitation followed by western blotting. Endogenous VASH1 was co-immunoprecipitated from both cell lysate and CM by the anti-SVBP antibody (Fig. 3B). We previously reported that the full-length VASH1 protein (44 kDa) is post-translationally truncated, resulting in at least three smaller forms (42 kDa, 36 kDa and 27 kDa) (Sonoda et al., 2006). Western blot analysis revealed that the 42 kDa protein was mainly detected in the cell lysate, whereas the 36 kDa and 27 kDa forms were detected in the CM, and all forms were co-immunoprecipitated with anti-SVBP antibody (Fig. 3B). We obtained similar results using MS1 cells transiently transfected with VASH1 and SVBP expression vectors (data not shown). Using the BIAcore system, we confirmed that SVBP bound to the 36 kDa (77–365) and 27 kDa (77–318) VASH1 proteins (Fig. 3C,D). We previously reported that proteolytic cleavage near Arg29 and Arg76 of VASH1 generates the two major forms of VASH1 (42 kDa and 36 kDa, respectively), and the subsequent proteolytic cleavage removing most of the basic region at the C-terminus generates the 27 kDa protein (Sonoda et al., 2006; Watanabe et al., 2004). These results suggest that de novo produced VASH1 and SVBP interact within cells and are secreted together, and this interaction might persist during the post-translational processing of VASH1.

Colocalization of SVBP and VASH1

Next, we transiently transfected human *VASH1* and *SVBP* cDNAs into MS1 cells and performed immunocytochemical analysis. The intracellular localization of VASH1 and SVBP was determined by immunostaining with VASH1- or SVBP-specific antibodies. SVBP partly colocalized with VASH1 within the cells (Fig. 4A). To further prove that the interaction between SVBP and VASH1 occurs inside the cell, we performed a Duolink in situ proximity ligation assay (PLA). This assay can detect protein–protein interactions using a combination of specific antibodies against them (Yamazaki et al., 2009). As shown in Fig. 4B, positive signals (red) were clearly observed by the treatment with both anti-VASH1 antibody and anti-Flag antibody (panel d), whereas there were no positive signals by the treatment with other combinations (panels a–c), indicating that SVBP and VASH1 do interact within a cell. Because ECs overlap each other in their peripheral cellular region when they are confluent and form a thin cellular sheet, it is very difficult to analyze the polarity as well as the subcellular localization of proteins within cells. Therefore, we used a polarized epithelial cell line (MDCK cells) as a model to observe the subcellular localization

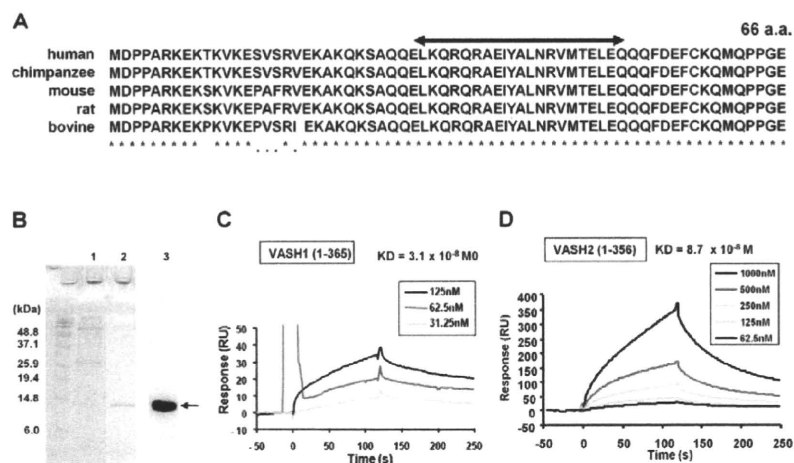


Fig. 1. Amino acid sequence of SVBP and physical interactions between SVBP and VASH1. (A) The SVBP protein is highly conserved among mammals. Asterisks and dots indicate identical and similar amino acids, respectively. The arrow indicates the putative coiled-coil domain. (B) Preparation of recombinant SVBP-Flag protein. SVBP-Flag protein was produced by a baculovirus system. The protein was purified by affinity chromatography using anti-FLAG antibody. 10 μ l crude lysate (lane 1) and eluted sample from the column (lane 2) were subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue staining. It was also confirmed that the purified recombinant protein could react with mouse monoclonal anti-SVBP antibody (lane 3). An arrow indicates SVBP-Flag. (C,D) Kinetic analysis of the direct binding of SVBP and VASH1 or VASH2 using the BIAcore system.