

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21394

研究課題名(和文) 内皮細胞における内皮間葉分化転換の調節シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the signals that regulate endothelial-to-mesenchymal transition

研究代表者

吉松 康裕 (Yoshimatsu, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60586684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、まず内皮間葉分化転換(EndMT)が起きた細胞を検出することが可能なEndMTモニターマウスの樹立に成功した。さらにこのマウスから内皮細胞を単離し、EndMTの細胞レベルでの解析に用いることができることを見出した。また一方で、Transforming growth factor- α の刺激によってEndMTが起こる際にEndMTを調節しているシグナルとして、腫瘍壊死因子や線維芽細胞増殖因子、さらに骨形成因子などを同定した。さらにこれらのシグナルの下流で機能している分子の役割についても明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a line of mice in which endothelial and mesenchymal cells become labeled by red and green fluorescent proteins, respectively. Using these mice, endothelial cells which have undergone endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) can be specifically detectable. In addition, we developed a method of isolating endothelial cells from the mice and the isolated cells can be subject to in vitro analyses of EndMT. We successfully identified multiple types of signals regulating EndMT, such as ones mediated by tumor necrosis factor alpha, fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein. Furthermore, we clarified a molecular mechanism by which their downstream pathways are regulated during the EndMT.

研究分野：血管生物学・リンパ管生物学

キーワード：内皮細胞 間葉系細胞 内皮間葉分化転換 EndMT 線維芽細胞増殖因子 腫瘍壊死因子 骨形成因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 先進諸国の死因上位に挙げられるがんや心疾患において間質細胞が重要な役割を果たすことが明らかにされている。がん組織の微小環境は正常組織とは異なる線維芽細胞、炎症関連細胞、血管内皮細胞などにより、さらにこうした細胞が産生する様々な基質により構成されており、特に腫瘍関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast: CAF)はがん細胞の増殖や遊走などを調節する因子を分泌することによって、がんの悪性を誘導することが示されている。また心疾患に伴って集積する線維芽細胞が細胞外基質を過剰産生することにより心臓の線維化の原因となっている。近年こうした間質細胞のおよそ3割が血管内皮細胞由来であることがマウス個体を用いたモデルにより示されており(Zeisberg et al., 2007)、今後こうした間質細胞の形成機構の解明により治療法の開発につながることを期待される。

(2) 申請者らはマウス ES 細胞由来の血管内皮細胞が transforming growth factor (TGF) - β の添加により、間葉細胞へと分化することを発見した(Kokudo et al., 2008)。その際、内皮細胞マーカー-claudin-5 の発現が低下し、間葉系細胞マーカー-Smooth Muscle Actin (SMA) の発現が上昇した。また TGF- β の受容体の阻害剤により内因性の TGF- β シグナルを抑制すると、この EndMT は阻害された。さらにこの EndMT においては上皮間葉分化転換の関連転写因子である Snail の発現が必要であった。我々は脾臓由来の血管内皮細胞でも TGF- β より EndMT が誘導されること、MRTF-A が発現誘導され間葉系マーカーの発現誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Mihira et al., 2012)。申請者らはさらに複数の初代内皮培養細胞でも同様に TGF- β が EndMT を誘導することを見出していた。以上の結果に加え、複数のグループか

ら TGF- β が様々な血管内皮細胞において EndMT を引き起こしていることが示されており、TGF- β が EndMT の代表的な誘導因子であることが明らかにされている。

(3) Activin receptor-like kinase 1 (ALK-1)は元々TGF- β の受容体として発見されたが、近年非常に親和性の高いリガンドとして骨形成因子 BMP-9/10 が同定され、複数のグループにより血管形成に必須であることが示された。また申請者らはリンパ管内皮形成における機能について解析し、リンパ管内皮形成に抑制的に働いていることを示した(Yoshimatsu et al., 2013)。以上から、内皮細胞における BMP シグナルの重要性が明らかにされつつあるが、BMP が EndMT に対して何らかの役割を果たしているかどうかについては未解明であり、さらに TGF- β によって誘導される EndMT を調節する因子については未解明の部分が多く残されていた。

(4) 申請者らは EndMT を誘導する代表的なサイトカインとして TGF- β に注目し、EndMT を引き起こす分子機構を明らかにし、さらにこの EndMT を調節する因子として FGF-2 および TNF- α を見出していた。両者は血管形成や血管の病態の発症に関連するものであったことから、他にもこのような因子が EndMT に関与する可能性が高いと考え、申請者は先述のように血管形成の調節シグナルとして、これらの因子に加えて BMP シグナルにも注目して解析を進めることにした。

2. 研究の目的

(1) がんなどの病態において、EndMT がその悪性化に関与することが示唆されているので、成体のマウスを用いた個体レベルの解析により、実際に EndMT が起こるかどうかについて解析するため、内皮細胞および間葉系細胞をそれぞれ異なる蛍光タンパク質でラベル

するというシステムにより EndMT を個体レベルで検出できるマウス(以下、EndMT モニターマウスと称する)の作製を試みる。

(2) 上記で作製されたマウスにおける内皮細胞が EndMT を起こすかについて、内皮細胞を単離して、リアルタイムでの EndMT の観察を試み、解析することで実証する。

(3) 上記で作製されたマウスを用いて、がんの病態モデルに応用し、EndMT の発生について観察する。

(4) TGF- β によって EndMT を引き起こす際に、これを調節するシグナルの解明を試みる。さらにこれらがどのようにして、EndMT を調節しているのかについて分子メカニズムの解明を行う。

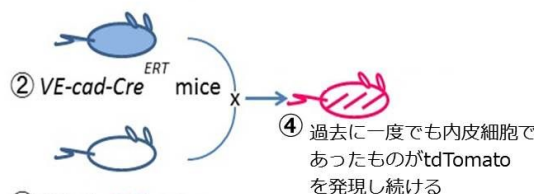
(5) 上記のシグナルが同定されたら、EndMT モニターマウスの病態モデル(がん細胞の移植モデル)において、これらのシグナルを調節して、EndMT の発生率の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 成体のマウスを用いた個体レベルの解析により、実際に生体内で EndMT が起こるかについて明らかにするため、図のように、内皮細胞および間葉系細胞をそれぞれ異なる蛍光タンパク質でラベルするというシステムを用いて、マウスにより EndMT を個体レベルで検出できるマウス(EndMT モニターマウス)の作製を行う。具体的には、一度でも過去に内皮細胞であった(内皮細胞マーカー VE-cadherin を発現したことがある)「履歴」を、Tamoxifen によって赤色蛍光タンパク質(tdTomato)の発現を誘導することでラベルできるので、間葉系細胞になっている細胞を間葉系細胞マーカー Smooth Muscle α -Actin のプロモーターによって緑色蛍光タンパク質

(GFP)でラベルする。以上の系統のマウスの掛け合わせ(図のと)により、「過去に内皮細胞であったものが間葉系細胞になったこと」を検出できる EndMT モニターマウスが完成する。

① *R26Rosa-lox-Stop-lox-tdTomato* mice



③ *SMaA-GFP* mice

間葉系マーカーSMaAを発現する細胞がGFPを発現する

(図. EndMT モニターマウス)

(2) 上記のマウスから、内皮細胞を単離する。内皮細胞マーカーである VE-cadherin などの抗体によるセルソーティングを行う。また、予め Tamoxifen を投与しておけば、赤色でセルソーティングが可能である。この細胞に培養ディッシュ上で TGF- β を添加したときに EndMT を起こす様子を、タイムラプス観察が可能な蛍光顕微鏡を用いて、リアルタイムイメージングにより観察する。

(3) 上記マウスにがん細胞を移植することにより、がんにおける EndMT の発生を観察する。具体的には形成された腫瘍組織を回収して、切片を作製して、赤色タンパク質と緑色タンパク質でラベルされた細胞群および両者共に発現する細胞群について発生率や発生の特徴を解析する。

(4) EndMT と幾つか共通の機構を持つとされている上皮間葉分化転換におけるシグナルなどを参考にしながら、EndMT を調節するシグナルを探索する。具体的にはサイトカインなどの液性因子を添加して、TGF- β によって誘導される EndMT を調節するかを検討する。さらに調節したシグナルについては調節する作用点をそれぞれのシグナル分子に着

目しながら明らかにする。

(5) 上記で同定されたシグナルのサイトカインなどを、EndMT モニターマウスを用いた病態モデル（がん細胞移植モデル）に投与、またはその阻害剤を投与し、EndMT の発生率に影響があるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 交配によってできた EndMT モニターマウスは Tamoxifen を投与して血管を観察すると、内皮細胞は赤色でラベルされ、内皮細胞を被覆している血管平滑筋細胞は緑色にラベルされており、細胞レベルでは両者は一致していないものの、マクロ的には両者を発現しているように観察され、平滑筋細胞で被覆された血管は黄色でラベルされた。これにより EndMT マウスが樹立できた。

このマウスは EndMT の観察を当初の目的としていたが、血管やリンパ管における内皮細胞と平滑筋細胞の観察にも十分に有用であることが明らかになった。脈管の形態観察に使用すれば、抗体染色が上手くいかない領域の観察にも有用であるし、抗体を使用しなくて済むので、低コストな実験手法として使用できると思われる。

(2) VE-cadherin の抗体によるセルソーティングを用いて、高純度に内皮細胞が単離された。しかし、この方法では内皮細胞の生存率に問題があり、RNA などの解析は問題ないものの、さらに細胞培養を行うには難しいと思われ、SV40 ウィルス導入による不死化を試みたところ、細胞培養が可能になった。最も成功した例として、赤色タンパク質を指標にしたソーティングによって、肝臓における類洞内皮細胞が高純度で単離され、細胞レベルの EndMT 解析を行うことができた。

(3) EndMT マウスにがん細胞を移植する実験

系の樹立は成功した。しかし、腫瘍の回収時期の検討がさらに必要と考えられ、それに伴った EndMT の発生率の検討を現在行っている。

(4) 内皮細胞を用いた解析により EndMT の調節シグナルとして、線維芽細胞増殖因子が抑制的に働くこと、腫瘍壊死因子が促進的に働くことを見出していたが、今回、さらにこれらの作用点も明らかにすることができた。また、骨形成因子が促進的に作用することを見出し、作用点を明らかにしつつある。これらの3つのシグナルの作用については現在学術論文発表に向けた準備を進めている。

以上のことにより、EndMT を調節する複数のシグナルを解明することができたので、これらのシグナルを抑制する候補となる標的分子が明らかになった。これにより、がんの悪性化因子の一つを抑制するツールが増えて、これまでとは異なるがん治療の可能性が提示された。

(5) EndMT モニターマウスを用いた調節シグナルの解析は充分には行えていないが、先に同定されたシグナルの、マウス個体における EndMT の役割を解析する実験系として、腫瘍内における EndMT の発生率を増加させることができた。このことはマウスを用いた EndMT の発生率を調節する実験系として、今後も有用であると考えられる。

<引用文献>

Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts.

Cancer Research. 2007;67(21):10123-8.

Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K
Snail is required for TGF- β -induced

endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells

Journal of Cell Science 121(Pt 20):3317-24, 2008

Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y,

Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, Watabe T.

TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A.

Journal of Biochemistry 151(2):145-56, 2012

Yoshimatsu Y, Lee YG, Akatsu Y, Taguchi L, Suzuki HI, Cunha SI, Maruyama K, Suzuki Y, Yamazaki T, Katsura A, Oh SP, Zimmers TA, Lee SJ, Pietras K, Koh GY, Miyazono K, Watabe T.

Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression.

Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 110 (47):18940-45, 2013

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)

Akatsu Y, **Yoshimatsu Y**, Tomizawa T, Takahashi K, Katsura A, Miyazono K, Watabe T.

Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Cancer Science* 108(1):151-155. 2017, doi: 10.1111/cas.13103. 査読有り

Norita R, Suzuki Y, Furutani Y, Takahashi K, **Yoshimatsu Y**, Podyma-Inoue KA, Watabe T, Sato Y.

Vasohibin-2 is required for epithelial-mesenchymal transition

of ovarian cancer cells by modulating transforming growth factor- β signaling.

Cancer Science 108(3):419-426. 2017, doi: 10.1111/cas.13157. 査読有り

Yoshimatsu Y, Miyazaki H, Watabe T.

Roles of signaling and transcriptional networks in pathological lymphangiogenesis.

Advanced Drug Delivery Reviews 99(Pt B):161-171. 2016,

doi: 10.1016/j.addr.2016.01.020. 査読有り

[学会発表](計9件)

Yasuhiro Yoshimatsu. Roles of signaling and transcriptional networks in the formation and maintenance of lymphatic vasculature. The 24th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/ The 14th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 2016.12.10

長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

前田健太郎, **吉松康裕**, 宮園浩平, 原田浩徳, 渡部徹郎. Ets-2 転写因子は内因性

TGF- β 2 の発現を低下させることで内皮間葉移行 (EndMT) を抑制する. 2016.12.02 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

富澤泰志, 岡本勇人, 佐藤萌希, 駒井真央, **吉松康裕**, 福原武志, 原田浩徳, 渡部徹郎. 悪性黒色腫の進展に伴う腫瘍血管新生におけるインターロイキン 13 受容体の役割. 第 39 回日本分子生物学会

年会 2016.12.01 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高橋和樹、井上カタジナアンナ、**吉松康裕**、原田浩徳、渡部徹郎. 口腔がんの悪性化における TGF- β シグナルの役割. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.12.01 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

吉松康裕、前田健太郎、宮園浩平、渡部徹郎. Ets-2 転写因子は内因性の TGF- β 2

の発現を抑制することで 内皮間葉移行 (EndMT) を阻害する. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.06 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

吉松康裕, 前田健太郎, 宮園浩平, 渡部徹郎. Ets-2 転写因子は内因性の TGF- β 2 の発現を抑制することで内皮間葉移行 (EndMT) を負に制御する. 第 89 回日本生化学会大会 2016.09.26 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

吉松康裕, 米山和樹, 桂彰宏, 赤津裕一, 宮園浩平, 渡部徹郎,

TNF- α は血管内皮細胞において TGF- β シグナルを増強することで内皮間葉移行 (EndMT) を亢進する, 第 23 回日本血管生物医学学会学術集会, 2015 年 12 月 11 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Yoshimatsu Y, Akatsu Y, Suzuki HI, Miyazono K, Watabe T

Endogenous FGF signals in tumor endothelial cells inhibits TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition, North American Vascular Biology Organization (NAVBO) Meeting 2015, 2015 年 10 月 19 日, Hyannis, MA, U.S.A.

Yoshimatsu Y, Kazuki Yoneyama, Akihiro Katsura, Yuichi Akatsu, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe

Tumor necrosis factor- α enhances TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by augmenting TGF- β signals, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

[図書](計3件)

吉松康裕 実験医学 2017.01; 387-396.
未知なるリンパ「リンパ管とリンパ節の形成と維持を司る分子機構」

吉松康裕 炎症と免疫 2016.08; 24

(5): 372-378. 「リンパ管形成における転写因子の役割」

吉松康裕, 前田健太郎, 岩田要, 宮園浩平, 渡部徹郎

リンパ学 第 38 巻 2 号. 「Ets ファミリー転写因子の血管・リンパ管内皮細胞における役割」(2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉松 康裕 (Yoshimatsu Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 60586684