

令和元年6月17日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08614

研究課題名(和文)リンパ管内皮間葉移行を司る分子機構の解明と関連疾患治療法の開発

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the endothelial-to-mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells

研究代表者

渡部 徹郎 (WATABE, Tetsuro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00334235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：体液恒常性の維持に重要なリンパ管の内皮細胞(LEC)が老化と共に線維芽細胞へと分化転換する(内皮間葉移行：EndMT)ことが老年性リンパ浮腫の原因となることが近年報告されたが、その機序については未解明な部分が多く残されていた。そこで本研究ではTGF- β がLECのEndMTを誘導することを明らかにし、詳細な分子機序を明らかにするとともに、ヒト皮膚組織を用いて老化に伴いLECのEndMTが進行することを見出した。本研究成果はLECの形質維持の分子基盤を解明することで学術的に大きな波及効果を持つのみならず、老年性浮腫などの新規治療法の開発に役立つことが期待され、社会的意義は大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究から期待される成果は学術的(基礎生物学)そして社会的(臨床応用)など多岐に渡って大きな意義を有する。まず基礎生物学に関してだが、本研究成果により、リンパ管内皮細胞のEndMTがTGF- β により協調的に誘導されることを明らかにした点で意義は大きい。また、この研究成果の臨床医学における意義としては、TGF- β 阻害剤などを用いたEndMTを標的とした老年性リンパ浮腫の治療法開発が期待されるという点が挙げられる。さらに、本研究成果によって得られる知見はEndMTのみならず、リンパ管疾患における治療の新たな標的につながる可能性が高く、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Lymphatic systems play important roles in the maintenance of fluid homeostasis and undergo anatomical and physiological changes during inflammation and ageing. While lymphatic endothelial cells (LECs) undergo mesenchymal transition in response to transforming growth factor- β (TGF- β), the molecular mechanisms underlying EndMT of LECs remain largely unknown. In this study, we examined the effect of TGF- β 2 and tumor necrosis factor- α (TNF- α), an inflammatory cytokine, on EndMT using human skin-derived lymphatic endothelial cells (HDLECs). TGF- β 2-treated HDLECs showed increased expression of SM22 α , a mesenchymal cell marker accompanied by increased cell motility and vascular permeability, suggesting HDLECs to undergo EndMT. Our data also revealed that TNF- α could enhance TGF- β 2-induced EndMT of HDLECs. Furthermore, both cytokines induced the production of Activin A while decreasing the expression of its inhibitory molecule Follistatin, and thus enhancing EndMT.

研究分野：病態生化学

キーワード：リンパ管内皮細胞 内皮間葉移行 TGF- β TNF- α 浮腫 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ管は体液の恒常性維持に必須であり、その機能不全はリンパ浮腫を引き起こす

血液は心臓から動脈へ送り込まれ毛細血管・静脈を経て心臓へ戻る。この血管系とは別個に組織液の排水路を形成するものがリンパ管である。リンパ管は末梢組織で血管から漏出した間質液、などを血管系へと還流することにより血液の量や組成を一定に保ち、閉鎖循環系を維持している。リンパ管の機能不全により引き起こされる疾患としてリンパ浮腫があり、国内外で多くの患者がいるにも関わらず、有効な治療法は開発されていない。そのためリンパ管の内腔を形成するリンパ管内皮細胞の形成ならびに維持機構の解明は急務である。リンパ管内皮細胞の形成については胎生期において血管内皮細胞から分化すること、そしてその過程で Prox1 転写因子が重要な役割を果たしていることを研究者を含めた複数のグループが報告している(*Mol Biol Cell* 2008)。

(2) リンパ管と共通の性質を有する眼球のシュレム管の老化に伴う硬化は緑内障の原因となる

緑内障は本国の70歳以上の10%以上が罹患し、失明にもつながる重篤な目の病気であるが、眼球の中の圧力が高まることが原因で発症する。眼球内を満たす「房水」はシュレム管という脈管により排出されるが、緑内障の原因の一つはシュレム管が詰まることであることが知られている。最近シュレム管内皮細胞が Prox1 を発現し、リンパ管内皮細胞と共通の性質を持つということが報告された(Park *et al.* 2015)。興味深いことに、老化に伴いシュレム管の内皮細胞における Prox1 発現は低下し、内皮細胞の性質が失われ、線維芽(間葉系)細胞へと移行することで、シュレム管が硬化し、緑内障が発症することが見出された。以上から老化に伴うリンパ管内皮細胞の形質変化が緑内障の原因となることが示唆されたが、その原因については未解明な部分が多く残されている。

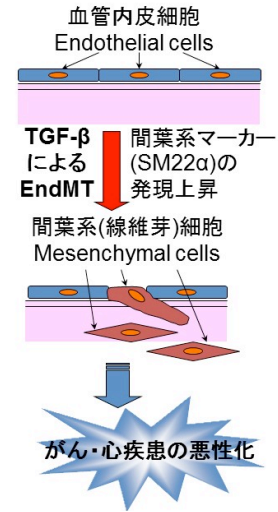


図1. 内皮間葉移行

(3) 様々な病態において血管内皮細胞は間葉系細胞へと移行する

一方、血管内皮細胞は心臓弁の発生過程や、がんや心疾患などの病態において VE-cadherin などの内皮細胞マーカーの発現が低下し、smooth muscle 22α (SM22α)などの間葉系細胞マーカーの発現が上昇すると共に間葉系細胞へと移行することが示されている。この現象は内皮間葉移行(Endothelial-to-Mesenchymal Transition: EndMT)と呼ばれ、上皮間葉移行(EMT)と同様に transforming growth factor-β (TGF-β)により誘導され、その際に Snail や MRTF-A などの転写因子の発現上昇が関与することが研究者らにより報告されている(*J Cell Sci* 2008; *J Biochem* 2012) (図1)。

(4) リンパ管内皮細胞の増殖は TGF-β シグナルにより抑制される

TGF-βは、細胞の増殖、分化、アポトーシスなど様々な生命現象を制御するサイトカインである。TGF-βリガンドは、セリンスレオニンキナーゼ型受容体である2種類のTGF-β受容体(ALK-5, TGFβR-II)に結合し、細胞内シグナル伝達因子であるSmad2/3をリン酸化することでシグナルを伝達する(図2)。研究者らは以前、ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞(HDLEC)をTGF-β存在下で培養すると、その増殖が著しく低下することを報告した(*Blood* 2008)。その際にHDLECにおいてProx1の発現が低下することを見出し、TGF-βがProx1の発現を低下させることでリンパ管内皮細胞の増殖を低下させることが示唆された。

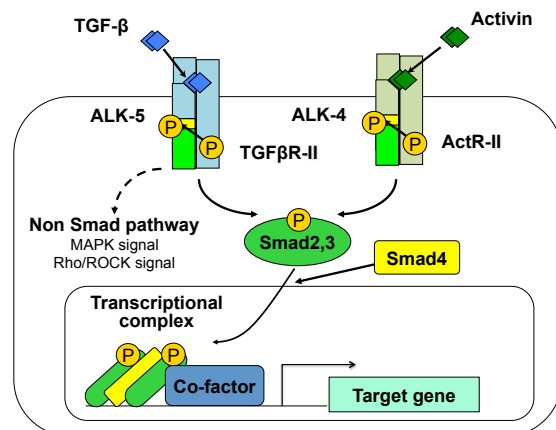


図2. TGF-βファミリーシグナル

(5) リンパ管内皮細胞を TGF-β 存在下で培養すると間葉系細胞マーカーの発現が上昇する

研究者はTGF-β存在下で培養したリンパ管内皮細胞における間葉系細胞マーカーの発現を検討したところ、SM22αなどの発現が上昇することが示された。また、TGF-β受容体キナーゼ阻害剤により内因性TGF-βシグナルを抑制するとSMAの発現が低下することが明らかとなった。以上の予備的結果から、TGF-βが血管内皮細胞と同様にリンパ管内皮細胞においてEndMTを誘導していることが示唆された。しかし、TGF-βによるリンパ管内皮細胞のEndMT誘導の

詳細な分子機序ならびにその生理的意義については未解明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、TGF- β によるリンパ管内皮細胞の EndMT 誘導を制御する分子機序を詳細に解明することで、老化に伴うリンパ管機能の低下が引き起こす様々な疾患の新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

細胞培養：HDLEC 細胞（ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞）を EBM-2TM (Promocell 社) を用いて培養した。

定量的 RT-PCR：細胞の total-RNA は RNeasy Min Kit (QIAGEN) により回収し、cDNA 合成は Prime Script (TaKaRa) により、random hexamer primer を用いて行った。この cDNA をテンプレートとして、FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) を用いて定量的 RT-PCR を行った。 β -actin を内因性コントロールとして用いた。

細胞免疫染色：一次抗体として Rabbit Anti-SM22 α antibody (Abcam 社) を、二次抗体として Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Life Technologies 社) を用いて HDLEC を染色し、観察は共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV-10i (Olympus) および蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence 社) により行った。

Chamber migration assay：8.0 μ m pore size, 24-well format Cell Culture Insert (FALCON 社) を用いて、6 時間 HDLEC を遊走させ、ギムザ染色を行った。

4. 研究成果

(1) TGF- β シグナルによりリンパ管内皮細胞は間葉系細胞の性質を獲得した

まず、HDLEC において TGF- β 2 で EndMT が誘導されるかについて検討した。TGF- β 2 を添加した HDLEC を 72 h 培養すると control と比べ細胞の形態が大きくなる傾向が見られた (図 3a)。定量的 RT-PCR 解析を行った結果、ALK-5 のキナーゼ阻害剤である SB431542 (SB) を HDLEC に添加したところ、リンパ管内皮細胞マーカー LYVE-1 の発現は上昇し、間葉系細胞マーカー SM22 α の発現は低下した。一方 TGF- β 2 を添加した HDLEC においては LYVE-1 の発現は低下し、SM22 α の発現は顕著に上昇した (図 3b)。また細胞免疫染色による解析結果からも、TGF- β 2 を添加した HDLEC においては SM22 α 陽性の細胞数が 10% 程度まで増加した (図 3c)。さらにこのときに、間葉系細胞の特徴である細胞の運動能の亢進について検討するため Chamber migration assay を用いたところ、SB を添加した HDLEC においては遊走した細胞数が減少し、TGF- β 2 を添加した細胞では遊走した細胞数が増加した (図 3d)。これらの結果から HDLEC において TGF- β 2 は、リンパ管内皮細胞の性質を失わせるとともに間葉系細胞の性質を獲得させ EndMT を誘導することが示唆された。

(2) TGF- β シグナルにより EndMT を起こしたリンパ管内皮細胞は Activin を分泌することで間葉系細胞の性質を維持する

TGF- β は Smad2/3 経路を活性化するが (図 2)、HDLEC における Smad 経路の活性化に対する TGF- β の効果を検討するため、Smad2 のリン酸化をウエスタンブロッティングにより検討を行った。control では SB 添加のものに比べ

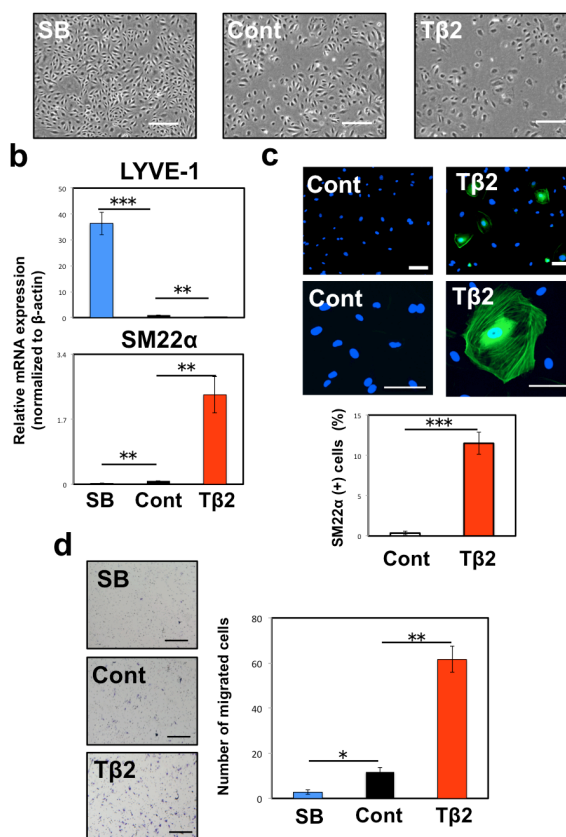


図 3. リンパ管内皮細胞に対する TGF- β 2 の作用

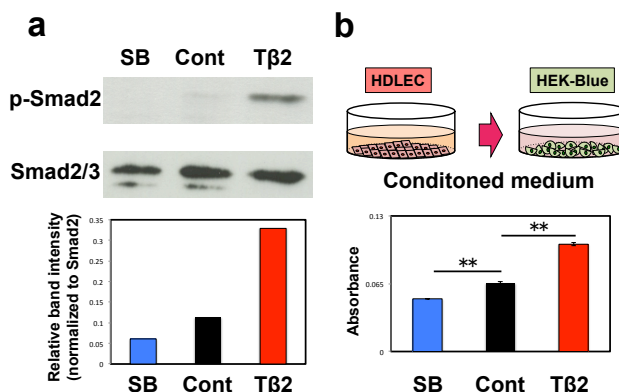


図 4. TGF- β シグナルがリンパ管内皮細胞の Smad2 シグナルに与える作用

て、Smad2 のリン酸化がわずかに亢進し、TGF-β2 によりさらに強く亢進した (図 4a)。この結果から HDLEC において TGF-β2 は Smad シグナルを活性化していることが示された。この TGF-β2 による Smad2 のリン酸化は control と SB における差に比べて非常に強いと考えられたため、培養上清中に「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」が増えていると予想した。そこで、TGF-β を添加した HDLEC の培養上清を一度洗浄した後に HDLEC が産生する培養上清中の、「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」について、TGF-β シグナル応答性のレポーター細胞を用いて検討した。TGF-β を添加した HDLEC における培養上清では、control と比べ「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」による TGF-β シグナルの活性化の亢進が見られた。また TGF-β シグナルを SB で抑制した HDLEC における培養上清ではこの活性化は抑制されていた (図 4b)。これらの結果から、HDLEC において TGF-β2 は Smad 経路を活性化させると同時に「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」のオートクラインを増加させることで EndMT をさらに亢進させていることが示唆された。

次に、この増加した「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」を同定するため TGF-β ファミリーの発現解析を行った。まず TGF-β ファミリーのプロトタイプである TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 の発現を解析したところ、これらの発現は TGF-β2 添加により上昇していなかった。そこで同じ TGF-β ファミリーに属する Nodal や Activin のサブユニットについて解析を行ったところ、Activin A のサブユニットである Inhibin βA のみが HDLEC において発現していた (Activin ファミリーには他の種類があるが、Inhibin βA のみでは Activin A しかできない)。さらに Inhibin βA は TGF-β2 で刺激することにより発現量が増加することが判明した (図 5)。加えて、Activin の阻害因子である Follistatin の発現は、TGF-β により発現が低下していた (図 5)。これらの結果から、TGF-β2 の添加によって HDLEC は Inhibin βA の発現を上昇させることで培養上清に Activin A を放出し、さらに Follistatin の発現を低下させることで Activin A のオートクラインによるシグナルを亢進させて EndMT を亢進していると考えられる。さらに、この TGF-β によるリンパ管内皮細胞の EndMT が炎症性サイトカインである TNF-α によって亢進すること、老化したヒト皮膚組織においてリンパ管の EndMT が亢進していることを見出した (未公表データ)。

本研究の成果から、リンパ管内皮細胞において TGF-β2 は、Smad 経路を介してリンパ管内皮としての性質を失わせ、SM22α の高発現の誘導や細胞遊走能の亢進といった間葉系細胞の性質を獲得させることで EndMT を誘導すること、さらには Activin A のオートクラインにより HDLEC の EndMT をより亢進させることが示唆された (図 6)。また、老化したリンパ管において同様のメカニズムが作用していることが実証できれば、TGF-β により誘導される EndMT は緑内障や老年性浮腫の予防・治療の標的となりうると考えられ、臨床応用への展開が期待される。

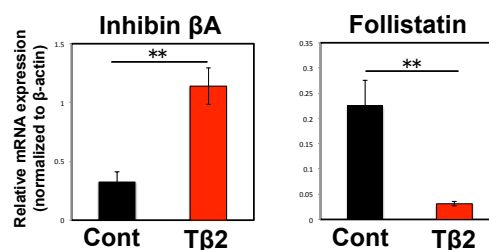


図 5. TGF-β がリンパ管内皮細胞における Activin シグナルに与える作用

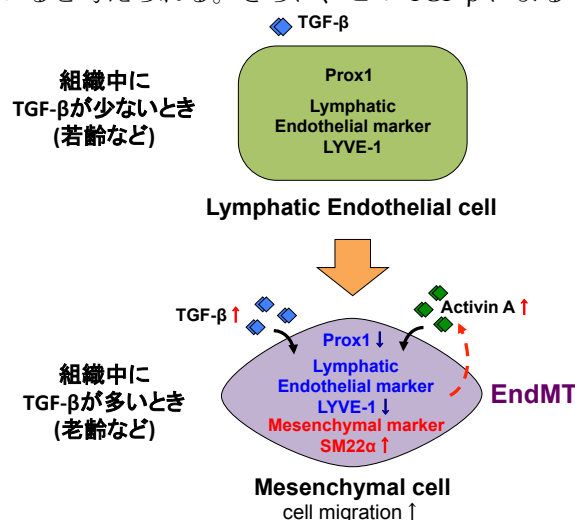


図 6. TGF-β によるリンパ管内皮細胞の EndMT 誘導ならびに維持の分子機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- Okamoto H, Yoshimatsu Y, Tomizawa T, Kunita A, Takayama R, Morikawa T, Komura D, Takahashi K, Oshima T, Sato M, Komai M, Podyma-Inoue KA, Uchida H, Hamada H, Fujiu K, Ishikawa S, Fukayama M, Fukuhara T, Watabe T. Interleukin-13 receptor α2 is a novel marker and potential therapeutic target for human melanoma. *Sci Rep.* 2019 Feb 4;9(1):1281. doi: 10.1038/s41598-019-39018-3.
- Ren E, Watari I, Jui-Chin H, Mizumachi-Kubono M, Podyma-Inoue KA, Narukawa M, Misaka T, Watabe T, Ono T. Unilateral nasal obstruction alters sweet taste preference and sweet taste receptors in rat circumvallate papillae. *Acta Histochem.* 2019 Feb;121(2):135-142. doi: 10.1016/j.acthis.2018.10.007.

3. Iwasaki K, Akazawa K, Nagata M, Komaki M, Honda I, Morioka C, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, Tanaka Y, Kimura T, Kishida A, Watabe T, Morita I. The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 7;20(1). pii: E192. doi: 10.3390/ijms20010192.
4. Iwasaki K, Nagata M, Akazawa K, Watabe T, Morita I. Changes in characteristics of periodontal ligament stem cells in spheroid culture. *J Periodontal Res*. 2018 Dec 30. doi: 10.1111/jre.12637.
5. Fukuhara T, Kim J, Hokaiwado S, Nawa M, Okamoto H, Kogiso T, Watabe T, Hattori N. A novel immunotoxin reveals a new role for CD321 in endothelial cells. *PLoS One*. 2017 Oct 13;12(10):e0181502. doi: 10.1371/journal.pone.0181502.
6. 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 Sci*. 2017 Mar;108(3):419-426. doi: 10.1111/cas.13157.
7. 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 Sci*. 2017 Jan;108(1):151-155. doi: 10.1111/cas.13103.
8. Ode T, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Inokuchi JI, Kobayashi T, Watabe T, Izumi Y, Hara-Yokoyama M. PDMP, a ceramide analogue, acts as an inhibitor of mTORC1 by inducing its translocation from lysosome to endoplasmic reticulum. *Exp Cell Res*. 2017 Jan 1;350(1):103-114. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.11.011.

[学会発表] (計 18 件)

1. 渡部 徹郎. 腫瘍の進展を制御する内皮間葉移行(EndMT)における TGF- β シグナルの役割. 第 14 回 Vasohibin 研究会 2019.02.16 仙台
2. Tetsuro Watabe. TGF- β -induced cell cycle arrest is associated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells.. 11th AACR-JCA Joint Conference 2019.02.08 Maui, Hawaii
3. 渡部 徹郎. 血管・リンパ管の恒常性維持におけるシグナル・転写ネットワークの役割. CVMW2018 心血管代謝週間 2018.12.7 東京
4. Tetsuro Watabe. TGF- β family signals in the formation and maintenance of lymphatic systems.. The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2018.11.28 Yokohama
5. Tetsuro Watabe. BMP family signals in the formation and maintenance of vascular systems.. 12th International BMP Conference 2018.10.27 Tokyo
6. 渡部 徹郎. 悪性黒色腫進展におけるシグナルネットワークの役割. Kofu Stem Cell Conference 2018 2018.08.02 甲府
7. Tetsuro Watabe. Roles of TGF- β family signals during the formation and maintenance of vascular systems.. Kitasato Research Forum 2018 2018.07.09 Tokyo
8. 渡部 徹郎. リンパ管の恒常性維持におけるシグナル・転写ネットワークの役割. 第 42 回 日本リンパ学会総会 2018.06.22 弘前
9. Tetsuro Watabe. TGF- β family signals in the formation and maintenance of vascular systems. International Vascular Biology Meeting 2018.06.03 Helsinki, Finland
10. 渡部 徹郎. リンパ管の形成と維持におけるシグナル・転写ネットワークの役割. 第 138 回日本薬学会 2018.03.26 金沢
11. Tetsuro Watabe. TGF- β signals induce endothelial-to-mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells by decreasing PROX1 expression. Lymphatics Gordon Research Conference 2018.03.11 Lucca(Barga), ITALY
12. Tetsuro Watabe. Roles of signaling networks during tumor angiogenesis. CardioVascular and Metabolic Week 2017 2017.12.08 Osaka_

13. **Tetsuro Watabe**, Kazuki Takahashi, Takumi Matsuda, **Yasuhiro Yoshimatsu**, Atsushi Kaida, Masahiko Miura and Katarzyna A. Inoue. Relationship between cell cycle arrest and epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β in oral squamous carcinoma cell. ERATO/AMED-CREST/PRESTO Joint International Symposium 2017.12.04 Kyoto
14. **渡部 徹郎**. がんの浸潤・転移研究の新機軸. 第76回日本癌学会学術総会 2017.09.28 横浜
15. **Tetsuro Watabe**. Roles of TGF- β family signals during endothelial-to- mesenchymal transition. the TGFbeta meeting in Uppsala 2017 2017.09.02 Sweden
16. **渡部 徹郎**. リンパ管の形成と維持におけるシグナル・転写ネットワークの役割. 第38回日本炎症・再生医学会 2017.07.18 大阪
17. **Tetsuro Watabe**. Targeting signaling networks in tumor microenvironment. 1st International Cancer Precision Medical Conference 2017.06.29 Tokyo
18. **Tetsuro Watabe**. Roles of signaling and transcriptional networks in the formation and maintenance of lymphatic vessels. Kitasato Research Forum 2017 on Vascular Biology 2017.05.31 東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：老化抑制剤

発明者：国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社資生堂

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社資生堂

番号：特願 2018-240373

出願年：2018年

国内外の別：国内

名称：老化抑制剤のスクリーニング方法

発明者：国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社資生堂

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社資生堂

番号：特願 2018-240198

出願年：2018年

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：URL: <https://cellular-biochemistry-tmdu.net/>

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。