

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08794

研究課題名(和文)血管内皮細胞の恒常性制御におけるTGF-ファミリーの役割解明

研究課題名(英文)The role of TGF- $\beta$  family signaling in regulation of vascular integrity

研究代表者

伊東 史子 (Itoh, Fumiko)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70502582

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)：TGF-ファミリーシグナルは正常な血管の発達と維持に必須である。TGF- $\beta$ /BMPシグナルが成獣マウスの血管の機能調節にどのような役割を明らかにするために、すべてのTGF- $\beta$ ファミリーシグナルを破壊するSmad4のコンディショナルノックアウト(CKO)マウスと、BMPシグナルを遮断するSmad1/Smad5遺伝子改変マウスをVE-Cad-*icreER*マウスと交配させ、タモキシフェン誘導的に血管・リンパ管内皮細胞で目的の遺伝子を欠損させました。その結果、血管内皮細胞のBMPシグナルはマウスの生存に必須であること、また難治性血管疾患のモデルマウスとして利用可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの異常は、がんの悪性化や難治性血管疾患と関連している。本研究により作成された遺伝子改変マウスは、TGF- $\beta$ ファミリーシグナルが原因と考えられている難治性血管疾患のモデルマウスとして有益であることが示された。今後これらのマウスの解析から、疾患の発症メカニズムや治療法の開発に繋がる期待される。

TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの阻害薬として、ペプチド製剤が有効であることが示されたほか、新規抗がん剤の治療標的として脱ユビキチン化酵素素材剤を同定することができた。特異的なTGF- $\beta$ シグナル阻害剤は様々な疾患に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TGF- $\beta$  signaling is involved in the normal vascular development and maintenance. Contrary to the well-documented to the action of TGF- $\beta$  signaling in developmental angiogenesis, it was not clear how TGF- $\beta$  BMP signaling regulate vascular system. To address this issue, Smad4 conditional knockout (CKO) mice to delete the all TGF- $\beta$  superfamily, or Smad1/Smad5 CKO mice to destroy BMP signaling, were crossed with VE-Cad-*icreER* mice in which Cre recombinase is induced in blood and lymphatic endothelial cells by tamoxifen (Tx). I have found that BMP signaling but not TGF- $\beta$  signaling is important for maintenance vascular integrity because deletion of BMP signaling in endothelial cells resulted in the death of these mice. Interestingly, these mice can be used as model mice for intractable vascular disease.

研究分野：実験病理学

キーワード：TGF- 血管新生 BMP がん 難治性血管疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$ 、BMP、Activin を含む TGF- $\beta$  ファミリーは、細胞の増殖や分化などを制御しており、個体の発生から成体の恒常性維持を調節するサイトカインである。TGF- $\beta$  ファミリーシグナルは、細胞膜上のセリンスレオニンキナーゼを有する I 型および II 型受容体を介して伝達される。リガンド - 受容体複合体により、細胞内シグナル伝達分子である Smad は活性化され、Smad4 と複合体を形成し、核へ移行して転写因子として機能する。TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの異常は、がんの悪性化とも密接に関与しているほか、シグナル系分子のノックアウト(KO)マウスの解析から血管新生不全による胎生致死の表現型が多く報告されている。ヒトでは、家族性出血性毛細血管拡張症や原発性肺高血圧症などの難治性血管疾患患者の TGF- $\beta$  シグナル受容体において、機能に影響を与える遺伝子変異が同定されており、血管系における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの重要性が示唆されている。血管の機能を正常に保つことは生命維持にとって最も基本的かつ不可欠である。それゆえ血管機能の異常は、がん、心疾患、脳血管疾患などの疾患と関連している。これらの疾患は日本人の死亡原因の約 60% を占めており(Cell 1996.8:353)、血管新生の制御や血管の恒常性を維持することは、健康な生活を維持するために重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

胎生期において TGF- $\beta$  シグナルは血管新生を抑制する作用を有するだけでなく、血管の成熟を促して血管を成熟させるシグナルである (Itoh et al, *J. Cell Sci* 2009、Itoh et al, *Blood*, 20012)。しかし、成獣における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの役割は明らかではなかった。そこで、血管内皮細胞における TGF- $\beta$  ファミリーシグナル、および BMP シグナルの役割解明を目標とした。Smad4 は TGF- $\beta$  ファミリーシグナル全般に必須の分子であるため、Smad4 遺伝子の欠損により TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの役割を解明できると考えられた。さらに腫瘍形成における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの役割について解析を試みた。

## 3. 研究の方法

成体の血管内皮細胞における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの役割を明らかにするために、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルすべてに必須の Smad4、または BMP シグナルを伝達する Smad1,5 のコンディショナルノックアウト (CKO) マウスと VE-Cad-iCreER マウスや Pdgfr- $\beta$ -iCreER マウスとを交配させたマウスを利用し、タモキシフェン投与により血管・リンパ管内皮細胞、または血管内皮細胞特異的にシグナルを欠損させて成体解析を行い、血管機能に与える影響を検討した。さらに腫瘍形成における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの役割について生体解析を行った。

### 3-1. 血管機能維持における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの役割

Smad4<sup>fl/fl</sup>: VE-Cad-iCreER マウスでは、貧血と末梢血循環が認められたため、その原因について探索した。そのほか、Smad4<sup>fl/fl</sup>: VE-Cad-iCreER マウスで認められた臓器異常について、病理切片を作成して解析するとともに、これらの表現型の責任シグナルについて同定するために、TGF- $\beta$  または BMP シグナルを欠損したマウスを作成して解析を表現型について解析した。

### 3-2. 腫瘍微小環境における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの役割

TGF- $\beta$  シグナルはがんの悪性化にも関与するため、がん微小環境が TGF- $\beta$  ファミリーシグナルに与える影響について生体解析を行った。さらに TGF- $\beta$  ファミリーに属するミオスタチンの阻害剤の臨床応用の可能性について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 血管機能維持における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの役割

TGF- $\beta$  ファミリーのシグナルすべてにおいて必須の分子・Smad4、または BMP シグナルを伝達する Smad1 および Smad5 の遺伝子をタモキシフェン投与により内皮細胞 (血管 + リンパ管または血管内皮細胞のみ) 特異的に欠損させると、マウスはそれぞれ 3 週間、12 日以内に死亡した。しかしながら、TGF- $\beta$  I 型または II 型受容体を同様に欠損させても死亡していないことから、Smad4 遺伝子欠損で見られる表現型の責任シグナルは BMP シグナルであることが明らかとなった。この結果は、内皮細胞の BMP シグナルは血管の機能維持に必須であり、BMP シグナルの欠損により血管機能が破綻すると肺、心臓、脾臓、肝臓に顕著な異常を認め、生存できないことを示した。これらの内皮細胞特異的な TGF- $\beta$  ファミリーシグナル欠損マウスの表現型は、家族性出血性毛細血管拡張症や肺動脈性肺高血圧症のモデルマウスとして利用できる可能性を示唆した。

### (2) 腫瘍微小環境における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの役割

がん微小環境は低酸素となることが知られているが、これまでに低酸素環境は TGF- $\beta$  シグナルを増強することを報告していた。本研究は、低酸素環境が誘導する分子として脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 を同定し、UCH-L1 がシグナル依存的に Smad2 と結合して Smad2 を安定化する結果、TGF- $\beta$  シグナルを増強することを明らかにした。UCH-L1 の遺伝子を破壊したがん細胞は生体において腫瘍形成されず、腫瘍形成には UCH-L1 の脱ユビキチン化活性が必須であることを報告した。さらに、TGF- $\beta$  ファミリーに属するミオスタチンの新規阻害剤を用いて、がん悪液質

に対する効果を検証したところ、腓腹筋への筋肉内投与により生存期間の延長が認められた。ミオスタチンはヒトとマウスで完全にアミノ酸が一致することから、新規ミオスタチン阻害剤は臨床応用の可能性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chiharu Ojima, Yuri Noguchi, Tatsuki Miyamoto, Yuki Saito, Hiroki Orihashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Fumiko Itoh	4. 巻 Jun 10
2. 論文標題 Peptide-2 From Mouse Myostatin Precursor Protein Alleviates Muscle Wasting in Cancer-Associated Cachexia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Asami Nagata, Fumiko Itoh, Ayaka Sasho, Kaho Sugita, Riko Suzuki, Hiroki Hinata, Yuta Shimoda, Eri Suzuki, Yuki Maemoto, Toshihiko Inagawa, Yuuta Fujikawa, Eri Ikeda, Chiaki Fujii, Hideshi Inoue	4. 巻 May 5
2. 論文標題 The Evolutionarily Conserved Deubiquitinase UBH1/UCH-L1 Augments DAF7/TGF- Signaling, Inhibits Dauer Larva Formation, and Enhances Lung Tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeno S, Nakano N, Sano K, Minowa T, Sato W, Akatsu R, Sakata N, Hanagata N, Fujii M, Itoh F, Itoh S.	4. 巻 294
2. 論文標題 PDZK1-interacting protein 1 (PDZK1IP1) traps Smad4 protein and suppresses transforming growth factor- (TGF- ) signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 4966-4980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.004153.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Itoh F, Takagi T, Saito Y, Miyamoto T, Inagawa T, Nakano Y, Sano K, Fruttiger M, Itoh S
2. 発表標題 Endothelial TGF- signaling inhibit tumor angiogenesis and metastasis
3. 学会等名 20th International Vascular Biology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東 史子
2. 発表標題 内皮細胞のTGF-ファミリーシグナルは生命維持に必須である
3. 学会等名 第42回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永田 麻未, 佐粧 彩海, 鈴木 理子, 鈴木 映里, 下田 裕太, 藤川 雄太, 渡部 琢也, 伊東 史子, 井上 英史
2. 発表標題 ユビキチン C 末端加水分解酵素 UCH-L1 は Smad2 を介して TGF-シグナルを正に制御する
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumiko Itoh
2. 発表標題 Rndothelial TGF- b/BMP signaling is essential for maintaining vascular function
3. 学会等名 12th International BMP conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishibashi M, Inagawa T, SaitoY, WatanabeT, Kubota T, Itoh S, Zwijsen A, Itoh F.
2. 発表標題 Endothelial specific depletion of BMP-Smad signaling affects vascular function
3. 学会等名 12th International BMP conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東 史子、稲川 俊彦、石橋 美穂、斎藤 裕紀、久保田 義顕、伊東 進
2. 発表標題 BMPシグナルによるリンパ管の機能維持
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東 史子、稲川 俊彦、斎藤 裕紀、石橋 美穂、久保田 義顕、伊東 進
2. 発表標題 BMPシグナルはリンパ管の機能維持に必須である
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiko Itoh
2. 発表標題 depletion of endothelial TGF- $\beta$ signaling induces both tumor angiogenesis and metastasis.
3. 学会等名 ASEB Science research conference. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊東史子
2. 発表標題 13. 伊東史子. 血管・リンパ管内皮細胞におけるTGF- $\beta$ ファミリーシグナルの重要性.
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊東史子
2. 発表標題 腫瘍転移におけるTGF- ファミリーシグナルの役割
3. 学会等名 日本リンパ学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 深見 希代子、山岸 明彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 192
3. 書名 基礎講義 遺伝子工学	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 マイオスタチン阻害ペプチド	発明者 林 良雄、伊東 史子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6143270	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----