

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19209009

研究課題名(和文) リンパ管新生の制御機構

研究課題名(英文) Mechanisms for regulation of lymphangiogenesis

研究代表者

宮園 浩平(MIYAZONO KOHEI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90209908

研究成果の概要(和文)：

我々はリンパ管新生の制御機構を明らかにするためにリンパ管新生のマスター因子 Prox1 の作用を中心に研究を行った。我々は TGF- $\beta$  シグナルによって Prox1 の発現が抑制され、HoxD8 によって発現が誘導されることを見いだした。また、Prox1 が Ets ファミリーの転写因子や核内受容体 COUP-TFIII と結合し、リンパ管新生に重要な働きを示すことを明らかにした。さらに Prox1 の標的遺伝子として新たに FoxC2、Ang-2、HoxD8 を見いだした。

研究成果の概要(英文)：

In order to elucidate the mechanisms of lymphangiogenesis, we have studied the action of Prox1, a master regulator of lymphangiogenesis. In this project, we have found that TGF-beta represses the expression Prox1, whereas HoxD8 induces it. In the nucleus, Prox1 was shown to interact with Ets family proteins and a nuclear receptor COUP-TFII to regulate expression of genes involved in lymphangiogenesis. We have also identified novel Prox1 target genes, including FoxC2, Ang-2, and HoxD8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
年度			
年度			
総計	28,800,000	8,640,000	37,440,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：シグナル伝達、病理学、発生・分化、癌

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ管新生の分子機構はとくに癌の転移との関連で近年大きな注目を浴びつつある。一方でリンパ管の形成異常により引き起こされる疾患としてはリンパ浮腫があり、近年、乳癌の症例などで大きな問題となってい

る。リンパ管に関する研究が血管研究と比較して大きく遅れた理由の一つとしてリンパ管を同定するための良いマーカーがなかったことが挙げられる。現在では血管内皮増殖因子(VEGF)-C や VEGF-D の受容体である VEGFR3 や転写因子 Prox1、ヒアルロン酸受容

体である LYVE1、膜タンパク質である podoplanin などがリンパ管に特異的に発現するマーカーとして用いられるようになってきた。

転写因子の中には細胞の運命を決定するような働きを持つものがあり、しばしばマスター因子と呼ばれる。これらの因子は多くの標的遺伝子群の発現を調節することによって、細胞におけるシグナル伝達経路や転写ネットワークなどを変化させ、細胞を新たな運命へと導く。リンパ管内皮細胞の増殖と分化には VEGF-C/D とその受容体 VEGFR3 によるシグナルが必須であることが知られている。しかしリンパ管内皮細胞において VEGFR3 の発現は転写因子 Prox1 によって調節されており、さらに Prox1 は podoplanin などの多くのリンパ管マーカーの発現も調節していることから、最近 Prox1 がリンパ管分化のマスター遺伝子ではないかと考えられるようになってきた。

Prox1 遺伝子はショウジョウバエの神経の運命決定を行なう prospero ホメオボックス遺伝子の脊椎動物における ortholog として発見された。Prox1 はリンパ管以外にも眼のレンズや肝臓などで発現しているが、Prox1 ノックアウトマウスでは血管形成には異常がないものの、リンパ管が形成されずに胎生致死となることから Prox1 がリンパ管分化に決定的な役割を持つことが示唆されている。

マウス ES 細胞は LIF 存在下では未分化性を維持するが、LIF を除くとその一部は血管内皮増殖因子 VEGF-A の受容体 VEGFR2/Flk-1 陽性の血管前駆細胞へと分化する。Flk-1+細胞はさらに VEGF-A の作用で血管内皮細胞へ、PDGF-BB の作用で血管平滑筋様細胞（壁細胞）へと分化していく。血管内皮細胞はさらに何らかのシグナルによってリンパ管内皮細胞へと分化していくと考えられていることから、我々はリンパ管内皮細胞様細胞を得るためにいくつかの試みを行ってきた (Suzuki et al., Blood, 2005)。そうした中で我々はテトラサイクリン発現誘導システムを用いることにより、ES 細胞が分化する過程で、ある限られた時のみ遺伝子を発現させることを可能にし、Prox1 をテトラサイクリン依存性に発現させることに成功した。この方法により、マウス ES 細胞を血管前駆細胞に分化させた後 Prox1 を発現させると、VEGFR3 や podoplanin、integrin  $\alpha 9$  などのリンパ管マーカーが誘導されて増殖・運動性の亢進などが見られるのに対し、VEGFR2 や VE-cadherin などの血管内皮細胞特異的遺伝子の発現は抑制されることを見いだした。このことは Prox-1 が血管内皮からリンパ管内皮への遺伝子発現レベルでのリプログラミングを誘導し、リンパ管への分化を司るマスター因子

であることを強く示唆すると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに TGF- $\beta$  阻害剤が ES 細胞由来の血管内皮細胞の増殖を促進し、さらに分化した内皮細胞シートの形成に重要な役割を果たすことを明らかにした (Watabe et al., J. Cell Biol., 2003)。本研究では我々がこれまで明らかにしてきた血管細胞の分化に関する知見を基盤として、種々の *in vitro*、*in vivo* の実験系を駆使して、Prox1 による血管前駆細胞からリンパ管内皮細胞への分化のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指した。上述の通り、我々はすでにマウス ES 細胞由来血管前駆細胞 (Flk-1+細胞) に Prox1 を発現させるとリンパ管マーカーが誘導され、リンパ管内皮細胞様細胞を得られることを明らかにしていた。またヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) に Prox1 を発現させた場合にも同様にリンパ管内皮細胞特異的遺伝子が誘導される。一方でヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 (HDLEC) で Prox1 の発現をノックダウンするとリンパ管マーカーの発現が低下し、さらに細胞がアポトーシスに陥る傾向があることを確認した。こうした *in vitro* の系に加え、我々はリンパ管新生を *in vivo* で確認する方法を樹立している。そこで本研究では Prox1 の作用を中心に、研究を推進した。

## 3. 研究の方法

本研究では Prox1 の作用を中心に、1) Prox1 がどのようなシグナルで血管内皮細胞で誘導されるか、2) 血管内皮細胞で Prox1 はどのような転写因子と複合体を形成し、リンパ管特異的遺伝子を誘導するか、3) Prox1 はどのような遺伝子の転写を促進（または抑制）し、それらの遺伝子はリンパ管の形成にどのような役割を果たしているか、の3つに焦点を絞り、研究を推進した。

細胞はマウス ES 細胞由来血管前駆細胞 (Flk-1+細胞) やヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 (HDLEC) のほか、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) などを用い、Prox1 の遺伝子をアデノウイルス等を用いて発現させたり、siRNA でノックダウンするなどしてその作用を検討した。

## 4. 研究成果

(1) リンパ管新生を評価する *in vivo* の系の確立

まずヌードマウスの胃壁にスキルス胃がん OCUM-2MLN 細胞を移植しリンパ節転移を調べたところ、OCUM-2MLN 細胞は4週後にリンパ節転移を示した。さらに Cyclooxygenase-2 阻害剤であるエトドラクを投与したところ、リンパ節転移が有意に抑制できることを確

認した。次にヌードマウスに癌性腹膜炎を惹起し、横隔膜でのリンパ管新生を測定する系を確立した。この場合もエトドラクはリンパ管新生を抑制した。最後にチオグリコレートにより慢性腹膜炎を惹起し、横隔膜リンパ管新生を測定したところ、やはりエトドラクによる効果が見られた。これらの系は今後、リンパ管新生を検討する上で有効な系となることが期待された。

#### (2) Prox1 の発現を制御するシグナルの同定

転写因子 Prox1 はリンパ管新生のマスター因子として作用することが我々のこれまでの研究で明らかとなっている。我々は TGF- $\beta$  阻害剤を投与すると転写因子 Prox1 や細胞表面タンパク LYVE1 の発現が上昇することを明らかにした。また転写因子 HoxD8 が Prox1 の発現を亢進することを見出した。HoxD8 の発現は Prox1 によって誘導されることから、Prox1 の発現は自身の標的遺伝子である HoxD8 によって維持されていることが示唆された。以上の結果から Prox1 と HoxD8 による転写ネットワークがリンパ管の成熟と維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### (3) Prox1 と結合する転写因子 COUP-TFII の作用

我々は静脈血管内皮細胞において発現する核内受容体 COUP-TFII が Prox1 の転写活性を調節することを示した。血管内皮細胞 (BEC) とリンパ管内皮細胞 (LEC) において Prox1 は cyclin E1 と VEGFR3 の発現を誘導することにより、細胞増殖と VEGF-C への走化性を亢進する。COUP-TFII の発現により BEC と LEC において Prox1 の作用は阻害されたのに対し、COUP-TFII の発現を低下させると Prox1 の作用は BEC では亢進し、LEC では阻害された。我々はまた内因性の Prox1 と COUP-TFII がリンパ管内皮細胞において結合すること、cyclin E1 プロモーター上で複合体を形成することを見出した。以上の結果から COUP-TFII がリンパ管の形成と維持において Prox1 と結合することにより、Prox1 の機能を調節していることが示唆された。

#### (4) Ets ファミリーの転写因子のリンパ管新生に対する作用

我々は Prox1 と結合する因子を yeast two-hybrid system で検索し、Ets ファミリーの転写因子である Ets2 が Prox1 と結合することを見出した。Ets2 は血管内皮細胞だけでなくリンパ管内皮細胞にも発現していた。またリンパ管内皮細胞で Prox1 が Ets2 と結合していることを確認した。さらに我々は Ets2 が Prox1 と協調して血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞で、VEGF-C の受容体である

VEGFR3 の発現を誘導することを明らかにした。また Ets2 は Prox1 による血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞の VEGF-C に対する遊走を促すことや、クロマチン免疫沈降法で Prox1 と Ets2 が VEGFR3 プロモーターへ結合することを確認した。さらには、我々が確立した横隔膜でのリンパ管新生系では Ets2 が in vivo においてリンパ管新生を誘導することを見出した。今回の我々の研究で Ets ファミリーの因子では Ets2 以外にも Ets1 などいくつかの因子が Prox1 と結合することが明らかとなったことから、Ets ファミリーの因子は Prox1 と協調することによってリンパ管新生に極めて重要な役割を持つことが明らかとなった。

#### (5) 新規転写因子 Homez の働き

新規転写因子 Homez は機能未知の転写因子で、我々の研究で Prox1 と結合することが明らかとなった。Homez は血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞に発現している。Homez はリンパ管内皮細胞で Cyclin E1 の発現を上昇させることから、細胞増殖を促進することが示唆された。Homez を高発現するマウスは形態学的には明らかな異常は見られなかったが、Homez が精巣に発現しているためか生殖能力に異常があることを示唆する結果を得た。

#### (6) Prox1 の標的遺伝子の同定

我々はマウス胚性幹細胞由来の血管内皮細胞 (MESEC) においてリンパ管の成熟に重要な役割を果たす FoxC2 と Angiopoietin-2 (Ang-2) の発現を Prox1 が誘導することを見出した。さらに HoxD8 の発現が Prox1 によって誘導されることが明らかとなった。Prox1 による HoxD8 発現誘導はヒト臍帯静脈血管内皮細胞ならびにヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞においても確認され、マウス胚由来のリンパ管内皮細胞において HoxD8 が発現していることも確認された。さらにマウス炎症性リンパ管新生モデルにおいて、アデノウイルスによって導入された HoxD8 が横隔膜上の新生リンパ管の径を拡大させることが明らかとなった。我々はまた Prox1 と HoxD8 が協調的に Ang2 の発現を誘導することを見出した。

### 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 10 件)

1) Yoshimatsu Y, Mihira H, Itoh T, Yuki K, Harada K, Morikawa M, Yamazaki T, Iwata C, Minami T, Morishita Y, Kodama T, Miyazono K, Watabe T. (2011) Ets family members induce lymphangiogenesis via physical and functional interaction with Prox1. *J Cell*

Sci. (掲載確定 (印刷中)) 査読有

2) 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. **J Cell Sci.** 123 (10): 1684-1692. 査読有

3) Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. (2010) LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. **Blood.** 116 (23): 5060-5070. 査読有

4) Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE, Pepper MS, Zawieja DC, Ran S. (2010) Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. **Blood.** 115 (2): 418-429. 査読有

5) Harada K, Yamazaki T, Iwata C, Yoshimatsu Y, Sase H, Mishima K, Morishita Y, Hirashima M, Oike Y, Suda T, Miura N, Watabe T, Miyazono K. (2009) Identification of Prox1 targets during in vitro vascular differentiation from embryonic stem cells: functional roles of HoxD8 in lymphangiogenesis. **J Cell Sci.** 122 (21): 3923- 3930. 査読有

6) Sase H, Watabe T, Kawasaki K, Miyazono K, Miyazawa K. (2009) VEGFR2-PLCgamma1 axis is essential for endothelial specification of VEGFR2+ vascular progenitor cells. **J Cell Sci.** 122 (18): 3303-3311. 査読有

7) Yamazaki T, Yoshimatsu Y, Morishita Y, Miyazono K, Watabe T. (2009) COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. **Genes Cells.** 14 (3): 425-434. 査読有

8) Oka M, Iwata C, Suzuki HI, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T, Komuro A, Kano MR, Miyazono K. (2008) Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis. **Blood.** 111 (9): 4571-4579. 査読有

9) Iwata C, Kano MR, Komuro A, Oka M, Kiyono K, Johansson E, Morishita Y, Yashiro M, Hirakawa K, Kaminishi M, Miyazono K.

(2007) Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis. **Cancer Res.** 67 (21): 10181- 10189. 査読有

[学会発表] (計 11件)

1) 吉松康裕、他. Prox1 結合因子である Ets-2 のリンパ管新生における役割. 第 17 回日本血管生物医学会. 平成 21 年 10 月 9 日、東京・東京大学安田講堂

2) 鈴木夕佳、他. BMP-9 は ALK-1 を介して胚性幹細胞由来血管内皮細胞の増殖を亢進する. 第 17 回日本血管生物医学会. 平成 21 年 10 月 9 日、東京・東京大学安田講堂

3) Iwata C, 他. Microstructural changes of lymphatic endothelium in metastatic lymph node. 第 68 回日本癌学会学術総会. 平成 21 年 10 月 3 日、横浜・パシフィコ横浜

4) Yamazaki T, 他. COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. 第 16 回日本血管生物医学会. 平成 20 年 12 月 3 日、金沢・石川県立音楽堂交流ホール

5) Harada K. et al. Functional roles of HoxD8 during lymphangiogenesis. 第 16 回日本血管生物医学会. 平成 20 年 12 月 3 日、金沢・石川県立音楽堂交流ホール

6) Watabe T, 他. Snail is required for TGF-beta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. 第 16 回日本血管生物医学会. 平成 20 年 12 月 3 日、金沢・石川県立音楽堂交流ホール

7) 原田香織、他. リンパ管新生における HoxD8 及び HoxD9 の機能. 第 60 回日本細胞生物学会大会 平成 20 年 7 月 1 日、横浜・パシフィコ横浜

8) Watabe T, 他. Roles of Ets family members in the regulation of Prox1-mediated lymphatic differentiation of endothelial cells. The 15th International Vascular Biology Meeting. 平成 20 年 6 月 4 日、オーストラリア、シドニー・Sydney Convention & Exhibition Centre

〔その他〕

ホームページ等

<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

新聞掲載

日本経済新聞朝刊(平成19年11月5日)「消炎・鎮痛剤：がん転移を抑制．東大、動物実験で効果確認」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮園 浩平 (MIYAZONO KOHEI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90209908

### (2) 連携代表者

渡部 徹郎 (WATABE TETSURO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00334235

### (3) 連携代表者

岩田 要 (IWATA CANAME)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50511391