

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570176

研究課題名(和文) 転写ネットワークによるリンパ管分化の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of Prox1-mediated lymphatic differentiation of endothelial cells by transcriptional regulators

研究代表者

渡部 徹郎 (WATABE TETSURO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00334235

研究成果の概要：リンパ管は生体内の恒常性の維持など生理的に重要な役割を担っていると同時に悪性腫瘍の転移などの病的状態にも関与している。本研究においては Prox1 を中心とした転写因子のネットワークによるリンパ管分化の制御機構の包括的な解明を試みた。成果として血管内皮細胞がリンパ管内皮細胞へと分化する過程で Prox1 が重要な役割を果たすこと、そして Ets 2 と 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 の機能をそれぞれ正と負の方向に調節していることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ管は末梢組織で血管から漏出した間質液、タンパク質、細胞などを血管系へと環流することにより血液の量や組成を一定に保ち、成体の恒常性を維持している。この能力のために、癌組織から細胞を運んでリンパ節転移を引き起こしたりもする。またリンパ管の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、乳癌等の手術後に苦しむ患者の数は多い。このためリンパ管形成機構

の解明は医学的に必要性が高いが、その研究の歴史は比較的新しく、未解明な点が多く残されている。ホメオボックス転写因子 Prox1 は脈管系においてはリンパ管内皮細胞に特異的に発現し、そのノックアウトマウスにおいて静脈からのリンパ管の発芽が停止することから、リンパ管発生に必須の転写因子であることが知られている。しかし Prox1 の転写活性の調節機構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

本研究においては Prox1 そのものの機能ならびに Prox1 の転写活性を調節する転写因子と Prox1 の標的因子の機能を解析することにより、転写因子のネットワークによるリンパ管分化の制御機構の包括的な解明を試みた。

### 1) Prox1 の細胞種特異的な転写共役因子の同定とリンパ管分化における機能解析

血管・リンパ管内皮細胞に特異的に発現する Prox1 の転写共役因子を同定する。同定された候補因子の機能 (Prox1 の転写活性に与える影響) を検討することにより Prox1 の細胞種特異的な転写活性制御機構を明らかにする。

### 2) Prox1 の標的遺伝子の網羅的解析とリンパ管分化における機能解析

マイクロアレイを用いた解析により Prox1 の標的遺伝子を網羅的に同定する。得られた候補遺伝子の機能を検討することにより、Prox1 によるリンパ管分化誘導の実行因子を同定する。

## 3. 研究の方法

マウス胚性幹 (ES) 細胞由来血管細胞 (MESEC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) ならびにヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 (HDLEC) を用いて Prox1、Ets-2、COUP-TFII のリンパ管形成に与える作用を検討した。各因子の機能を検討するにあたって、その発現を誘導するためにはアデノウィルスを、発現を低下させるには siRNA を用いた。またリンパ管形成の指標として、リンパ管内皮細胞の特異マーカーである血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) 3 の発現と VEGF-C (VEGFR 3 に対するリガンド) に対する走化性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Prox1 の機能解析

まず我々は血管内皮細胞がリンパ管内皮細胞へと分化する過程での Prox1 の機能を解析するために、MESEC および HUVEC における Prox1 の作用を検討した。血管内皮細胞において Prox1 を発現させることで、VEGFR 3 の発現が亢進し、VEGF-C に対する走化性が上昇した。

### (2) Ets-2 の機能解析

次に我々は Prox1 の転写活性を調節する共役因子を同定するために yeast two hybrid screening により Prox1 結合因子の同定を試

みた。得られた候補因子の一つである Ets-2 は血管発生においても重要な役割を果たす転写因子であるが、Prox1 と協調して VEGFR 3 の発現を誘導することによりリンパ管新生を亢進することが示された。

### (3) COUP-TFII の機能解析

また Prox1 に結合するリガンド未同定の核内受容体である COUP-TFII のリンパ管新生における役割について検討した。COUP-TFII は静脈血管内皮細胞において発現するが、リンパ管の発生過程においては静脈の一部において Prox1 ホメオボックス転写因子が発現する。Prox1 は血管内皮細胞増殖因子受容体 3 (VEGFR3) などのさまざまなリンパ管内皮細胞 (LEC) マーカーの発現を誘導することにより血管内皮細胞 (BEC) から LEC への分化を促進する。しかし Prox1 の転写活性の調節機構については未解明な部分が多い。本研究において我々は COUP-TFII が Prox1 の転写活性を調節することを示した。BEC と 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、そして 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) HoxD8 の機能解析

我々はマウス胚性幹細胞由来の血管内皮細胞 (MESEC) においてマイクロアレイを用いて Prox1 がリンパ管の成熟に重要な役割を果たす FoxC2 と Angiopoietin 2 (Ang-2) の発現を誘導することを見出した。さらにいままでもリンパ管形成においては役割がわかっていなかった HoxD8 の発現が Prox1 によって誘導されることが示された。Prox1 による HoxD8 発現誘導はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) ならびにヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 (HDLEC) 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示された。さらにマウス炎症性リンパ管新生モデルにおいて、アデノウィ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示された。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。HoxD8 が Prox1 の発現を亢進することから、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。

(5) 総括

以上の結果から Ets-2 と 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 の機能をそれぞれ正と負の方向に調節していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

- 1) Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. (2009) TTF-1 inhibits TGF- $\beta$  mediated epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Research*. 69:2783-2791. (査読有)
- 2) 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 to Cells* 14:425-434. (査読有)
- 3) Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, \*Watabe T (\*: corresponding author), Miyazono K. (2008) Snail is required for TGF- $\beta$ -induced endothelial mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 121:3317-3324. (査読有)
- 4) Nonaka H, Watabe T, Saito S, Miyazono K, Miyajima A. (2008) Development of stabilin2+ endothelial cells from mouse embryonic stem cells by inhibition of TGF- $\beta$ /activin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 375:256-260. (査読有)
- 5) Kawasaki K, Watabe T, Sase H, Hirashima M, Koide H, Morishita Y, Yuki K, Sasaoka T, Suda T, Katsuki M, Miyazono K, Miyazawa K. (2008) Ras signaling directs endothelial specification of VEGFR2+ vascular progenitor cells *Journal of Cell Biology*. 181:131-141. (査読有)

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

7) Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, \*Watabe T (\*: corresponding author), Miyazono K. (2008) BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and Angiopoietin-1/Tie2 signals. *Journal of Biochemistry*. 143:199-206. (査読有)

8) Moore ML, Teitell MA, Kim Y, Watabe T, Reiter RE, Witte ON, Dubey P. (2008) Deletion of PSCA increases metastasis of TRAMP-induced prostate tumors without altering primary tumor formation. *Prostate*. 68:139-151. (査読有)

9) Mishima K, Watabe T, Saito A, Yoshimatsu Y, Imaizumi N, Masui S, Hirashima M, Morisada T, Oike Y, Araie M, Niwa H, Kubo H, Suda T, Miyazono K. (2007) Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin  $\alpha 9$  and other signaling cascades. *Molecular Biology of the Cell*. 18:1421-1429. (査読有)

10) Ogawa K, Saito A, Matsui H, Suzuki H, Ohtsuka S, Shimosato D, Morishita Y, Watabe T, Niwa H, Miyazono K. (2007) Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. 120:55-65. (査読有)

[学会発表](計6件)

1. Watabe T, Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Miyazono K. 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 2008年12月4日 (金沢・石川県立音楽堂交流ホール)

2. Watabe T, Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Miyazono K.

Snail is required for TGF  $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells **第 67 回日本癌学会学術総会** 2008 年 10 月 28 日 (名古屋・名古屋国際会議場)

3. **渡部徹郎**リンパ管発生における転写・シグナルネットワークの役割 **第 29 回日本炎症・再生医学会** 2008 年 7 月 8 日 (東京・都市センターホテル)
4. **Watabe T**, Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Miyazono K. Snail is required for TGF  $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells **The 28<sup>th</sup> Sapporo Cancer Seminar International Symposium “TGF  $\beta$  signaling and cancer”** 2008 年 6 月 26 ~ 27 日 (札幌・北海道大学 学術交流会館大講堂)
5. **Watabe T**, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Roles of Ets family members in the regulation of Prox1-mediated lymphatic differentiation of endothelial cells. **The 15<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting** 2008 年 6 月 4 日 (Sydney Convention & Exhibition Centre, Sydney, Australia)
6. **Watabe, T.**, Yoshimatsu, Y., Yamazaki, T., Morikawa, M., and Miyazono, K. Regulation of Prox1 mediated lymphatic differentiation of endothelial cells by transcriptional regulators **The U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Program Workshop** 2008 年 3 月 20 日 (京都・京都ガーデンパレス)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

渡部 徹郎 (WATABE TETSURO)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 00334235

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし