

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590283
 研究課題名（和文） 癌の悪性化要因としての内皮間葉分化転換の誘導機構

研究課題名（英文） Study of the molecular mechanisms underlying endothelial-to-mesenchymal transition which promotes cancer progression

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：腫瘍血管内皮細胞の特性として癌の悪性化を促進する腫瘍関連線維芽細胞などの間葉系細胞へ転換(Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT)する能力が高いことが挙げられる。本研究において私は EndMT の誘導機構を詳細に検討した。まず私は MS-1 血管内皮細胞を用いて TGF- β による EndMT 誘導において Rho シグナルにより活性化される MRTFA の転写機能が重要な役割を果たすこと、そして BMP9 が TGF- β による EndMT を促進するが、FGF が抑制することを見出した。本研究の成果により、腫瘍組織において癌細胞の増殖と悪性化を調節するさまざまなサイトカインによるシグナルが EndMT をも調節することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Progression of cancer is induced by cancer associated fibroblasts (CAF). Recent reports have indicated that CAF is derived from tumor endothelial cells through endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). In the present study, we studied the molecular mechanisms underlying EndMT. Using MS-1 endothelial cells, I have found that activation of MRTFA transcription factor by Rho signals is necessary for TGF- β -induced EndMT. I also found that BMP-9 and FGF enhanced and suppressed the TGF- β -induced EndMT. These results suggest that signaling cascades mediated by multiple cytokines modulate the TGF- β -induced EndMT.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 平成 22 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 平成 23 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 平成 24 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：病態医科学

科研費の分科・細目：細胞生物

キーワード：癌、血管新生

1. 研究開始当初の背景：癌微小環境において癌細胞の増殖や悪性化を調節する因子として TGF- β などの複数種類のサイトカインが豊富に存在することが知られている。癌微小環境において癌の悪性化を促進する腫瘍関連線維芽細胞の一部は腫瘍血管内皮細胞

から内皮間葉移行(Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT)により生成することが近年の報告により示されており、EndMT を誘導するシグナルは癌治療の新たな標的として注目を集めている (図 1)。

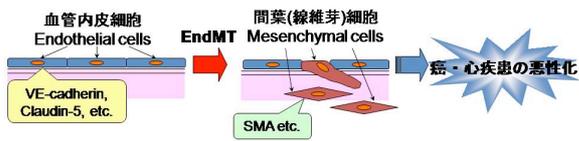


図 1. 内皮間葉移行(EndMT) 血管内皮細胞から EndMT により生成した間葉系細胞は癌等の病態を進行させる悪性化因子として働く。

我々は EndMT を調節する新たな因子として transforming growth factor (TGF)- β ファミリー因子に注目している (図 2)。

TGF- β Superfamily Signaling Pathways

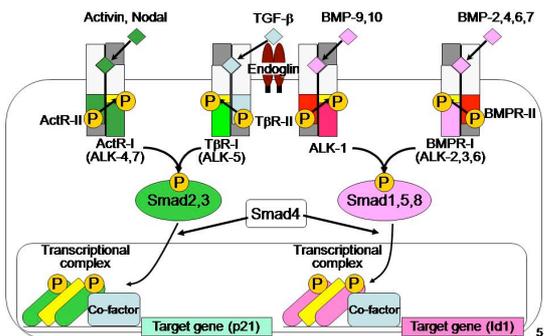


図 2. TGF- β ファミリーシグナルの概要

TGF- β や骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP) はその構造の類似性から TGF- β スーパーファミリーに属するペプチド因子である (5)。TGF- β ファミリーの因子 (TGF- β 1,2,3) はそれぞれ I 型 (T β R1, Activin receptor Like Kinase-5: ALK-5) と II 型 (T β R2) と呼ばれる 2 種類の受容体に結合してシグナルを伝達する。TGF- β との結合により T β R2 が T β R1 と複合体を形成すると恒常的に活性化された状態にあるセリン-スレオニン・キナーゼを有する T β R2 は T β R1 をリン酸化する。その結果、T β R1 のセリン-スレオニン・キナーゼが活性化され、TGF- β 型の R-Smad (Smad2, 3) をリン酸化する。リン酸化された R-Smad は Co-Smad (Smad4) と会合し、核内へと移行することで細胞内の下流へのシグナル (Smad 経路) が伝えられる。

その他の TGF- β スーパーファミリー因子に対する II 型受容体は哺乳類では T β R2 の他に 4 種類 (ActR2, ActRIIB, BMPRII)、I 型受容体は T β R1 (ALK-5) のほかに 6 種類 (ALK-1~4, 6, 7) が知られており、これらはアクチビンや BMP などの受容体として働く。I 型受容体のうち、ALK-1~3, 6 は BMP ファミリーと結合し、BMP 型の R-Smad (Smad1,5,8) を介して Smad2,3 とはシグナルを伝達する。TGF- β スーパーファミリーは I 型と II 型受容体に加えて多くの細胞で III 型受容体とよばれる膜タンパク質と結合する。III 型受容体にはベータグリカン (Betaglycan) とエンドグ

リン (Endoglin) があり、共に大型の細胞外ドメインを持ち 2 量体を形成する。特に Endoglin は血管内皮細胞などに特異的に発現し、とりわけ低酸素条件下など血管新生が盛んな時には高い発現を示すことなどから、血管新生における TGF- β ファミリーのシグナルに重要な役割を果たしていると考えられている。

TGF- β 受容体は Smad シグナル経路だけでなく Smad 以外のシグナル経路を活性化する。この中には Erk, JNK, p38 などの MAPK 経路、PI3K-Akt 経路、Rho-like GTPase などがある。これらの Non-Smad 経路はしばしば Smad シグナルと共同して細胞の増殖や分化を制御する。

TGF- β が EndMT を誘導することは我々を含む複数の研究室により明らかになっているが、その詳細な分子機序については不明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的: 本研究において私は TGF- β による EndMT の誘導を調節するシグナル伝達経路として下記を検討した。

- ① Rho シグナル
- ② 骨形成因子(BMP)-9 シグナル
- ③ 線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナル

3. 研究の方法: TGF- β により EndMT が誘導される血管内皮細胞として膵臓癌由来の MS-1 を用いた。EndMT 誘導の指標としては主に細胞形態の変化、間葉系細胞マーカーである SMA α 、SM22 α の発現などを用いた。

4. 研究成果:

- ① MS-1 血管内皮細胞に TGF- β を添加して 3 日間培養すると血管内非細胞のマーカーである VE-cadherin 発現が低下し、間葉系細胞のマーカーである SMA α の発現が上昇することから EndMT が起こっていることが観察された (図 3) の。

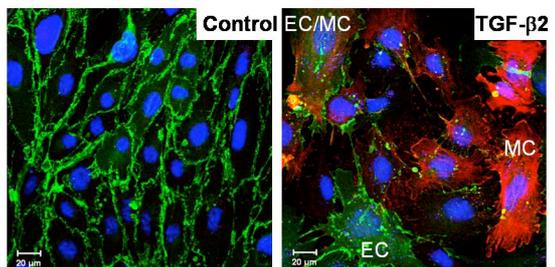


図 3. TGF- β による EndMT の誘導 MS1 血管内皮細胞 (Control : 左) を TGF- β 2 で処理 (右) すると、血管内皮マーカーである VE-cadherin (緑) の発現が低下し、間葉系マーカーである SMA (赤) の発現が上昇する。TGF- β で処理した群には血管内皮細胞(EC)と間葉系細胞(MC)に加えて中間段階の細胞 (EC/MC) が観察される。(青: 核染色)

による EndMT 誘導において Rho シグナルにより活性化される MRTFA の転写機能が重要な役割を果たすことを見出した。

③ BMP は中胚葉誘導ならびにさまざまな組織細胞の分化において重要な役割を果たすことから、そのシグナル伝達因子の欠損は初期発生ならびにさまざまな臓器形成において重篤な表現型を引き起こすことが報告されてきた。さらに遺伝性出血性末梢血管拡張症 (hereditary hemorrhagic telangiectasia: HHT あるいは Osler-Rendu-Weber 病) が BMP9 の受容体である ALK1 遺伝子の異常により引き起こされることや、肺動脈性肺高血圧症 Pulmonary Arterial Hypertension: PAH) の原因遺伝子として BMPR-II が同定されたことから、BMP シグナルの血管の発生と維持における役割に注目が集まっている。私は BMP9 が TGF- β による EndMT に対する影響を検討したところ、抑制的に作用することを見出した。

③ 癌の微小環境において集積する免疫細胞が分泌する TGF- β が EndMT を誘導することが示唆されている (図 4)。

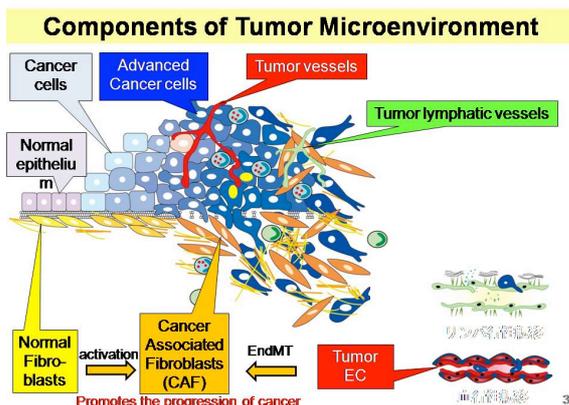


図 4. がん微小環境における構成因子炎症性細胞が分泌する TGF- β はがん細胞の EMT を誘導するのみならず、血管内皮細胞の EndMT を誘導する。

このような環境において血管内皮細胞が EndMT を起こしてしまうとがん細胞の成育に必要な腫瘍血管が崩壊してしまうため、腫瘍血管内皮細胞が EndMT を抑制する機序が作用していることが予想される。我々は FGF が TGF- β による EndMT の誘導を抑制することを見出した。

本研究の成果により、腫瘍組織において癌細胞の増殖と悪性を調節するさまざまなサイトカインによるシグナルが EndMT をも調節することが示唆された。

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 3 件)

1. 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. *Journal of Cell Science.* 123:1684-1692. (査読あり)
2. Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, **Watabe T.** (2012) TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *Journal of Biochemistry.* 143:199-206. (査読あり)
3. Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, **Watabe T,** Miyazono K. (2012) TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Biochemistry.* 151:205-216. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. **The 16th International Vascular Biology Meeting (Los Angeles, U.S.A.) 2010年6月19~23日** Watabe T, Yoshimatsu Y, Mihira H, Itoh T, Yuki K, Harada K, Iwata C, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Ets family members induce lymphangiogenesis via physical and functional interaction with Prox1.
2. **The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research Meeting (Toronto, Canada) 2011年6月15~18日** Watabe T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Miyazono K. BMP9 induces proliferation of mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells
3. **The 17th International Vascular Biology Meeting (Wiesbaden, Germany) 2012年6月2~5日** Watabe T, Kokudo T, Mihira H, Yoshimatsu Y, Miyazono K. Activation of Signaling and Transcriptional Networks during TGF- β -induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndMT).

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・准教授

研究者番号：00334235

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし