

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26460479

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮細胞におけるがん転移制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of cancer metastasis in tumor vascular endothelial cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$  は、正常細胞において増殖を抑制する。しかし、がん形成後期ではがん細胞自身がTGF- $\beta$  を産生して増殖・転移を促進してがんを悪性化させている。本研究はがん血管・リンパ管内皮細胞におけるTGF- $\beta$  シグナルが腫瘍形成・転移にどのような影響を与えるのかを検証した。その結果、腫瘍原発巣の血管内皮細胞におけるTGF- $\beta$  シグナルは、腫瘍血管新生を抑制し、血管の成熟を促し、腫瘍転移を抑制する役割があることが明らかとなった。また、リンパ管内皮細胞におけるTGF- $\beta$  シグナルは腫瘍リンパ行性転移を促進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：At the late stage of tumorigenesis, cancer cells produce TGF- $\beta$  which promotes tumor proliferation and metastasis. Although angiogenesis is important for the growth of cancer cells, it remains veiled how abundant TGF- $\beta$  plays a role in tumor angiogenesis. Hence, we have generated tamoxifen-inducible knockout mice of TGF- $\beta$  type II receptor; T<sup>R11f1/fl</sup>; Pdgfb-iCreER (T<sup>R11iEC</sup>). When Lewis lung carcinoma (LLC) cells were transplanted into T<sup>R11iEC</sup> mice, there was no difference in tumor weight compared to control mice. Tumors formed in T<sup>R11iEC</sup> mice had increased angiogenesis, but the blood vessels were fragile and leaky. As blood flow was not secured in tumors, hypoxia could be observed in the tumors from T<sup>R11iEC</sup> mouse. When cancer cells invading blood vessels were counted using FACS, we found that circulating tumor cells were increased in T<sup>R11iEC</sup> mice. These results suggest that the TGF- $\beta$  signal in endothelial cells inhibits angiogenesis and metastasis.

研究分野：腫瘍

キーワード：TGF 血管新生 がん転移 遺伝子改変マウス CreER

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生は個体の発生や恒常性維持だけでなく、がん細胞の増殖にも必要な過程である。血管新生に関与するサイトカインの中で、 $\nu$  は、血管を構成する血管内皮細胞(BEC)に加えて血管平滑筋細胞(VSMC)の機能を制御するだけでなく、ECの血管新生能を正負両面から調節する二面性を持つ。これまでに我々は、ロックアウト(KO)マウスを用いた解析から、TGF- $\beta$  シグナルはEC及びVSMC両方に作用して血管新生を制御すること、コンディショナルロックアウト(CKO)マウスを用いた解析から、TGF- $\beta$ /ALK5/Smad2/3 シグナルは血管新生の抑制ではなく血管の成熟過程に重要であることを明らかにしてきた。しかしながら、これらのKOマウスは血管形成の異常により胎生致死となるため、成体のBECにおけるTGF- $\beta$  シグナルの役割を解明することは不可能であった。

TGF- $\beta$  は、正常細胞において増殖を抑制する。しかし、がんの後期においては、細胞の増殖・転移促進、免疫抑制、血管新生誘導により、がんの悪性化に関与する。がん細胞は、血管新生・リンパ管新生を促進して栄養と酸素を入手するだけでなく転移経路を確保する。がんの原発巣が死に直結することは少なく、転移を抑制することができれば有効な抗腫瘍薬になり得る。しかし、がんの悪性化メカニズムの中で、腫瘍血管新生に関しては生体解析の困難さから、十分な解析が行われていなかった。

## 2. 研究の目的

出生後の血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞においてタモキシフェン誘導的に遺伝子をロックアウトできるマウスが開発され、腫瘍血管新生について解析可能となった。そこで本研究はこれらのマウスを利用して内皮細胞特異的にTGF- $\beta$  シグナルを欠損させ、腫瘍血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞におけるTGF- $\beta$  シグナルの異常と腫瘍転移の役割を明らかにし、腫瘍転移抑制可能な治療標的を同定することを目指した。さらに、TGF- $\beta$  シグナルの異常がマルファン症候群などの難治性血管疾患の原因と考えられているため、作成したマウスがこれらの難治性血管疾患のモデルマウスとなりうるのかについて検討した。

## 3. 研究の方法

(1) TGF- $\beta$  シグナル欠損による腫瘍血管への影響

T $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Pdgfb-icreER マウスにタモキシフェンを投与して遺伝子の欠損を誘導すると同時に、B16F10メラノーマ細胞またはLewis肺がん細胞(LLC)を移植した。Tx投与から12日および21日後に腫瘍を摘出して腫瘍形成や腫瘍微小環境及び転移に

与える影響について検討した。

(2) TGF- $\beta$  シグナル欠損と難治性血管疾患病変との関連性

T $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Pdgfb-icreER マウスにタモキシフェンを投与して遺伝子の欠損を誘導した。継時的に体重変化と血圧を測定し、遺伝子欠損が血管に与える影響を検証した。さらに継時的に病理切片を作成し、難治性血管疾患で見られる病態との関連性について検証を行った。

(3) TGF- $\beta$  シグナル欠損による腫瘍リンパ管への影響

これまでの解析から、TGF- $\beta$  シグナルが血管だけでなくリンパ管においても類似の安定化メカニズムにより制御していると予測されたため、腫瘍リンパ管新生についても同様に検討を行った。T $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Prox1-icreER マウス、またはT $\beta$ RII<sup>ff</sup>:VECadherin-creER マウスにタモキシフェンを投与して遺伝子の欠損を誘導した。タモキシフェン投与3週間後にB16F10メラノーマ細胞またはLewis肺がん細胞(LLC)を足底部に移植し、7日および21日後に脚部を摘出して腫瘍転移に与える影響を精査した。

## 4. 研究成果

(1) TGF- $\beta$  シグナル欠損による腫瘍血管への影響

腫瘍血管内皮細胞においてTGF- $\beta$  シグナルを欠損させると、腫瘍形の大きさや死亡に至るまでの時間に差は見られなかった。ところが、T $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Pdgfb-icreER マウスに形成された腫瘍はコントロールに比較して血液量の増加が肉眼的に認められた。この原因として、腫瘍血管新生の増加と出血を確認した。TGF- $\beta$  シグナルを欠損させると、脆弱な血管が形成されるため、腫瘍組織内での出血が確認され、出血部位ではアポトーシスが增加していることを明らかにした。しかし細胞増殖も同時に亢進しているため、腫瘍の大きさはコントロールと比較して変化が見られないことがわかった。

脆弱な血管が腫瘍微小環境に与える影響を明らかにするために、低酸素刺激にตอบสนองしてeGFPを発現する遺伝子を組み込んだp5HRE-GFP-LLC細胞をT $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Pdgfb-icreERおよびコントロールマウスに移植し、移植12日後に腫瘍を摘出して病理切片を作成した。その結果T $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Pdgfb-icreER マウスではeGFP陽性の面積が亢進しており、低酸素環境が悪化していることを見出した。

がん細胞が低酸素環境に曝露されると悪性度が増加することが知られている。そのため、T $\beta$ RII<sup>ff</sup>:Pdgfb-icreER マウスでは血液中に浸潤するがん細胞が増加する可能性が考えられた。そこで、eGFPを恒常的に発現するeGFP-LLCをマウスの背部皮下に移

植し、移植3週間後に採血して eGFP を指標に FACS 解析により血液中のがん細胞数を測定した。その結果、 $T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  マウスでは腫瘍循環細胞が優位に増加していることを発見した(図1)。

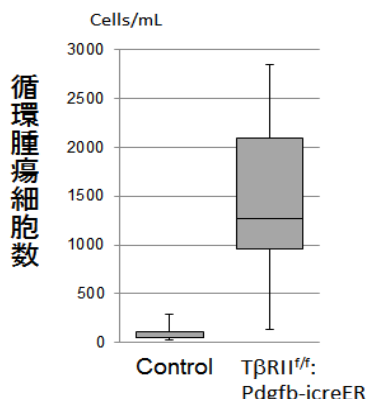


図1 血管内皮細胞特異的TGF-βシグナル欠損が転移与える影響

ところが、B16F10 メラノーマ細胞を用いて背部皮下移植した自然腫瘍転移実験では、 $T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  マウスにおいて肺転移が減少していた。この原因を転移臓器側の血管内皮細胞にあると考え、 $T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  およびコントロールマウスに B16F10 メラノーマを尾静注して肺への実験的転移実験を行った。その結果、 $T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  マウスでは転移が抑制される結果となり、予測が正しいことが証明された。

血管内皮細胞特異的 TGF-β シグナルの欠損は、がん細胞の接着に影響を与えると予測されたため、培養血管内皮細胞(bEnd.3)を TGF-β または TGF-β 阻害薬 (SB-431542) で処理したのちがん細胞を播種したところ、がん細胞の血管内皮細胞への生着が TGF-β 刺激で増加し、SB-431542 処理により低下することを見出した(図2)。

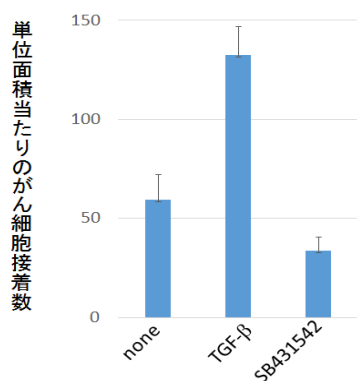


図2 TGF-βが細胞接着に与える影響

以上の結果から、腫瘍原発巣の血管内皮細胞における TGF-β シグナルは、腫瘍血管新生を抑制し、血管の成熟を促し、腫瘍転移を抑制する役割があることが明らかとなった。

(2) TGF-β シグナル欠損と難治性血管疾患病変との関連性

$T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  マウスにタモキシフェンを投与して遺伝子の欠損を誘導した。継時的に体重変化と血圧を測定したところ、タモキシフェン投与3ヶ月以内ではコントロールと比較して  $T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  マウスは体重も血圧も有意な変化は見られなかった。タモキシフェン投与6ヶ月では血圧の増加傾向が認められた。

経時的にマウスの病理切片を作成して血管内皮細胞特異的 TGF-β シグナル欠損の影響を検討したが、顕著な変化は見られなかった。しかし、肺泡の構造は少し変化が見られた。これらの結果から、 $T\beta RII^{ff};Pdgfb-icreER$  マウスは難治性血管モデルマウスとしての利用は難しいことが示唆された。

(3) TGF-β シグナル欠損による腫瘍リンパ管への影響

$T\beta RII^{ff};Prox1-icreER$  マウス、または  $T\beta RII^{ff};VECadherin-creER$  マウスにタモキシフェンを投与して遺伝子の欠損を誘導した。タモキシフェン投与3週間後に eGFP-LLC を足底部に移植し、7日にリンパ節転移を検証した。eGFP-LLC を利用することにより蛍光顕微鏡を利用できるため、B16F10 よりも早い段階で腫瘍転移を解析することが可能となった。 $T\beta RII^{ff};Prox1-icreER$  マウス、または  $T\beta RII^{ff};VECadherin-creER$  を利用したリンパ行性転移では、TGF-β シグナル欠損により膝窩リンパ節への転移が抑制された。以上の結果から、リンパ管内皮細胞における TGF-β シグナルは腫瘍転移を促進するシグナルであることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Nakano, N., Tsuchiya, Y., Kako, K., Umezaki, K., Sano, K., Ikeno, S., Otsuka, E., Shigeta, M., Nakagawa, A., Sakata, N., Itoh, F., Nakano, Y., Iemura, S.I., van Dinther, M., Natsume, T., Ten Dijke, P., and Itoh S. TMED10 protein interferes with transforming growth factor (TGF)-β signaling by disrupting TGF-β receptor complex formation. *J. Biol. Chem.*, **292**, 4099-4112 (2017). (査読有)
2. Takayama, K., Noguchi, Y., Aoki, S., Takayama, S., Yoshida, M., Asari, T., Yakushiji, F., Nishimatsu, S., Ohsawa, Y., Itoh, F., Negishi, Y., Sunada, Y., and Hayashi, Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. *J. Med. Chem.*, **58**, 1544-1549 (2015). (査読有)
3. Ohsawa, Y., Takayama, K., Nishimatsu, S., Okada, T., Fujino, M., Fukai, Y., Hagiwara,

H., Itoh, F., Tsuchida, K., Hayashi, Y., and Sunada, Y. The inhibitory core of the myostatin prodomain: its interaction with both type I and type II membrane receptors and potential to treat muscle atrophy. *PLOS ONE*, **10**, e0133713 (2015). (査読有)

4. Furuta, C., Miyamoto, T., Takagi, T., Noguchi, Y., Kaneko, J., Itoh, S., Watanabe, T., and Itoh, F. Transforming growth factor- $\beta$  signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment composed of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci.*, **106**, 1524-1533 (2015). (査読有)
5. Itoh, F., Watabe, T., and Miyazono, K. Roles of TGF- $\beta$  family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **32**, 98-106 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計 27 件)

1. Itoh, F., Saito, Y., Inagawa T., Miyamoto, T., Fruttiger M., Watanabe, T., Itoh, S. Endothelial TGF- $\beta$  signaling increases tumor malignancy. 19<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting., 2016/11. Boston, USA
2. Itoh, F. The minimum peptide from mouse myostatin precursor improves muscle wasting and cancer associated cachexia. TGF- $\beta$  Meeting, 2015/8, Uppsala, Sweden
3. Itoh, F. The role of TGF- $\beta$  signaling in tumor angiogenesis. 13th Japan Korea Joint Symposium on Vascular Biology Initiation of Vascular Convergence at Busan, 2015/10, Busan, Korea (招待講演)
4. Itoh, F., Takagi, T., Ichikawa, K., Fruttiger, M., Oliver, G., Itoh, S. and Watanabe, T. The role of TGF- $\beta$  signaling in blood- and lymph angiogenesis. 18th International Vascular Biology Meeting, 2014/4, Kyoto, Japan.
5. Itoh, F., Takayama, K., Noguchi, Y., Aoki, S., Watanabe, T., and Hayashi, Y. Development of novel potent and specific inhibitors of myostatin signaling. 10th BMP meeting. 2014/9, Berlin, Germany.
6. Itoh, F., Takagi, T., Ichikawa, K., Fruttiger, M., Oliver, G., Itoh, S., and Watanabe, T. TGF- $\beta$  signaling regulates blood- and lymph angiogenesis. 8th International Kloster Seon Meeting "Angiogenesis."2014/9, Bavaria, Germany.

〔図書〕(計 2 件)

1. 伊東史子 . 血管・リンパ管新生における TGF- $\beta$  シグナルの役割 . リンパ学 , **37**,71-73 (2014).
2. 伊東史子 . 薬学のための分子生物学 . 金田典雄、伊東進 編集、廣川書店 1-330 (2014).

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)  
名称 : マイオスタチン阻害ペプチド  
発明者 : 林良雄ほか  
権利者 : 同上  
種類 : 特許  
番号 : 特許第 6143270 号  
出願年月日 : 2013 年 1 月 31 日  
国内外の別 : 国内

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 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 : 7 0 6 0 2 5 8 2

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者