

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390283

研究課題名(和文)炎症性サイトカインによるリンパ管膜蛋白の制御機構

研究課題名(英文) Biochemical process of membrane-associated protein is induced by inflammatory cytokines in cultured lymphatic endothelial cells

研究代表者

平川 聡史 (Hirakawa, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50419511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管内皮細胞に発現するI型膜蛋白が、炎症性サイトカインによる刺激でectodomain sheddingを起こすことを明らかにした。MAPキナーゼ経路を介して膜表面のADAM17あるいはADAM10が標的分子を切断することを見出した。この蛋白切断は、増殖因子によるリンパ管内皮細胞の遊走に関わることが示唆された。本研究結果は、リンパ管新生のプロセスを解明する上で重要な知見であり、癌微小環境や慢性炎症におけるリンパ管形成の分子機構の一端を明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that inflammatory cytokines induces the ectodomain shedding of type I transmembrane proteins in cultured human lymphatic endothelial cells. ADAM17 is responsible for the shedding via the activation of MAP kinase pathway in response to vascular endothelial factor (VEGF)-A. Furthermore, the ectodomain shedding of membrane-associated protein enhanced the migration of cultured lymphatic endothelial cells in response to VEGF-A. Moreover, double immunofluorescence analysis revealed that the targeted overexpression of VEGF-A promoted the ectodomain shedding of the membrane associated protein cutaneous lymphatic vessels. Therefore, these results indicate, for the first time, that lymphangiogenesis is mediated by the biochemical process of membrane-binding proteins in lymphatic endothelial cells in vitro and in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：増殖因子 リンパ管新生 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

リンパ管研究は、リンパ管遺伝子が同定され、分子生物学的解析が可能になった。Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3, Prox1, podoplanin, LYVE-1, podoplanin をはじめ、1990年代リンパ管特異的遺伝子群が相次いで報告され、生体における機能が明らかになった。さらに、VEGFR-3 のリガンド VEGF-C,-D が同定され、リンパ管内皮細胞に特異的な増殖因子であることが明らかになった。その後、VEGF-C は個体発生におけるリンパ管新生のみならず、悪性腫瘍に随伴するリンパ管新生も誘導することが見出された(Skobe et al. Nat med 2001)。申請者はヒト血管及びリンパ管内皮細胞を選択的に培養し、遺伝子発現を網羅的に解析した(Hirakawa et al. Am J Pathol 2003)。この培養系から、VEGF-A が血管内皮細胞と同様に、リンパ管内皮細胞に強い増殖作用を持つことを見出した。この事実に基づき、皮膚特異的 K14-VEGF-A トランスジェニックマウス(TG)を用いて化学発癌試験を行い、マウス皮膚悪性腫瘍におけるリンパ管新生を検討した。この結果、腫瘍で過剰に発現する VEGF-A はリンパ管新生を促進することを見出した(Hirakawa et al. J Exp Med 2005)。

次に、申請者は K14-VEGF-C TG を用いた化学発癌モデルを行った。この研究課題では、転移リンパ節におけるリンパ管新生を同定した。最も重要な知見は、転移巣のみならず、転移以前、原発巣に由来する増殖因子によって、リンパ節では既にリンパ管新生が誘導されることを見出した点にある(Hirakawa et al. Blood 2007)。本研究課題から、悪性腫瘍のリンパ行性転移において、皮膚に始まりリンパ節にわたるリンパ管新生が、リンパ系転移の拡大に関わることを見出した。しかし、VEGF-A,-C 産生腫瘍に随伴するリンパ管の増殖制御機構は、依然不明なままである。

申請者が一貫して取り組んできた研究課題は、VEGF ファミリーがリンパ管内皮細胞に及ぼす生物活性を明らかにすることである。そして、今後新たに捉え直さなければならぬ重要な研究課題がある。それは、リンパ管内皮細胞に発現する細胞膜蛋白に着目し、いかに細胞増殖や管腔形成に関わっているかを見出すことである

Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE)-1 は、リンパ管内皮細胞に特異的に発現する I 型膜蛋白である。リンパ球のヒアルロン酸受容体である

CD44 と構造が似ており、LYVE-1 もヒアルロン酸受容体の1つと考えられている。CD44 は、細胞膜に局在する酵素により切断され、shedding を来すことが知られている。しかし、LYVE-1 が shedding を来すかどうかは、未だ不明である。

2. 研究の目的

毛細リンパ管に特異的に発現する LYVE-1 の shedding 機構について解明し、その生物学的意義を明らかにすることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

VEGF-A により LYVE-1 の切断が起きるのか、ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞を用いて LYVE-1 の ectodomain shedding を検討した。さらに下流のシグナルと探索すると MAPK が存在し、A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) の局在と活性を制御していることが推察された。従って、ADAM17 または ADAM10 は、HB-EGF や LYVE-1 を基質とし、細胞外領域で切断するか否かを検討した。リンパ管内皮細胞には ADAM17 が発現していることを、核酸及び蛋白レベルで確認し、LYVE-1 とその fusion protein は、アデノウイルス・ベクターを用いて発現させた。

(1) アルカリフォスファターゼを用いたレポーター・システムの構築と応用

LYVE-1 shedding を定量的に評価するために、アルカリフォスファターゼ (AP) と LYVE-1 を融合した蛋白質を、アデノウイルスを用いて発現させた。培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞に AP-LYVE-1 を発現した後、VEGF 組み換え蛋白で刺激した。培養上清を回収し、遊離した AP-LYVE-1 N 末断片を測定した。

(2) VEGF-A-VEGFR-2 シグナル経路の評価

組換え VEGF-A により LYVE-1 shedding が促進することを明らかにし、そのシグナルは VEGFR-2 のリン酸化と下流のシグナル分子の活性化に依存していることを検討した。具体的には、培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞を VEGFR-2 中和抗体 IMC-1121b で前処理した。その後、組換え VEGF-A を添加し、VEGFR-2 と ERK のリン酸化が抑制されることを検出した。さらに AP レポーターを用いた shedding 定量化アッセイを行い、

LYVE-1 の shedding が VEGFR-2 と ERK に依存しているか否かを検討した。IMC-1121b は、ImClone Systems (米国) から供与された。

培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞を、MAPK 阻害薬 (U0216) または MMP 阻害薬 (KB-R7785) で前処理した。Western blot 及び AP レポーターを用いた shedding 定量化アッセイで、LYVE-1 shedding が MMP に依存しているか否かを検討した。

(3) 切断酵素の同定

本申請課題では、ADAM17 及び ADAM10 に着目し、shedding 活性を評価した。それぞれの遺伝子産物を、siRNA を用いてノックダウンすることにより、切断が解除されるか否かを検討した。評価は、AP レポーターを用いた shedding 定量化アッセイで測定した。

(4) LYVE-1 細胞内領域を標識する抗体作成

市販される抗体で、LYVE-1 細胞内領域を認識し、かつ組織学的解析を行うことが可能なものはない。そこで、申請者らは大腸菌発現系で LYVE-1-GST 蛋白を作成し、ラットリンパ節法でモノクローナル抗体を作成することを試みた。

(5) 乾癬における LYVE-1 shedding の評価

乾癬は、VEGF-A が表皮角化細胞から産生され、皮膚で慢性炎症が形成される疾患の 1 つである。そこで、病変部のリンパ管で LYVE-1 shedding が起きているか病理組織学的に検討した。LYVE-1 shedding を検出する方法は、蛍光二重染色法に基づき、細胞外領域を認識する市販抗体と、新規に作成した細胞内領域を認識するモノクローナル抗体を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) LYVE-1 shedding は、VEGF-A 存在下培養リンパ管内皮細胞で促進する

LYVE-1 とアルカリフォスファターゼを融合した蛋白を構築した。LYVE-1 の N 末にシグナルペプチド(SS)及びアルカリフォスファターゼ(AP)を融合し、アデノウイルス・ベクターを発現することにより、LYVE-1 の ectodomain shedding を定量的に評価した。この結果、LYVE-1 の shedding は組換え VEGF-A により促進されることを見出した。

(2) LYVE-1 shedding は、VEGF-A -VEGFR-2 に依存する

VEGF-A による VEGFR-2 のリン酸化を、培養リンパ管内皮細胞を用いて評価した。VEGF-A 刺激後、細胞の溶解液を作成し、Western blot を行った。この結果、VEGFR-2 のリン酸化が起きること、さらに下流では ERK のリン酸化が起きることを見出した。1121b あるいは U0216 で前処理すると、VEGFR-2 のリン酸化及び ERK のリン酸化は完全に抑制された。AP レポーターを用いた shedding 定量化アッセイで、1121b、U0216 あるいは KB-R7785 で前処理した培養リンパ管内皮細胞が LYVE-1 shedding を促進するか測定した。その結果、VEGF-A で促進した LYVE-1 shedding は、1121b、U0216 あるいは KB-R7785 による前処理で解除された。従って、VEGF-A による LYVE-1 shedding は、VEGFR-2, ERK 及び MMP の活性化に依存することを見出した。

(3) ADAM17 及び ADAM10 が LYVE-1 切断酵素である

培養リンパ管内皮細胞に siADAM17 及び siADAM10 を導入して、LYVE-1 の shedding を評価した。この結果、ADAM17 及び ADAM10 の mRNA を不活化すると、VEGF-A で促進した LYVE-1 shedding は解除された。従って、ADAM17 及び ADAM10 は、LYVE-1 の切断酵素であることが示唆された。

(4) LYVE-1 細胞内領域を標識する抗体を作成した

LYVE-1-GST 及びヒト CD44-GST 融合蛋白を大腸菌で発現し、GST を切断した。その後、ヒト LYVE-1、マウス LYVE-1 及びヒト CD44 蛋白を精製した。この抗原をラットに免疫し、リンパ節から細胞を採取した後、ミエローマ細胞と細胞融合した。限界希釈後、ELISA 法に基づきハイブリドーマを選別し、クローン CTF1-2 を得た (図参照)。

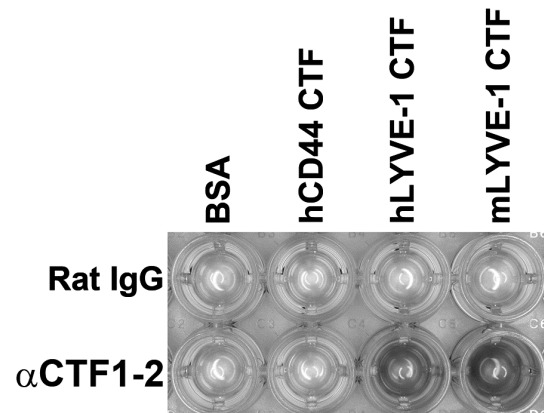


図 LYVE-1 特異的モノクローナル抗体 ヒト CD44 細胞内領域(CTF)及び LYVE-1 CTF に対する特異的反応を示す。

CTF1-2 に由来する抗体は、ヒト及びマウス LYVE-1 に反応する一方、ヒト CD44 には反応しないことを確認し、特異性が高い抗体であることを明らかにした(図参照)。

(5) 乾癬病変部における LYVE-1 shedding

乾癬病変部から病理組織標本を作成し、細胞外領域を認識する抗 LYVE-1 抗体と CTF1-2 で蛍光二重染色を行った。この結果、2 つの染色像はリンパ管近傍に位置しながら互いに異なっていた。すなわち、LYVE-1 は ectodomain shedding を受け、細胞外領域に遊離する可能性が示唆された。

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 12 件)

Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Ogata A, Horiguchi H, Odagiri H, Masuda T, Fukushima S, Jinnin M, Hirakawa S, Sawa T, Akaike T, Ihn H, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2

1. accelerates carcinogenesis by activating chronic inflammation and oxidative stress. *Mol Cancer Res.* 12:239-49, 2014.
2. Sano M, Sasaki T, Hirakawa S, Sakabe J, Ogawa M, Baba S, Zaima N, Tanaka H, Inuzuka K, Yamamoto N, Setou M, Sato K, Konno H, Unno N. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. *PLoS ONE.* 20;9(3):e89830, 2014.
3. Shimauchi T, Hirakawa S, Suzuki T, Yasuma A, Majima Y, Tatsuno K, Yagi H, Ito T, Tokura Y. Serum interleukin-22 and vascular endothelial growth factor serve as sensitive biomarkers but not as predictors of therapeutic response to biologics in patients with psoriasis. *J Dermatol.* 40:805-12, 2013.
4. Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J-I, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Hirasawa N, Ogasawara K, Tokura Y: High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 72:240-5, 2013.
5. Sakabe J, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T,

Kabashima K, Hibino T, Tokura Y. Kallikrein-related Peptidase 5 Functions in Proteolytic Processing of Profilaggrin in Cultured Human Keratinocytes. *J Biol Chem.* 14;288:17179-89, 2013.

6. Sakabe J, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y. Kallikrein-related Peptidase 5 Functions in Proteolytic Processing of Profilaggrin in Cultured Human Keratinocytes. *J Biol Chem.* 2013; 14;288(24):17179-89.
7. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinoshita S, Tokura Y, Katoh N. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2012 Dec;181(6):2217-24.
8. Liersch R, Hirakawa S, Berdel WE, Mesters RM, Detmar M. Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph nodes by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. *Int J Oncol.* 2012 Dec;41(6):2073-8.
9. Sasaki N, Shinjo M, Hirakawa S, Nishinaka M, Tanaka Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato K. A palm-top-sized microfluidic cell culture system driven by a miniaturized infusion pump. *Electrophoresis.* 2012; 33:1729-1735..
10. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol.* 2012; 39:366-74.
11. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y.

Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res.* 2011; 71:7502-12.

12. Kerjaschki D, Bago-Horvath Z, Rudas M, Sexl V, Schneckleithner C, Wolbank S, Bartel G, Krieger S, Kalt R, Hantusch B, Keller T, Nagy-Bojarszky K, Huttary N, Raab I, Lackner K, Krautgasser K, Schachner H, Kaserer K, Rezar S, Madlener S, Vonach C, Davidovits A, Nosaka H, Hämmerle M, Viola K, Dolznig H, Schreiber M, Nader A, Mikulits W, Gnant M, Hirakawa S, Detmar M, Alitalo K, Nijman S, Offner F, Maier TJ, Steinhilber D, Krupitza G. Lipoxigenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. *J Clin Invest.* 2011; 121:2000-12.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Hirakawa S. Nanophysiology to better understand the function of the vasculature in health and skin disease. The 24th Annual Meeting of The Korean Society for Investigative Dermatology. Seoul, South Korea. March 28-29, 2014.
2. Hirakawa S. A functional role of LYVE-1 in VEGF-A-induced lymphangiogenesis and psoriasis. The 61st annual Montania Symposium. Gleneden Beach, Oregon, October 11 - 15, 2012.
3. Hirakawa S. Biological importance of nodal lymphangiogenesis in tumor metastasis. Workshop Classic and Modern in Angiogenesis and Lymphangiogenesis. Timisoara, Romania. May 22-23, 2012.
4. Hirakawa S. Lymphatic vessels in inflammation and tumor metastasis. EC8 Zurich 2011. 8th International Symposium on the Biology of Endothelial cell. June

15-18, 2011. Zurich, Switzerland.

5. Hirakawa S. Pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. World Congress of Dermatology 2011. May 24. Seoul, South Korea. 2011.
6. 平川聡史. 皮膚と循環：血管・リンパ管から考える病態生理. 第 90 回日本生理学会大会. シンポジウム 招待講演. 東京.平成 25 年 3 月 27 日 - 29 日.
7. 平川聡史. New approaches for patho-physiological function in cutaneous lymphatic vessels. 第 36 回日本リンパ学会総会 シンポジウム 3. 東京.平成 24 年 6 月 30 日.
8. 平川聡史. リンパ管新生とリンパ節転移の基礎的解析. 第 35 回日本リンパ学会総会 シンポジウム 3：リンパ行性癌転移. 指定演題. 東京.平成 23 年 6 月 4 日.
9. 平川聡史. 癌とリンパ管新生. 第 100 回日本病理学会総会 シンポジウム 2 腫瘍と間質 分子細胞組織からのアプローチ シンポジウム 招待講演. 横浜.平成 23 年 4 月 28 日.
10. 平川聡史. VEGF-A induces the ectodomain shedding of LYVE-1 via MAPK pathway in cultured lymphatic endothelial cells 第 69 回日本癌学会学術総会 平成 22 年 9 月 22 - 24 日 大阪.

11.

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 平川聡史、母斑，血管腫・脈管形成異常、山口徹、今日の治療指針、医学書院、東京都、pp1127、2013 年.
- (2) 平川聡史、紫斑、瀧川雅浩、南江堂、東京都、pp63-64、2013 年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：分子標的薬の皮膚系細胞に対する傷害性を定量評価する方法
発明者：山内豊彦、青島正浩、平川聡史。

権利者：浜松ホトニクス株式会社、浜松医科大学
種類：特願
番号：2013-179143
出願年月日：2013年8月30日
国内外の別：国内

名称：血管透過性亢進抑制作用の評価方法
発明者：山内豊彦、平川聡史、山下 豊、
戸倉新樹。
権利者：浜松ホトニクス株式会社、浜松医科大学
種類：特願
番号：2013-034570
出願年月日：2013年2月25日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/derm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)
浜松医科大学医学部 准教授
研究者番号：50419511

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)
愛媛大学・プロテオ医学研究センター・
教授
研究者番号：60202272