

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591348

研究課題名（和文） リンパ管新生：膜結合型増殖因子による機能制御機構

研究課題名（英文） Induction of lymphangiogenesis by membrane-binding growth factors

研究代表者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419511

研究成果の概要（和文）：リンパ管内皮細胞に発現するI型膜蛋白のectodomain sheddingを同定した。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。リンパ管新生のプロセスを解明する上で、重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that type I transmembrane proteins undergo ectodomain shedding in cultured human lymphatic endothelial cells. ADAM17 or ADAM10 is responsible for shedding via the activation of MAP kinase pathway. These results indicate that lymphangiogenesis is mediated by the biochemical process of membrane-binding proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脈管生物学、炎症性皮膚疾患における脈管動態、皮膚癌における転移機序

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学（皮膚生理学）

キーワード：血管新生因子、シグナル伝達、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

1990年代、Prox1, LYVE-1, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3, podoplaninをはじめ、リンパ管特異的遺伝子群が相次いで報告され、生体における重要な機能が明らかとなった。さらに、VEGFR-3のリガンド VEGF-C,-D がリンパ

管内皮細胞に特異的な増殖因子であることが同定され、2001年には VEGF-C,-D が悪性腫瘍に随伴するリンパ管新生を誘導することが見出された。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することを可能とした。ここで最も重要な発見は、VEGF-Aが血管内皮細

胞に止まらず、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点である。この事実に基づいて、申請者はマウス皮膚悪性腫瘍におけるリンパ管新生に着目し、K14-VEGF-ATGを用いた化学発癌モデルから、リンパ管新生におけるVEGF-Aの重要な役割を見出した(Hirakawa et al. *J Exp Med* 2005)。すなわち、VEGF-Aは悪性腫瘍において強力にリンパ管新生を誘導し、この結果リンパ節転移が促進されることを明らかにした。

さらにK14-VEGF-C TGを用いた化学発癌モデルでは、皮膚原発巣に止まらず、転移リンパ節におけるリンパ管新生を同定し、さらに転移以前、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(Hirakawa et al. *Blood* 2007)。すなわち、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密接に関与し、個体システム破綻の一因たることを申請者は新たに突きとめた。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。VEGFシグナルは、内皮細胞膜表面に分布するVEGF受容体あるいはneuropilinを介することが一般に知られる。従って、従来のVEGFシグナル研究は、VEGF-VEGF受容体/neuropilinに主眼をおき、細胞内シグナルを詳細に解析したものである。しかし、今後新たに捉え直さなければならない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を同定し、その増殖促進機序やリンパ管新生に及ぼす効果を検討することである。

EGFファミリーは、代表的な膜結合型増殖因子群である。Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)は、膜型メタロプロテアーゼによって切断される。N-terminal fragment (NTF)はtransactivationにより細胞膜表面のEGF受容体に結合し、細胞内シグナルを伝達する。一方、sheddingにより細胞内に生じたHB-EGFのCTFは核内に移行し、リプレッサー(転写因子)と結合することにより、これを核外輸送する。この結果、細胞定常状態における抑制シグナルは解除

され、EGF受容体からの促進シグナルと協調することにより、細胞増殖を誘導することが明らかとなった(Nanba et al. *J Cell Biol* 2003)。

## 2. 研究の目的

リンパ管内皮細胞に対する生理活性物質は、VEGFファミリーをはじめとする分泌型増殖因子が近年複数同定され、詳細なシグナル機構が解明されつつある。しかし、リンパ管内皮細胞における膜結合型増殖因子の存在及びその生物活性、あるいはリンパ管内皮細胞に特異的に発現する膜蛋白のプロセッシング機構については、世界的にもいまだ全く報告がない。従って、本研究課題では代表的な膜結合型増殖因子であるEpidermal growth factor (EGF)ファミリーとリンパ管特異的I型膜蛋白lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE)-1に着目し、膜蛋白のsheddingによる活性化をヒト由来リンパ管内皮細胞で新たに同定する。

## 3. 研究の方法

HB-EGF及びLYVE-1 sheddingの分子機構を解明するために、ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞を用いてHB-EGFまたはLYVE-1のectodomain sheddingを検討した。さらに下流には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る。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可能性がある。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、HB-EGF及び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

Ectodomain sheddingを効率良く評価するために、アルカリフォスファターゼ(AP)とHB-EGFまたはLYVE-1を融合した蛋白質を発現させた。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する。培養上清を回収し、遊離したAP-LYVE-1 N末断片を定量的に評価した。

(2) VEGF-A-VEGFR-2 シグナル経路の評価

炎症性サイトカイン VEGF-A による shedding が、VEGFR-2 とその下流シグナルに依存していることを検討した。

(3) 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。VEGF-A 添加後、VEGFR-2 と ERK のリン酸化が抑制されることを Western blot で検出した。さらに AP レポーター・アッセイを行い、VEGFR-2 の不活化により HB-EGF または LYVE-1 の shedding が解除されることを検討した。IMC-1121b は、ImClone Systems (米国) から供与された。

(4) 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。同様に、Western blot 及び AP レポーター・アッセイで、HB-EGF または LYVE-1 shedding が解除されることを検討した。

(5) 切断酵素の同定

Ectodomain shedding は、ADAM が切断酵素である場合が多い。本申請課題では、リンパ管内皮細胞に発現する ADAM17 及び ADAM10 に着目した。siRNA を用いてノックダウンすることにより、切断が抑制される (shedding が解除される) ことを検討した。評価は、AP レポーターを用いて定量的に測定した。

4. 研究成果

(1) アルカリフォスファターゼを用いたレポーター・システムを構築した

Fusion protein を図 1 A のごとくデザインした。HB-EGF 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・ベクターを構築 ectodomain shedding を効率良く誘導した。さらに、添加した VEGF の濃度も検討し、VEGF-A が 50 ng/ml で shedding を誘導する一方、VEGF-C 及び VEGF-D では 500 ng/ml を要した。LYVE-1 を用いた検討でも、同様の結果を得た (図 1 B)。

次に、VEGF-A による VEGFR-2 のリン酸化を評価した。VEGF-A 刺激後、リンパ管内皮細胞の

VEGFR-2 はリン酸化されることが Western blot から明らかとなった (図 2A)。

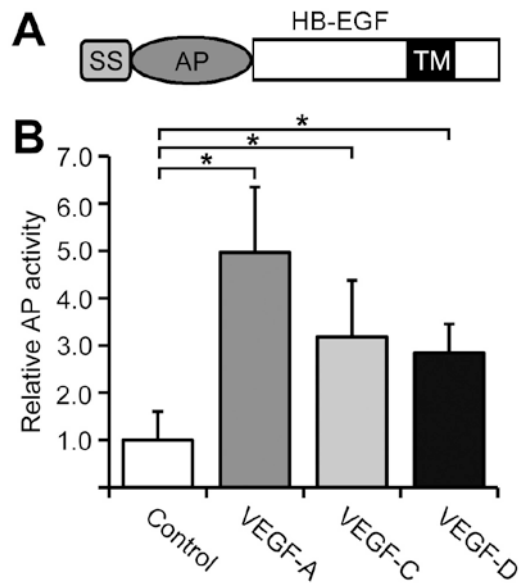


図 1 アルカリフォスファターゼ融合蛋白の発現及び shedding の評価

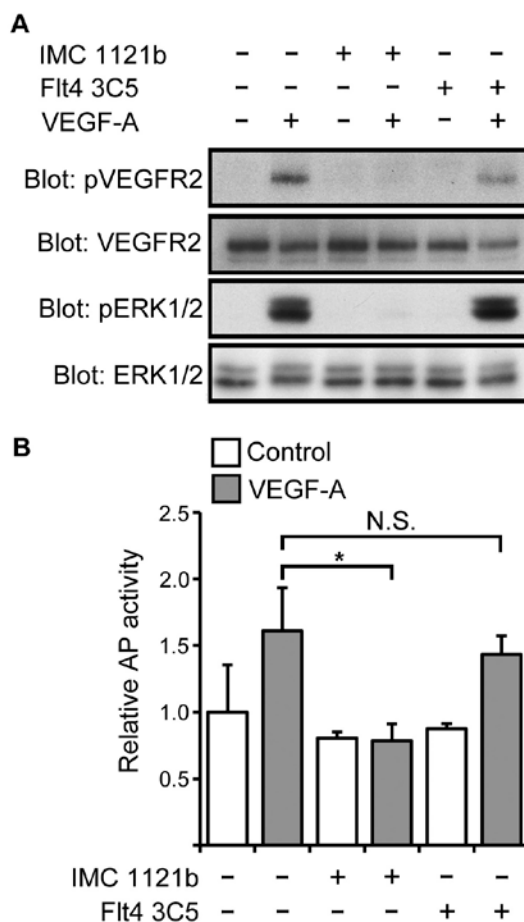


図 2 Shedding は VEGFR-2 に依存する

IMC 1121b 存在下では、VEGFR-2 のリン酸化は阻害された。さらにさらに、ERK のリン酸化を検討した。VEGF-A 刺激により ERK のリン酸化が誘導された。しかし、IMC 1121b 存在下では、ERK のリン酸化は完全に抑制された。この結果、リンパ管内皮細胞では、VEGF-A のシグナルは VEGFR-2 を介して ERK をリン酸化することが明らかとなった。LYVE-1 に対する検討でも、同様の結果を得た。

(3) VEGF-A 存在下、HB-EGF の shedding を評価した。VEGF-A 依存性に shedding は誘導され、この shedding は IMC 1121b または U0126 存在下で完全に抑制された。従って、VEGF-A による shedding は MAP キナーゼ経路に依存することが明らかとなった。LYVE-1 を用いた検討でも、同様の結果を得た (図 2B, 図 3 B)。

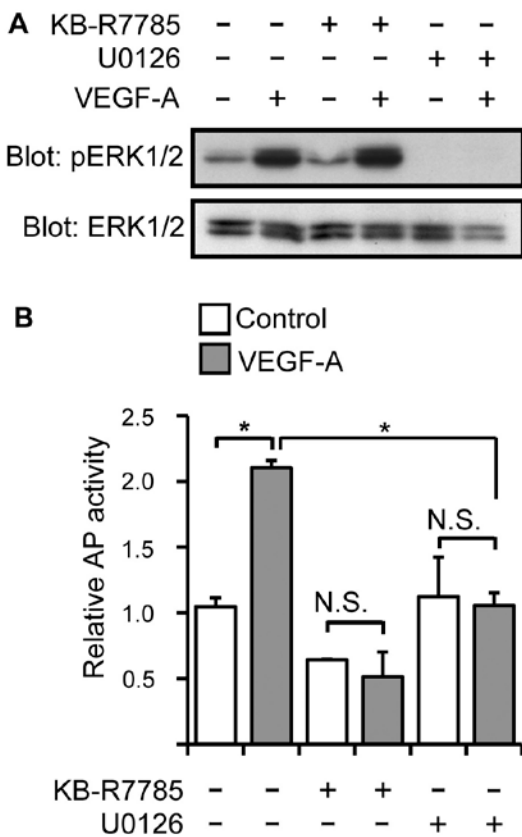


図 3 Shedding は MMPs に基づく

(4) リンパ管内皮細胞を MMP 阻害薬 KB-R7785 で処理すると、ERK のリン酸化は阻害されない (図 3 A) しかし、この条件では HB-EGF の shedding は解除されることが明らかとなった。従って、リンパ管内皮細

胞における shedding は膜表面に存在する MMP に依存することが示唆された。LYVE-1 を用いた検討でも、同様の結果を得た (図 3 B)。

(5) リンパ管内皮細胞における膜蛋白の切断酵素を検討し、ADAM17 または ADAM10 を同定した。siRNA で ADAM10 または ADAM17 をノックダウンし、リンパ管内皮細胞膜表面における shedding を評価した。この結果、ADAM10 または ADAM17 をノックダウンすることにより HB-EGF の shedding は解除された。同様の結果を、LYVE-1 を用いた検討で得た (図 4)。

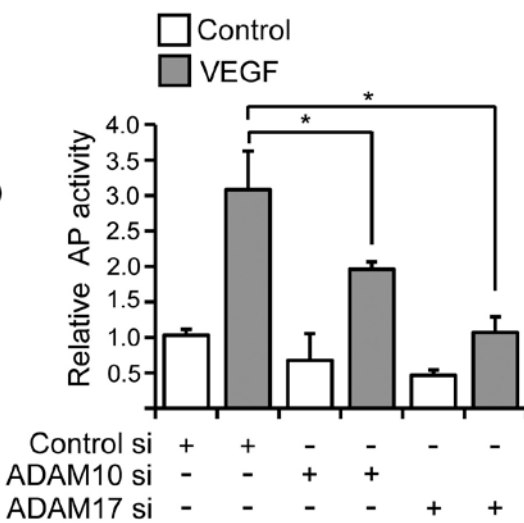


図 4 Sheddase は ADAM17 または ADAM10 である

#### 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 11 件)

- Hirakawa S. Regulation of pathological lymphangiogenesis requires factors distinct from those governing physiological lymphangiogenesis. *J Dermatol Sci.* 2011; 61: 85-93. 査読有
- Hirakawa S, Tanemura A, Mori H, Katayama I, Hashimoto K. Multiple lymphadenopathy as an initial sign of extramammary Paget's disease. *Br J Dermatol.* 2011; 164:200-3. 査読有
- Hirakawa S, Okazaki H, Sayama K, Tohyama M, Hashimoto K. Possible association of vascular endothelial growth factor with the development of edema in drug-induced hypersensitivity syndrome. *J Dermatol.* 2011; 38:292-4. 査読有
- Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y,

Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. PPAR $\gamma$  mediates innate immunity by regulating the  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2010; 60: 179-86. 査読有

5. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K. E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem*. 2010; 285: 30042-9. 査読有

5. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K. Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. *PLoS ONE* 2010; 5:e11275-84. 査読有

6. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J Dermatol Sci*. 2009; 56:188-95. 査読有

7. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K. Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis: Role of Tumor-induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. *Am J Pathol*. 2009; 175:2235-48 査読有

8. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K. IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol*. 2009; 39: 2779-88. 査読有

9. Isokane M, Hieda M, Hirakawa S, Shudou M, Nakashiro K, Hashimoto K, Hamakawa H, Higashiyama S. Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell*

*Sci*. 2008; 121: 3608-18. 査読有

10. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K. The NF-kappaB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol*. 2008; 20: 901-9. 査読有

11. Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K. PPAR $\gamma$  is an important transcription factor in  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci*. 2008; 50: 53-60. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 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.

2. 平川聡史. リンパ管新生: 癌リンパ行性転移と皮膚炎症における役割 第 83 回日本薬理学会年会 シンポジウム 平成 22 年 3 月 16-17 日 大阪.

3. 平川聡史. Functional role of tumor-associated lymphatic vessels in lymph node metastasis (口演: 一般演題) 第 68 回日本癌学会学術総会 平成 21 年 10 月 1-3 日 横浜.

4. 平川聡史. 皮膚疾患とリンパ管新生: 病態解明を目指して 第 33 回日本リンパ学会総会 シンポジウム 平成 21 年 7 月 17 日、18 日 大阪.

5. 平川聡史. 橋本公二 リンパ管新生: がん組織におけるリンパ管の役割 第 25 回日本 DDS 学会 平成 21 年 7 月 3 日、4 日 東京.

6. 平川聡史. Intra-nodal lymphangiogenesis: a concept reflecting metastatic spread of tumors in the

lymphatic system 第34回日本微小循環学会年次総会 シンポジウム 平成21年2月21日 東京.

7. 平川聡史. リンパ管新生：乳房外 Paget 病におけるリンパ行性転移機序 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会（口演：一般演題）平成21年3月20日、21日 名古屋.

〔図書〕（計1件）

1. Detmar M, Hirakawa S. MOSBY ELSEVIER. Vascular Biology. Textbook of Dermatology, 2nd ed. Bologna J et al., eds.

2008. 11 ページ ( 1553, 1563 ).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

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