

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07430

研究課題名(和文) TGF-β - BMPシグナル均衡崩壊に起因する血管病変形成メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidating TGFβ-BMP Signaling Disruption and Vascular Anomalies.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内皮細胞特異的なBMPシグナルの欠損により、肺高血圧症モデルマウスを作成することができた。この遺伝子改変マウスの解析からは、肺高血圧症の発症メカニズムと治療薬の開発に繋がる可能性が高い。さらに、がん悪性化因子としても働くTGF-βは、腫瘍の血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞にも影響を与え、転移促進に働くことを明らかにした。内皮細胞のTGF-β阻害は、がん転移を抑制する治療薬の開発に繋がると思われる。また、TGF-βファミリーに属するミオスタチンの阻害薬により、効果的な筋肉増強効果を認めた。特にがん悪液質モデルマウスでは食事摂取量増加と筋肉消耗阻害が治療ポイントになることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症は予後不良の難病である。本研究で作成した遺伝子改変マウスは有望な肺高血圧症のモデルマウスと考えられ、今後の病態発症メカニズム解明や治療薬開発に役立つ可能性が高い。さらに、TGF-βシグナルは様々な側面で悪性的に働くことが示され、その阻害剤の開発は腫瘍転移抑制につながる可能性が高い。開発したミオスタチン阻害ペプチド・MID-35はアナモレリンとの併用治療により食餌摂取量と筋肉消耗を効果的に改善できることを見出した。がん悪液質患者の治療において食事摂取量増加と筋肉消耗阻害が治療ポイントになると期待される。

研究成果の概要(英文)：The analysis of this genetically modified mice, which exhibits endothelial cell-specific BMP signaling deficiency, had the potential to provide valuable insights into the mechanism of pulmonary hypertension development and the development of therapeutic drugs. Furthermore, it has been revealed that TGF-β, which also acts as a factor in cancer progression, affects tumor vascular endothelial cells and lymphatic endothelial cells, promoting metastasis. Inhibiting TGF-β in endothelial cells is believed to contribute to the development of therapeutic drugs that can suppress cancer metastasis. Additionally, the development of a TGF-β family member, myostatin, inhibitory peptide has shown effective muscle-enhancing effects. Particularly, in cancer cachexia model mice, it showed that increasing food intake and preventing muscle wasting are crucial aspects of treatment.

研究分野：実験病理学

キーワード：TGF-β 血管新生 がん転移 がん悪液質 BMP ミオスタチン

1. 研究開始当初の背景

TGF-β、骨形成因子 (BMP)、Activin を含む TGF-β ファミリー (図 1) は、生命維持に不可欠なサイトカインである。これらのシグナルの異常は、さまざまな疾患の原因となるほか、シグナルの過剰はがんの悪性化に関わることが知られている。TGF-β シグナル関連の分子をノックアウト(KO)したマウスでは、血管新生不全による胎生致死の表現型が数多く報告されている。ヒトでは、TGF-β ファミリーシグナルの異常が、家族性出血性末梢血管拡張症や肺動脈性肺高血圧症 (PAH) などの難治性血管疾患の原因であることが明らかとなっている。TGF-β ファミリーが血管の機能維持にも必須のシグナルであると考えられ、血管内皮細胞における TGF-β シグナルの役割を明らかにすることが重要であると考えられた。

「がん」は日本人の死亡原因第一の疾患である。がんによる患者の死亡には、原発巣が原因によるものは稀であり、むしろがんの転移巣形成が患者の予後不良と関連している。がんの転移経路には血行性転移、リンパ行性転移、播種性転移の3つのタイプが存在し、いずれも患者の予後不良に強く関連する。したがって、転移のメカニズムを明らかにすることは、効果的ながん治療薬につながると考えられた。

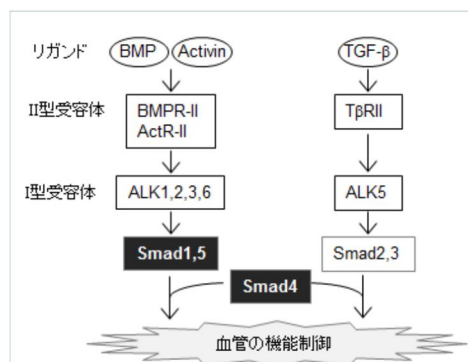


図1. TGF-βファミリーによるシグナル伝達機構
TGF-βファミリーは、細胞膜上のI型およびII型受容体キナーゼを介して、細胞内シグナル伝達分子Smadをリン酸化して、シグナルを核へ伝達する。Smad1,5はBMPシグナルを、Smad2,3はTGF-βシグナルを伝達しており、Smad4はすべてのシグナルに必須の分子である。

2. 研究の目的

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺動脈の狭窄や閉塞により肺動脈圧が上昇し、右心不全に至る可能性がある予後不良の難病である (告知番号 86)。PAHの原因遺伝子としてBMPのII型受容体 (BMPRII) とI型受容体 (ACVRL1/ALK1) の遺伝子変異が報告されているが、発症機序は未解明である。そこで本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、内皮細胞のTGF-β、BMPシグナルの異常が原因となる難治性血管疾患の発症メカニズムを明らかにすることを目標とした。さらに、腫瘍形成後期ではがん細胞自身がTGF-βを産生しがん悪性化を誘導することが明らかとなっていたため、がん微小環境に豊富に存在するTGF-βが腫瘍の転移経路となる血管とリンパ管に与える役割を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(a) 難治性血管疾患の血管病変発症メカニズムの解明

PAH患者で確認されたBMPRIIの変異ではBMPシグナルが完全に遮断されない。そこで、内皮細胞特異的にBMPシグナルを遮断するために、Cdh5-BAC-iCreERマウスを利用した。このマウスとBMPシグナルを伝達する分子Smad1およびSmad5のコンディショナルノックアウトマウスを交配し、Smad1^{F/F}; Smad5^{F/F}; Cdh5-BAC-iCreER (Smad1/5ΔiBEC) マウスを作成した。このマウスにタモキシフェン (Tx) を投与して標的遺伝子をノックアウトして影響を解析した。

(b) 腫瘍転移メカニズムの解明

血管内皮細胞特異的、またはリンパ管内皮細胞特異的にTGF-βシグナル伝達を遮断するために、Pdgfb-icreERマウス、またはProx1-CreERT2マウスを利用した。これらのマウスと、TGF-βII受容体 (TβRII) のコンディショナルノックアウトマウスを交配し、TβRII^{F/F}; Pdgfb-icreER (TβRIIΔiBEC) マウスとTβRII^{F/F}; Prox1-CreERT2 (TβRIIΔiLEC) マウスを作製した。このマウスにTxを投与して標的遺伝子をノックアウトするとともに、肺がん細胞 (Lewis lung carcinoma; LLC) 細胞を背部皮下に移植して腫瘍形成に与える影響を確認した。また、恒常的にGFPを発現するLLC (LLC-GFP) 細胞を背部または足底部部に移植し、血行性転移、リンパ行性転移に与える影響を検証した。

(c) TGF-βファミリー阻害薬の開発

TGF-βファミリーはがんの悪性化に関与することが知られている。そこで、TGF-βファミリーに属するミオスタチンの新規阻害薬を開発し、その治療効果を検証した。ミオスタチンは骨格筋から産生されるサイトカインであり、筋肉の分化を抑制する。がんの末期患者では、継続的な筋肉量の減少が認められるがん悪液質が顕著となるが、ミオスタチンシグナルの阻害が有効であ

る可能性が示されていた。そこで、既存のがん悪液質治療薬であるアナモレリン（経口グレリン様作用薬）との併用治療効果を、がん悪液質モデルマウスで検証した。

4．研究成果

(a) 難治性血管疾患の血管病変発症メカニズムの解明

Cdh5 プロモーターを利用して、血管・リンパ管内皮細胞特異的に Smad1 と Smad5 を欠損させると、肺高血圧症様の病態を示し、マウスは早期に死亡した。肺の血管構造を可視化すると、肺高血圧症患者で認められるような血管の構造異常を示した。

(b) 腫瘍転移メカニズムの解明

< 血行性転移の解析 > TβRIIΔiBEC マウスに Tx を投与して、TβRII をノックアウトするとともに LLC 細胞を背部皮下に移植した。12 日後に形成された腫瘍から病理切片を作成し、血管構造を比較すると、コントロールマウスよりも TβRIIΔiBEC マウスでは抗 PECAM-1 抗体陽性面積が増加しており、血管新生が促進されることが明らかとなった。さらに、LLC-GFP を用いた解析では、細胞移植 3 週間後に肺を摘出すると、コントロールマウスと比べて、TβRIIΔiBEC マウスでは肺転移が抑制されていた。

< リンパ行性転移の解析 > TβRIIΔiLEC マウスに Tx を投与して TβRII をノックアウトするとともに LLC 細胞を背部皮下に移植した。12 日後に形成された腫瘍から病理切片を作成し、血管・リンパ管構造を比較すると、コントロールマウスよりも TβRIIΔiLEC マウスでは抗 VEGFR3 抗体陽性面積が増加しており、リンパ管新生が促進されることが明らかとなった。TβRIIΔiLEC マウスに Tx を投与して標的遺伝子の喪失を誘導し、3 週間後に GFP を発現する LLC (LLC-GFP) 細胞を測定部に移植した。LLC-GFP を移植して 1 週間後に膝窩リンパ節への転移を確認したところ、コントロールマウスと比べて、TβRIIΔiLEC マウスではリンパ行性転移が抑制されることが明らかとなった。この原因として、リンパ流の低下とリンパ管の構造異常が関与する可能性が示された。

これらの結果は、がん微小環境に存在する TGF-β ががん細胞だけでなく転移経路となる血管やリンパ管にも作用して転移促進に寄与する可能性を示唆しており、効果的な TGF-β シグナル阻害が腫瘍転移抑制につながる可能性を示した。

(c) TGF-β ファミリー阻害薬の開発

がん悪液質モデルマウスの下肢筋肉に、新規ミオスタチン阻害薬 (MID-35) を投与して効果を検証した。がん悪液質モデルマウスでは腓腹筋重量の減少が顕著であったが、MID-35 投与群ではがん悪液質が誘導する筋肉消耗を抑制することができた。アナモレリンとの併用治療群では、腓腹筋重量、筋線維断面積、Grip Strength、食餌量が顕著に改善できることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kunpei Fukasawa, Kako Hanada, Kei Ichikawa, Masanori Hirashima, Takahiro Takagi, Susumu Itoh, Testuro Watabe, Fumiko Itoh.	4. 巻 41
2. 論文標題 Endothelial-specific depletion of TGF- signaling affects lymphatic function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflamm Regen .	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-021-00185-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takayuki Ozawa, Masato Morikawa, Yasuyuki Morishita, Kazuki Ogikubo, Fumiko Itoh, Daizo Koinuma, PA Nygren, Kohei Miyazono.	4. 巻 24
2. 論文標題 Systemic administration of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein increases muscle mass in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience .	6. 最初と最後の頁 102488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chiharu Ojima, Yuri Noguchi, Tatsuki Miyamoto, Yuki Saito, Hiroki Orihashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Fumiko Itoh.	4. 巻 111
2. 論文標題 Peptide-2 from mouse myostatin precursor protein alleviates muscle wasting in cancer-associated cachexia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2954-2964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14520.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tai-Nagara I, Hasumi Y, Kusumoto D, Hasumi H, Okabe K, Ando T, Matsuzaki F, Itoh F, Saya H, Liu C, Li W, Mukouyama Y, Linehan WM, Liu X, Hirashima M, Suzuki Y, Funasaki S, Satou Y, Furuya M, Baba M, Kubota Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Blood and lymphatic systems are segregated by the FLCN tumor suppressor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 6314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20156-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 花田賀子、齋藤裕紀、久保田義顕、平位秀世、伊東史子
2. 発表標題 内皮細胞特異的 TGF- β I 型・II 型受容体欠損が腫瘍転移に与える影響
3. 学会等名 第30回 日本血管生物医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東史子.
2. 発表標題 TGF- β シグナルによるリンパ管内皮細胞制御
3. 学会等名 第46回 日本リンパ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiko Itoh
2. 発表標題 BMP, but not TGF- β , signal is important for vascular homeostasis
3. 学会等名 13th BMP Conference 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiko Itoh
2. 発表標題 TGF- β /BMP signal balance maintains vascular homeostasis.
3. 学会等名 TGF- β Meeting in Uppsala. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深沢勲平, 花田賀子, 市川圭, 高木尊大, 伊東進, 平位秀世, 伊東史子.
2. 発表標題 TGF- シグナルが与えるリンパ管機能・恒常性維持への影響
3. 学会等名 第29回 日本血管生物医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiko Itoh
2. 発表標題 Disruption of Endothelial TGF- /BMP signal balance impairs vascular homeostasis.
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花田賀子, 齋藤裕紀, 宮本樹, Marcus Fruttiger, 平位秀世, 伊東史子.
2. 発表標題 血管内皮細胞特異的TGF- シグナルの欠損が血管に与える影響.
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊東史子.
2. 発表標題 リンパ管機能維持におけるTGF- シグナルの役割.
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊東史子.
2. 発表標題 腫瘍転移経路におけるTGF- シグナルの役割.
3. 学会等名 第44回 日本リンパ学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊東史子
2. 発表標題 内細胞特異的TGF- シグナルファミリー欠損がマウスリンパ管に与える影響
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊東史子
2. 発表標題 腫瘍血管新生におけるTGF- ファミリーシグナルの役割
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日向 宏輝, 尾嶋 千遥, 野口 百合, 高山 健太郎, 林 良雄, 伊東 史子
2. 発表標題 ミオスタチン阻害ペプチドを用いたがん悪液質改善効果
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Itoh F, Takagi T, Saito Y, Hanada K, Fruttiger M, Itoh S.
2. 発表標題 Depletion of Endothelial TGF- Signaling Induces Tumor Angiogenesis and Metastasis
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伊東 史子、福原 茂朋	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 244
3. 書名 血管・リンパ管の機能制御と疾患メカニズム	

1. 著者名 伊東 進、宮澤 恵二、伊東 史子、奥脇 暢、高橋 勝彦、服部 光治、東 伸昭	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 392
3. 書名 薬と生命を学ぶ人のための 基礎生化学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

ベルギー	KU Leuven			
------	-----------	--	--	--