

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07094

研究課題名(和文) 内皮間葉移行を抑制する転写因子のがん悪性化抑制機構の解明

研究課題名(英文) Roles of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT)-suppressing transcription factors in the inhibition of cancer progression

研究代表者

吉松 康裕 (Yoshimatsu, Yasuhiro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60586684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管やリンパ管の内腔を構成する内皮細胞の性質変化として「内皮間葉移行」という現象ががんを含む炎症性疾患を悪性化させることに着目して、これを制御する因子を同定し、どのような分子メカニズムでこの現象が引き起こされるかについて解明を試みた。血管内皮細胞においてはEtsファミリー転写因子の一つが炎症性のサイトカインの発現抑制に関わっていることを見出していることから、この遺伝子の欠損マウスを作製したところ、異常な血管形成を示した。がんや炎症性疾患の悪性化における役割については、まだ明らかにできていないが、これまでに樹立に成功している内皮間葉移行を解析するレポーター細胞の有用性を証明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EndoMT抑制因子としてのEtsファミリー転写因子の内皮細胞における役割については、血管及びリンパ管でそれぞれ異なる転写因子による、類似性があるものの複雑な転写制御ネットワークが存在することが示された。内皮間葉移行を経て産生される炎症性のサイトカインは周囲の細胞に影響を与えるため、本研究の成果や進行中の研究は関連疾患の悪性化の分子機序の解明の一部を担うと考えられる。EndoMTを解析するレポーター細胞についてはEndoMTに関する重要な分子が同定され、そのレポーターシステムの有用性が示されたため、今後もこの現象における分子機序の解明、ひいては関連疾患の発生機序の解明への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our group focused on the phenomenon of endothelial-mesenchymal transition, in which the properties of endothelial cells that compose the lumen of blood vessels and lymph vessels are drastically changed in inflammatory diseases including cancer, and identified factors that regulate this process in an attempt to elucidate the mechanism by which this phenomenon occurs. Since one of the Ets family transcription factors is involved in the suppression of inflammatory cytokine expression in blood vascular endothelial cells, mice lacking this gene were generated and showed abnormal vascular structures. Although its role in the malignant progression of cancer and inflammatory diseases remains to be elucidated, we were able to demonstrate and successfully establish the utility of reporter cells to analyze endothelial-mesenchymal transition.

研究分野：腫瘍生物学・脈管生物学

キーワード：Etsファミリー転写因子 炎症性サイトカイン レポーターマウス がん関連線維芽細胞 内皮間葉移行
血管 間葉系細胞 血管内皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの微小環境下で、内皮細胞の性質変化(内皮間葉移行)が起きる

がん微小環境下における腫瘍の増大には、栄養分の供給経路および老廃物の排出経路として新たな血管が必要になる。新たにできた血管はがんが悪性化して浸潤能を獲得すると、転移経路として機能する。この過程では、炎症に関わるサイトカイン transforming growth factor- β (TGF- β)などの作用により、血管の内腔に存在する血管内皮細胞の一部は間葉系細胞へと分化転換する。この現象を内皮間葉移行(EndoMT)と呼ぶ。このようながん微小環境における間葉系細胞はがん関連線維芽細胞 Cancer Associated Fibroblast (CAF)として機能し、周辺細胞に影響を及ぼす液性因子を産生する特徴がある。この点に着目して液性因子を探索したところ、研究代表者らは、最近この EndoMT を経た間葉系細胞自身が TGF- β ファミリー: TGF- β 1, - β 2, - β 3 のアイソフォームのうち、TGF- β 2 を産生することを明らかにした (Yoshimatsu et al., *Cancer Sci* 2020)。

(2) EndoMT を経た間葉系細胞から産生される TGF- β 2 ががんの悪性化に寄与する

がんの微小環境下では、がん細胞やマクロファージ、T細胞などが TGF- β の主な産生細胞として考えられてきた。しかし、研究代表者らの成果により、EndoMT を経た間葉系細胞も TGF- β の産生細胞となりうることが予想された。そこで、この細胞の培養上清を用いて上皮由来のがん細胞を培養すると、上皮細胞が間葉系細胞に分化転換する現象で、がん悪性化の指標となっている上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を引き起こすことを見出した (Yoshimatsu et al., *Cancer Sci* 2020)。以上から、血管内皮細胞が間葉系細胞に分化転換する過程で新たに TGF- β 2 が産生され、EndoMT を経て生成された CAF として働き、自分自身の EndoMT を亢進させるとともに、がんの悪性化に寄与することが示唆された。しかし、さまざまな細胞で構成される生体内におけるがん発生部位で、この現象が起こるかについては不明である。

(3) EndoMT はさまざまな転写因子によって制御を受けており、内皮細胞の性質維持に関与する Ets ファミリー転写因子によって抑制されている

研究代表者らは TGF- β などによって惹起される EndoMT を促進する転写因子として Snail や MRTF-A を同定し、その機能と分子メカニズムを解明してきた(Kokudo et al, *J Cell Sci* 2008; Mihira et al., *J Biochem* 2012)。一方、線維芽細胞増殖因子 FGF-2 がこの TGF- β の作用を打ち消す機能を持つことに加え、FGF2 の下流で機能し TGF- β の作用を減弱する抑制型転写因子として Elk1 を明らかにした (Akatsu et al., *Mol Oncol* 2019)。また、Elk1 と同じ Ets ファミリー転写因子である Erg や Fli1 が EndoMT を抑制することが他のグループにより報告された (Nagai et al., *PLoS Genet* 2018)。しかしながら、そのほかの Ets ファミリー転写因子にそのような機能を持つものが存在するかどうかについては不明であった。そのような中、研究代表者らは、血管内皮細胞に siRNA を作用させる実験において、上記とは異なる Ets ファミリー転写因子が TGF- β 2 の発現を抑制しており、EndoMT

に対して抑制的に働くことを見出した。

2. 研究の目的

- (1) 内皮細胞が本来持っている内皮細胞としての性質を維持する機構の一つとして、上記に挙げたように新たな Ets ファミリー転写因子の内皮細胞における発現が TGF- β 2 の産生を抑制している点に着目し、これがマウス個体の体内でも同じように起きているか、が本研究の主な焦点である。具体的には、EndoMT はこの抑制機構が破綻する過程であるので、結果としてこの Ets ファミリー転写因子の発現低下・機能低下により TGF- β 2 の発現量・産生量が増えて、周辺の細胞、特にがん細胞や炎症性疾患に悪影響を及ぼすか（具体的には、がんでは上皮間葉移行や浸潤・転移が増加するか、肺炎モデルでは肺の線維化が進行するか）を証明することを目的とする。
- (2) 血管内皮細胞に類似したリンパ管内皮細胞でも EndoMT または EndoMT の関連疾患において、類似する或いは異なる分子メカニズムが存在するかについて、リンパ管内皮細胞における Ets ファミリー転写因子の役割を明らかにすることを目的とする。
- (3) EndoMT は細胞分化の過程であるため、類似した機構を持つことが示されている EMT から類推した際に、EndoMT 過程の細胞の遷移状態においては、さまざまな分子が関わることが予想される。これが引き起こされる詳細な分子メカニズムを追うには、EndoMT を解析するためのレポーターシステムが必要である。このため、下記の方法の項で記されるようなマウスの交配および細胞の単離により、EndoMT の検出システムを確立し、その分子機序を明らかにすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) 複数の血管内皮細胞を用いて siRNA により Ets ファミリー転写因子の発現を低下させて、EndoMT にどのような効果をもたらすかについて解析を行った。具体的には、EndoMT の中心分子である TGF- β のシグナルの構成因子について発現解析を進めた。
- (2) 上記のように Ets ファミリー転写因子の内皮細胞における役割を解析する過程で、同じ内皮細胞であり性質が似ているリンパ管内皮細胞における作用についても検討を進めた。具体的には、複数の Ets ファミリー転写因子について siRNA による発現低下を誘導し、EndoMT にどのような効果をもたらすかについて調べた。
- (3) 内皮細胞で特異的に機能するタモキシフェン誘導性の Cre-LoxP のシステムを持つ VE-cadherin-CreERT2 のマウス (Okabe et al., *Cell* 2014) および筋線維芽細胞マーカー-Smooth muscle α -actin (SMA) のプロモーター下で GFP を発現するマウスを掛け合わせて作製した EndoMT レポーターマウスは、内皮細胞の系譜を赤色蛍光タンパク質 tdTomato でラベルできる。この細胞は EndoMT を起こして SMA を発現すると GFP でもラベルされる。このマウスを用いて門脈にコラゲナーゼを注入し肝臓の類洞内皮細胞を単離した。ウイルスを用いて不死化し細胞を株化して、EndoMT の解析に供した。EndoMT の解析は FACS (フローサイトメトリー) を用いることで、主に内皮細胞および EndoMT を起こす遷移状態 (内皮細胞マーカーおよび筋線維芽細胞マーカーが共発現している状態) さらに完全に EndoMT を起こした状態 (内皮細胞マーカーを発現せず、筋線維芽細胞マーカーを発現している状態) と、その誘導段階を分けて解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 血管内皮細胞において Ets ファミリー転写因子は、EndoMT を抑制して内皮細胞としての性質維持に重要な役割を果たしている

前述のように細胞レベルで siRNA を用いて解析を進めたところ、Ets ファミリー転写因子は炎症性のサイトカインの一つである TGF- β 2 の発現を制御していた。TGF- β の発現を制御している Ets ファミリー転写因子については、Erg や Fli1 が知られているため同様の制御機構が予想されたが、今回発見した Ets ファミリー転写因子はこれらと異なる分子であるため、上流または下流の因子として機能している可能性が考えられる。現在までにこれらのサンプルを RNA シーケンス解析に供しており、

標的遺伝子や下流で機能しているシグナル経路について解析を進めている。

- (2) リンパ管内皮細胞においても Ets ファミリー転写因子が EndoMT を抑制して内皮細胞としての性質維持に重要な役割を果たしている

リンパ管内皮細胞は血管内皮細胞と類似しており、リンパ管内皮細胞における EndoMT は共通の分子メカニズムを持っていると予想される。そこで解析を進めたところ、前述の転写因子とは異なる Ets ファミリー転写因子がリンパ管内皮細胞の性質維持に効いていることを突き止めた。この転写因子は以前に我々が報告した Activin シグナルを調節することが明らかになり、リンパ管内皮細胞の EndoMT は、血管内皮細胞とは異なる分子メカニズムを持つことが示唆されている。

さらに EndoMT に抑制的に働く FGF シグナルをも制御していることが実験データから示唆されており、EndoMT の抑制因子としての信ぴょう性が十分に示されつつある。

- (3) EndoMT レポーター細胞は、EndoMT の研究する上での強力なツールになりうる

EndoMT レポーター細胞を以前に樹立しており、この細胞では「内皮細胞であること」および「内皮細胞であったこと」が赤色蛍光タンパク質でラベルできる。また、smooth muscle α -actin のプロモーターの制御下で GFP が発現するようになっており、EndoMT を引き起こすと緑色蛍光タンパク質でもラベルされる。このシステムを持つ遺伝子改変マウスの肝臓の類洞内皮細胞を単離して、EndoMT レポーター細胞を樹立した。このシステムを用いることで、EndoMT の細胞分化における遷移状態が比較的容易に分類することができ細胞の分取およびその性質の解析が可能になった。さらに共同研究者らの解析により CD40 という分子が EndoMT の過程で一過的に発現が上昇して、完全に EndoMT が進んだ際にはほぼ消失する分子として同定された。CD40 は EndoMT に抑制的に機能することが明らかになり、EndoMT という現象の解明の一助となった (Takahashi et al., *Cancer Sci* 2024)。

また、上記のことはこの細胞が EndoMT という現象の解明に非常に有用なツールとして使用できることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takahashi K, Abe K, Kubota SI, Fukatsu N, Morishita Y, Yoshimatsu Y, Satoshi Hirakawa, Yoshiaki Kubota, Tetsuro Watabe, Shogo Ehata, Hiroki R. Ueda, Tepei Shimamura, Kohei Miyazono | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 An analysis modality for vascular structures combining tissue-clearing technology and topological data analysis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communiactions | 6. 最初と最後の頁 5239 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32848-2 | 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 Takeda T, Yamano S, Goto Y, Hirai S, Furukawa Y, Kikuchi Y, Misumi K, Suzuki M, Takanobu K, Senoh H, Saito M, Kondo H, Daghlian G, Hong YK, Yoshimatsu Y, et al. | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Dose-response relationship of pulmonary disorders by inhalation exposure to cross-linked water-soluble acrylic acid polymers in F344 rats | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Particle Fibre and Toxicology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12989-022-00468-9 | 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 吉松康裕 | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 内皮細胞の機能低下がもたらす生体恒常性の破綻とその分子機序 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 新潟医学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 69-74 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Koichi Nishino, Yasuhiro Yoshimatsu, Tomoki Muramatsu, Yasuhito Sekimoto, Keiko Mitani, Etsuko Kobayashi, Shouichi Okamoto, Hiroki Ebana, Yoshinori Okada, Masatoshi Kurihara, Kenji Suzuki, Johji Inazawa, Kazuhisa Takahashi, Tetsuro Watabe, Kuniaki Seyama | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Isolation and characterisation of lymphatic endothelial cells from lung tissues affected by lymphangioloeyomatosis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 8406-8406 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88064-3 | 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 Makoto Fujimoto;Miki Kamiyama;Kosuke Fuse;Hiroki Ryuno;Takeru Odawara;Natsuki Furukawa;Yasuhiro Yoshimatsu;Tetsuro Watabe;Michaela Prchal Murphy;Veronika Sexl;Hideaki Tahara;Yoshihiro Hayakawa;Takehiro Sato;Kohsuke Takeda;Isao Naguro;Hidenori Ichijo | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 ASK1 suppresses NK cell mediated intravascular tumor cell clearance in lung metastasis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1633-1643 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14842 | 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 Asano Y, Okano D, Matsusaki M, Watabe T, Yoshimatsu Y, Akashi M, Shimoda H | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Construction of transplantable artificial vascular tissue based on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by a cell coating and cryopreservation technique | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 17989 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97547-2 | 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 Yoshimatsu Y, Watabe T | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Emerging roles of inflammation-mediated endothelial-mesenchymal transition in health and disease | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Inflammation and regeneration | 6. 最初と最後の頁 9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-021-00186-3 | 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 - |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshimatsu Y, Shiori Kimuro, Itoh Taichi, Akihiko Inagawa, Masanori Hirashima, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe |
| 2. 発表標題 Platelet-derived growth factor receptor expression is maintained by an Ets family transcription factor in lymphatic endothelium and is required for inflammatory lymphangiogenesis |
| 3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林美穂, 高橋和樹, 勝又寿枝, 廣瀬穂香, 吉松康裕, 渡部徹郎 |
| 2. 発表標題 脈管の恒常性維持と加齢との関係 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 勝又寿枝, 高橋和樹, 小林美穂, 前田健太郎, 吉松康裕, 松永行子, 渡部徹郎 |
| 2. 発表標題 内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター内皮細胞を用いたEndoMT遷移段階の検出 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yasuhiro Yoshimatsu, Shiori Kimuro, Taich Itoh, Akihiko Inagawa, Masanori Hirashima, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe |
| 2. 発表標題 Roles of an Ets family transcription factor in platelet-derived growth factor -mediated lymphangiogenesis |
| 3. 学会等名 The 30th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yasuhiro Yoshimatsu, Shiori Kimuro, Taich Itoh, Akihiko Inagawa, Masanori Hirashima, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe |
| 2. 発表標題 Roles of an Ets family transcription factor in platelet-derived growth factor signal-mediated lymphangiogenesis |
| 3. 学会等名 The 46th Meeting of the Japanese Society of Lymphology (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Sakakitani Shintaro, Daizo Koinuma, Akinari Sugauchi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe. |
| 2. 発表標題 Activation of epithelial-mesenchymal transition program in oral cancer cells under TGF- β -induced cell cycle arrest |
| 3. 学会等名 TGF- β Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (FASEB) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yasuhiro Yoshimatsu, Kentaro Maeda, Naoya Takahashi, Ikumi Wakabayashi, Shiori Kimuro, Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Masanori Hirashima, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe |
| 2. 発表標題 Role of an ETS family transcription factor in endothelial-mesenchymal transition (EndoMT)-driven EMT |
| 3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuki Takahashi, Katarzyna A. Inoue, Sakakitani Shintaro, Toru Konisi, Akinari Sugauchi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Daizo Koinuma, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Mikihiro Kogo, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe |
| 2. 発表標題 Oral cancer cells under TGF- β -induced cell cycle arrest exhibit motile phenotypes through induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) |
| 3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉松康裕, 紀室志織, 稲川諒彦, 前田健太郎, 平島正則, 渡部徹郎. |
| 2. 発表標題 リンパ管内皮細胞における内皮間葉移行はEtsファミリー転写因子の発現低下を介したActivin シグナルの活性化により亢進する |
| 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 吉松康裕 |
| 2. 発表標題 内皮細胞の機能低下がもたらす生体恒常性の破綻とその分子機序 |
| 3. 学会等名 第759回新潟医学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------|-----------------|
| 1. 著者名 吉松 康裕 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 国際文献社 | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 化学と生物 | |

〔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 |
|-------|---|---------------------------------|----|
| 研究協力者 | 平島 正則 (Hirashima Masanori) (40383757) | 新潟大学 (13101) | |
| 研究協力者 | 渡部 徹郎 (Watabe Tetsuro) | 東京医科歯科大学 (12602) | |
| 研究協力者 | 瀬山 邦明 (Seyama Kuniaki) | 順天堂大学 (32620) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---------------------------------|-------------------------|----|
| 研究協力者 | 前田 健太郎 (Maeda Kentaro) | 東京薬科大学 (32659) | |
| 研究協力者 | 高橋 和樹 (Takahashi Kazuki) | 東京医科歯科大学 (12602) | |
| 研究協力者 | 椎谷 友博 (Shiyya Tomohiro) | 新潟大学 (13101) | |
| 研究協力者 | 小林 美穂 (Kobayashi Miho) | 東京医科歯科大学 (12602) | |

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 |
|---------|---------|
| | |