

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20796

研究課題名（和文）血管肉腫におけるTGF- $\beta$  シグナル伝達の解明と新規治療法の探索研究課題名（英文）Analysis of TGF- $\beta$  signaling in angiosarcoma and search for novel therapies

研究代表者

坂元 亮子（Sakamoto, Ryoko）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：00965634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000 円

研究成果の概要（和文）：血管肉腫におけるTGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関連する各種分子の発現レベルを解析した結果、血管肉腫細胞株において核内に蓄積して遺伝子転写反応を調節するSmad1/5とSmad2/3のリン酸化に有意な差はなかったが、TGF- $\beta$  タイプII受容体とALK1およびALK5の両方のレベルは、正常血管内皮細胞と比較して血管肉腫細胞株で有意に増加していた。また、血管肉腫細胞株においてTGF- $\beta$  のレベル低下が認められたにも関わらず、その刺激によるシグナル伝達経路の過剰反応が示唆されることが分かった。TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の解明が新規治療につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管肉腫は、標準治療が確立されておらず、難治性の肉腫である。進行例では、化学療法が主体となるが、未だ有効な治療法が確立されていない。そのために、血管肉腫に対する新規治療の開発は急務である。本研究は今回、血管肉腫におけるTGF- $\beta$  シグナル伝達の解明することで、新たな治療方法の開発や奏効率の改善など治療応用についての可能性があるという側面もあり、学術的・社会的な意義を有している。

研究成果の概要（英文）：Analysis of the expression levels of various molecules associated with the TGF- $\beta$  signaling pathway in angiosarcoma showed that although there were no significant differences in the phosphorylation of Smad1/5 and Smad2/3, which accumulate in the nucleus and regulate gene transcription responses in angiosarcoma cell lines, the levels of TGF- $\beta$  type II receptors and both ALK1 and ALK5 levels were significantly increased in angiosarcoma cell lines compared to normal vascular endothelial cells. Despite the decreased levels of TGF- $\beta$  in the angiosarcoma cell lines, the results suggest an overreaction of the signaling pathway due to its stimulation; elucidation of the TGF- $\beta$  signaling pathway may lead to novel therapies.

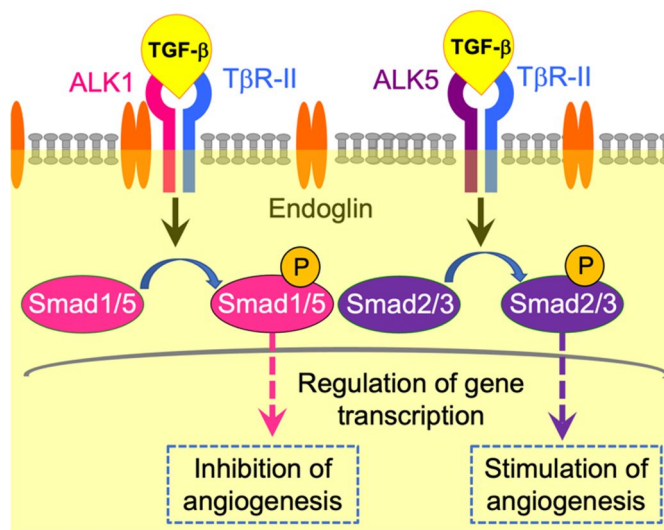
研究分野：Dermatology

キーワード：血管肉腫 TGF- $\beta$ 

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

血管肉腫は、年間発生率が100万人あたり1.4人と非常に希少であり、5年生存率は約20%と極めて予後不良な悪性腫瘍である。TGF- $\beta$  シグナル伝達経路は細胞増殖・分化などを制御する上で重要な役割を担い、悪性腫瘍の進展にも寄与する。大腸癌や膵臓癌では、TGF- $\beta$  受容体やシグナル分子の発現異常や遺伝子変異が癌化の要因とされる。また、癌細胞が産生するTGF- $\beta$  が腫瘍微小環境に作用し、細胞外マトリックスの蓄積、血管新生、免疫抑制や上皮間葉移行などを誘導する。TGF- $\beta$  シグナル経路による血管新生は血管内皮細胞上に存在する2種類のTGF- $\beta$  I型受容体(ALK1, ALK5)により主に調節される。TGF- $\beta$  /ALK1/Smad1/5経路は血管内皮細胞の増殖・遊走を促進する血管新生促進因子として、TGF- $\beta$  /ALK5/Smad2/3経路は血管新生抑制因子として機能する(右図)。さらに近年、TGF- $\beta$  によるEndoMTが注目されており、細胞間接着に必要なVE-cadherinなどの減少/間葉系マーカーの発現増加に基づく遊走能亢進、MMP-2発現上昇などに基づく浸潤能亢進が誘導される。多くの悪性腫瘍とTGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関する報告がある一方、血管肉腫における役割は解明されていないため、本研究により病態解明および新規治療に結びつけることが出来る。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、血管肉腫に対する病態をTGF- $\beta$  シグナル伝達経路の視点から解明し、発癌・癌浸潤・癌転移における作用機構の解明およびそこから導かれる新規治療法の可能性を探索することにある。血管肉腫は症例数が少ないにも関わらず、当施設では患者血清/血漿および組織などの臨床検体および付随する臨床情報を多数保存している。現在、血管肉腫に対する新規治療および病態解明に関する基礎的研究は少数しか報告がなく、前述したように血管肉腫に対する臨床と研究を一貫して施行できる施設はごく少数であり、in vitro/in vivo で得られた知見を、患者サンプルで検証することができる、世界でも数少ない研究基盤を確立している

## 3. 研究の方法

血管肉腫におけるTGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関連する各種分子の発現レベル解析  
血管肉腫におけるTGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関連する各種分子の発現レベルを解析するために、正常血管内皮細胞と血管肉腫細胞株を培養し、TGF- $\beta$  タイプII受容体とALK1およびALK5、核内に蓄積して遺伝子転写反応を調節するSmad1/5とSmad2/3のリン酸化のイムノプロットングを行った。

## 活性型 TGF- $\beta$ と受容体との相互関係の検討

活性型 TGF- $\beta$  と受容体との相互関係の検討するため、正常血管内皮細胞と血管肉腫細胞株における培養液中の TGF- $\beta$  のレベルを測定した。

## 血管肉腫細胞におけるエネルギー代謝と TGF- $\beta$ シグナルの関連性の究明

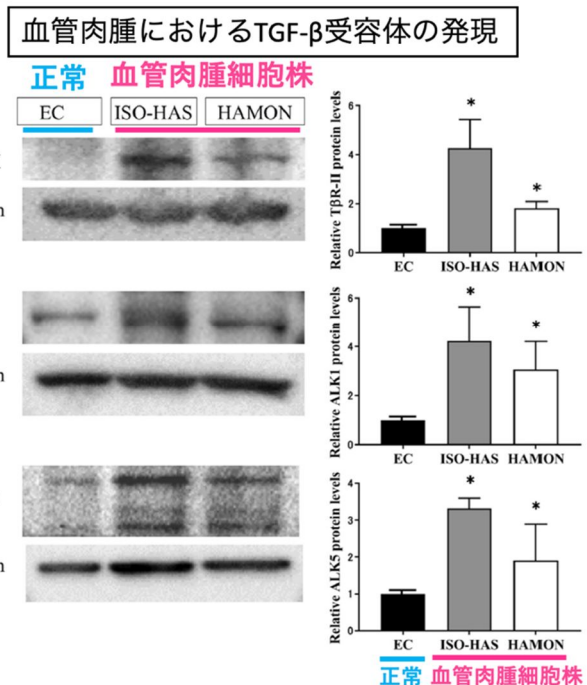
血管肉腫細胞におけるエネルギー代謝と TGF- $\beta$  シグナルの関連性の究明のため、細胞外フラックスアナライザーXFp を用いて正常血管内皮細胞と血管肉腫細胞株の OCR(ミトコンドリア呼吸;酸素消費速度)/ECAR(解糖系;細胞外酸性化速度)を比較した。

## 4. 研究成果

血管肉腫細胞株において TGF- $\beta$  タイプ II 受容体と ALK1 および ALK5 の過剰発現している。

血管肉腫における TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関連する各種分子の発現レベルを解析するために、正常血管内皮細胞と血管肉腫細胞株を培養し、TGF- $\beta$  タイプ II 受容体と ALK1 および ALK5、核内に蓄積して遺伝子転写反応を調節する Smad 1 / 5 と Smad 2 / 3 のリン酸化のイムノブロットングを行った。結果、それぞれの細胞株における Smad 1 / 5 と Smad 2 / 3 のリン酸化に有意な差はなかったが、TGF- $\beta$  タイプ II 受容体と ALK1 および ALK5 の両方のレベルは、正常血管内皮細胞と比較して血管肉腫細胞株で有意に増加していた(図 1)。In vitro での発現の増加を認めたため、次に in vivo における発現レベルを解析することにした。臨床症状、ステージ、予後をリスト化した血管肉腫患者組織と正常血管や老人性血管腫の組織を免疫染色したが、TGF- $\beta$  タイプ II 受容体と ALK1 および ALK5 において発現レベルの検体毎のばらつきが大きく有意差はなかったため、転移や予後と相関性を見出すことはできなかった。

図 1

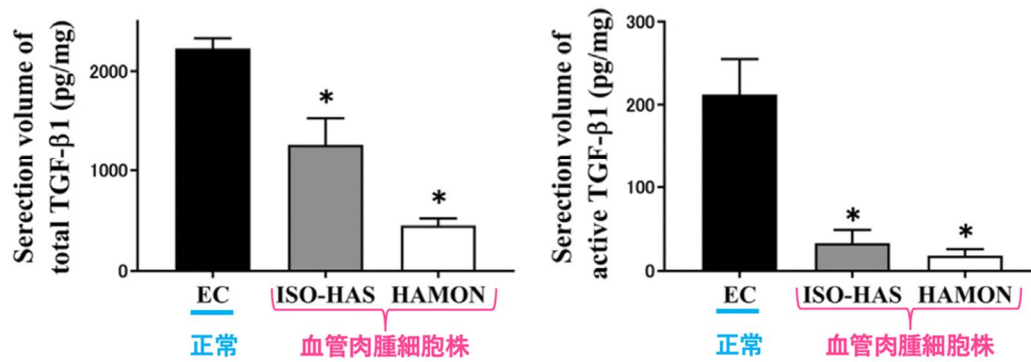


血管肉腫細胞株において培養液中の TGF- $\beta$  のレベル低下を認めた。

TGF- $\beta$  の影響を調べるため、TGF- $\beta$  を細胞に添加し、TGF- $\beta$  タイプ II 受容体である CD105 の発現量を比較したところ、正常血管内皮細胞より血管肉腫細胞株では著明に増加していた(図 2)。次に、TGF- $\beta$  中和抗体を使った CD105 の発現量の比較では、血管肉腫細胞株で減少していた。CD105 の発現は TGF- $\beta$  刺激に対する過剰反応に依存していることが示された。血管肉腫において TGF- $\beta$  のレベル低下が認められたにも関わらず、その刺激によるシグナル伝達経路の過剰反応が示唆されることが分かった。

図 2

血管肉腫細胞株において培養液中のTGF- $\beta$ のレベル低下



細胞外フラックスアナライザーXFp を用いて正常血管内皮細胞と血管肉腫細胞株のOCR(ミトコンドリア呼吸;酸素消費速度)/ECAR(解糖系;細胞外酸性化速度)を比較したところ、血管肉腫細胞株に低下を認めた。つまり、嫌気性解糖系の亢進、もしくは酸化的リン酸化の抑制を認めた。

本研究全体を通じて、TGF- シグナル伝達経路の解明が新規治療につながる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------