

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689023

研究課題名(和文) TGF- β シグナルによる血管・リンパ管新生の分子機構解明研究課題名(英文) The role of TGF- β signaling in blood and lymph angiogenesis

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) 17,300,000円、(間接経費) 5,190,000円

研究成果の概要(和文)：成体の血管やリンパ管新生におけるTGF- β シグナルの役割について解明するために、タモキシフェン誘導的に血管およびリンパ管内皮細胞特異的に遺伝子を欠損するマウス、Smad2/3 CKO、TbRIIBEC-CKO、TbRIILEC-CKOマウスを作成して解析した。その結果、Smad2/3 CKOマウスは胎生致死となるものの、TGF- β シグナルによる血管の成熟機構分子メカニズムを明らかにした。さらに、腫瘍モデルマウスを作製したところ、TGF- β シグナルは腫瘍血管・リンパ管新生を抑制するだけでなく腫瘍転移を促進するシグナルであることを見出した。

研究成果の概要(英文)：It is not clear how TGF- β signaling affects vascular formation in postnatal mice. To address this issue, TGF- β type II receptor conditional knockout (CKO) mice; TbRIIF/F, were crossed with Pdgfb-icreER and Prox1-CreERT2 mice in which Cre recombinase is induced in blood (BECs) and lymphatic vascular endothelial cells (LECs) by tamoxifen (Tx), respectively. When LLC cells were subcutaneously injected into TbRIIF/F; Pdgfb-icreER (TbRIIBEC-CKO), TbRII;Prox1-CreERT2 (bRIILEC-CKO) mice, both tumor and lymphangiogenesis were enhanced in CKO mice. Moreover, lung metastasis was decreased when B16 melanoma cells were injected into foot pad in both CKO mice. Blood vessels in the tumor but not in the normal tissue of TbRIIBEC-CKO mice were very leaky, indicating the poor blood circulation in tumors. Furthermore, deletion of TGF- β signaling in LEC resulted in the reduced drainage and edema. These results indicated that TGF- β signaling inhibits tumor angiogenesis and lymphangiogenesis in adults.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：TGF- β 血管新生 リンパ管新生 腫瘍 転移 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

血管・リンパ管は全身に分布して、生体の恒常性を維持している。それゆえ正常な血管機能・構造の破綻は多くの疾患と結びついており、新たな血管を作る過程(血管新生)の制御や血管再生技術の開発は喫緊の課題である。リンパ管の機能異常によってもたらされるリンパ浮腫は、治療法が存在しないばかりか、リンパ管新生の詳細なメカニズムは明らかではない。

血管・リンパ管新生過程は、様々なシグナルによって複雑かつ厳密に制御されており、血管新生およびリンパ管新生に関わる数多くの分子が明らかとなってきた。血管新生に参与するサイトカインの多くがリンパ管新生にも重要な役割を果たすことが示されてきているが、血管新生を抑制する TGF- β シグナルがリンパ管新生にどのような役割を果たすかは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、血管・リンパ管新生の基本原則を解明して、血管やリンパ管に関する疾患の治療に役立てることを目標とした。そのために、血管新生を抑制すると主に血管を安定化させる TGF- β シグナルに反応して変化する血管内皮細胞の動態やリンパ管内皮細胞の反応に注目し、血管・リンパ管新生を調節する細胞間・分子間相互ネットワークの成立基盤の解明をめざした。解明した成立基盤を利用して、腫瘍を標的とした血管新生療法やリンパ浮腫の治療法の開発を目指すほか、iPS細胞を利用した安全で確実な血管再生技術の創生にも努め、トランスレショナルリサーチを視野に入れた研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 生理的リンパ管構造を維持する分子メカニズムの解明

リンパ管内皮細胞特異的かつ後天的に遺伝子を欠損させるマウス (Prox1-creERTM) と TGF- β II 型受容体のコンディショナルノックアウトマウスを交配させて T β RII^{F/F}; Prox1-icreER (T β RII^{LEC-CKO})作成し、胎生期、および成獣においてタモキシフェン (Tx) を投与して遺伝子の欠損を誘導した。TGF- β シグナルの欠損により、リンパ管の構造にどのような影響が見られるのか、病理切片を作成して解析するとともに、リンパ管内皮細胞を用いて TGF- β シグナルの影響について検討を行った。

(2) 腫瘍リンパ管新生における TGF- β シグナルの役割

T β RII^{LEC-CKO} マウスに肺腺がん細胞 (LLC) またはメラノーマ (B16) を移植した腫瘍モデルマウスを作成した。Tx を投与して遺伝子欠損を誘導し、腫瘍が誘導する新規リンパ管に

どのような影響が見られるか検討した。

(3) 発生初期における血管内皮細胞特異的 TGF- β シグナル欠損の影響

TGF- β シグナルを伝達する Smad2 のコンディショナルノックアウトマウスと Smad3 ノックアウトマウス、血管内皮細胞特異的に遺伝子を欠損する Tie2-cre マウスを交配させ、Smad2^{F/F}; Smad3^{-/-}; Tie2-cre マウスを作成し、解析を行った。

(4) 腫瘍血管新生における TGF- β シグナルの役割

血管内皮細胞特異的かつ後天的に遺伝子を欠損させるマウス (Pdgfb-icreER) と TGF- β II 型受容体のコンディショナルノックアウトマウスを交配させて T β RII^{F/F}; Pdgfb-creERTM (T β RII^{BEC-CKO})作成した。このマウスに肺腺がん細胞 (LLC) またはメラノーマ (B16) を移植した腫瘍モデルマウスを作成した。Tx を投与して遺伝子欠損を誘導し、腫瘍が誘導する新規リンパ管にどのような影響が見られるか検討した。さらに、さまざまな臓器の血管において TGF- β シグナルを欠損させた影響について検討した。

(5) 再生医療へ向けた技術確立

TGF- β シグナル系コンディショナルノックアウトマウス由来の細胞を用いて iPS 細胞を作成し、TGF- β シグナルによる中胚葉分化への影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 生理的リンパ管構造を維持する分子メカニズムの解明

発生初期のリンパ管において TGF- β シグナルを欠損させた結果、リンパ管新生が促進したが、機能異常により胎仔は浮腫を起こすことを見出した。その原因遺伝子として、アレイ解析により転写因子 X を同定した。



図1 リンパ管内皮細胞特異的 TGF- β シグナル欠損の影響

(2) 腫瘍リンパ管新生における TGF- β シグナルの役割

成獣のリンパ管において TGF- β シグナル

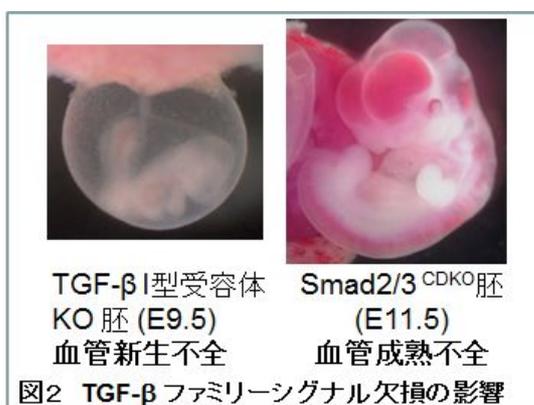
を欠損させた結果、リンパ管新生が促進するが、排出能力が低下していることを見出した。この結果は、TGF- β シグナルがリンパ管新生を抑制するとともに恒常性維持に必須のシグナルであることを示唆している。

T β RII^{LEC-CKO} マウスに LLC を移植した腫瘍モデルマウスを作成した。移植後 1 2 日に腫瘍を摘出し、病理切片を作成して腫瘍の構造について精査した。凍結切片を血管のマーカーである PECAM1 に対する抗体とリンパ管のマーカー Lyve-1 を認識する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った、その結果、Lyve-1 陽性細胞の面積が有意に増大していたことから、リンパ管新生が促進することが分かった。

B16 メラノーマを用いた腫瘍肺転移モデルマウスを作成した。マウス Footpad に B16 を移植し、7 週間後に肺への転移を評価した。その結果、リンパ管内皮細胞特異的 TGF- β シグナル欠損により、肺転移が低下することを見出した。この結果は TGF- β シグナルが腫瘍のリンパ行性転移を促進シグナルであることを示唆した。

(3) 発生初期における血管内皮細胞特異的 TGF- β シグナル欠損の影響

Smad2^{F/F}; Smad3^{-/-}; Tie2-cre マウスは、これまで知られていた TGF- β シグナル欠損マウスでみられる胎生致死 (E10.5 日) (図 2) を回避したが、胎生 11.5 日前後に全身から出血をはじめ、胎生 14 日前後に胎生致死となった (図 2)。Smad2^{F/F}; Smad3^{-/-}; Tie2-cre マウス胚では、血管内皮細胞同士の接着および血管内皮細胞 血管平滑筋細胞の接着が低下しているだけでなく、血管平滑筋細胞のリクルートが低下していた。この原因として TGF- β シグナルがスフィンゴシン 1 リン酸受容体と N-Cadherin の発現を誘導して血管の成熟を促していることを見出した。



(4) 腫瘍血管新生における TGF- β シグナルの役割

T β RII^{BEC-CKO} 新生仔網膜血管において TGF- β シグナルを欠損させると、網膜からの出血を認めた。さらに、7 週齢マウスの血管においてにおいて TGF- β シグナル欠損させると、一部の臓器において出血が確認された。

しかし、3 ヶ月齢のマウス血管において TGF- β シグナルを欠損させても、ほとんど影響がなかった。以上の結果は TGF- β シグナルが時期特異的な作用を有することを示唆している。

T β RII^{BEC-CKO} マウスに LLC を移植した腫瘍モデルマウスを作成した。移植後 1 2 日に腫瘍を摘出して肉眼的に観察したところ、T β RII^{BEC-CKO} マウスに形成された腫瘍は血管新生の促進、または出血の増加が認められた。摘出した腫瘍より病理切片を作成したところ、肉眼的観察を裏付ける結果を得た。さらに、凍結切片を血管のマーカーである PECAM1 に対する抗体と血管平滑筋細胞のマーカー SMA を認識する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った、その結果、PECAM1 陽性細胞の面積が有意に増大していたことから、TGF- β シグナルが腫瘍リンパ管新生を抑制するシグナルであることが示唆された。さらに、レクチンの尾静脈投与により血管機能を評価したところ、腫瘍臓器内へのレクチンの滲出が T β RII^{BEC-CKO} マウスで確認された。この結果は T β RII^{BEC-CKO} マウスの腫瘍血管は成熟過程に異常をきたしていることを示唆した。

B16 メラノーマを用いた腫瘍肺転移モデルマウスを作成した。マウス Footpad に B16 を移植し、7 週間後に肺への転移を評価した。その結果、血管内皮細胞特異的 TGF- β シグナル欠損により、肺転移が低下することを見出した。この結果は TGF- β シグナルが腫瘍の血行性転移を促進シグナルであることを示唆した。

(5) 再生医療へ向けた技術確立

TGF- β シグナル系コンディショナルノックアウトマウスと CAG-Cre マウスを交配させたマウスより MEF を作成した。定法に従って iPS 細胞を作成し、タモキシフェンの添加により遺伝子を欠損させて中胚葉への分化について検討した。しかし、コロニー間のばらつきの影響により、明確な TGF- β シグナルの影響については明らかにできなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

Nakano, N., Maeyama, K., Ikeno, S., Itoh, E., Togawa, Y., Katsu, Y., Thanh Thao, V.N., Watanabe, Y., Kato, M., and Itoh, S. C18ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- β Signaling. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 289, 12680-12692. (2012) doi: 10.1074

Itoh F, Itoh S, Adachi T, Ichikawa K, Matsumura Y, Takagi T, Festing T, Watababe T, Weinstein M, Karlsson S & Kato M. ([#]equally contributed) Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. *Blood*, 査読有, 119, 5320-

5328 (2012) doi: 10.1182

Itoh S & Itoh F. Implication of TGF- β as a survival factor during tumor development. *J. Biochem.*, 査読有, 151; 559-562 (2012) doi: 10.1093

Itoh F & Itoh S. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway. *Growth Factors*, 査読有, 29(5):163-73 (2011) doi: 10.3109

Yang W[#], Itoh F[#], Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S & Kato M. ([#]equally contributed) Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. *Cancer Sci.*, 査読有, 102, 1808-1814 (2011) doi: 10.1111

〔学会発表〕(計 33 件)

Itoh, F. TGF- β signaling regulates lymphangiogenesis in vivo. Gordon Research Conferences. Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease. 2014/3, Lucca (Barga), Italy

Itoh, F., Takagi, T., Ichikawa, K., Fruttiger, M., Oliver, G., Itoh S., and Watanabe, T. The role of TGF- β signaling in Tumor blood- and lymph angiogenesis. The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling”. 2013/10, Matsuyama, Japan

Itoh, F., Takagi, T., Ichikawa, K., Fruttiger, M., Oliver, G., Watanabe, T., and Itoh, S. TGF- β signaling controls tumor blood- and lymph- angiogenesis. FASEB Summer Research conference, TGF- β superfamily: Signaling in Development and Disease, 2013/8, Steamboat springs, Colorado, USA

Itoh, F. The role of TGF- β signaling in blood- and lymph- angiogenesis. 第 86 回 日本生化学会大会、2013/9、横浜

Itoh, F., Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. 17th International Vascular Biology Meeting, 2012/6, Wiesbaden, Germany

Itoh, F., Hazome, S., Fruttiger, M., Itoh, S., and Watanabe, T., Dicer-dependent miRNA pathway is important for vascular development. 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012/12, Tokushima, Japan

Itoh, F., Itoh, S., Watanabe, T., and Kato, M. TGF- β signaling is involved in lymphatic vessel development in vivo. FASEB Summer Research Conference 2011/8, Lucca, Italia

Itoh, F., Ichikawa, K., Itoh, S., and Watanabe, T. Involvement of TGF- β /Smad

pathway in lymphangiogenesis. JSPS-NOW Joint Seminar, 2011/11 Tokyo, Japan

〔図書〕(計 4 件)

伊東史子. 血管新生と腫瘍血管. がんの増殖と悪性化の分子機構. 宮澤恵二、伊東進編, 化学同人 66-77, 20013

伊東史子、加藤 光保: TGF- β シグナル研究—メカニズムの解明からあらたな治療へ. 別冊・医学のあゆみ 43-47 (2011).

伊東史子、胚体外血管系と造血、血管生

物医学事典、朝倉書店 47-48 (2011).
伊東史子、Smad、血管生

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ミオスタチン阻害ペプチド

発明者: 林良雄ほか

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013 - 17540

出願年月日: 2013 年 1 月 31 日

国内外の別: 国内

科学技術振興機構 JST の特許出願支援制度に採択され、2014 年 1 月 31 日 PCT 国際特許出願済

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 史子 (ITO H Fumiko)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号: 7 0 6 0 2 5 8 2

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者