

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701045

研究課題名（和文）内皮細胞における内皮間葉分化転換のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms by which endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells

研究代表者

吉松 康裕 (Yoshimatsu Yasuhiro)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60586684

研究成果の概要（和文）：生体内において血管内皮細胞が内皮間葉分化転換(EndMT)により間葉系の細胞になることで心疾患やがんの悪性化に関与することが示されている。本研究においては EndMT がどのような分子機構でこの現象を引き起こしているかを検討した。成果としては、内皮細胞 MS-1 において EndMT を誘導する代表的な分子である TGF- β により MRTF-A という転写因子の発現および核内への移行が可能になることにより間葉系の代表的な遺伝子 smooth muscle alpha-actin の発現が誘導され、EndMT が引き起こされるというメカニズムを確立することができた。

研究成果の概要（英文）：Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) in which endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells has been implicated in the malignant phenotypes of heart diseases and tumorigenesis in the human body. In this study, we elucidated the molecular mechanisms by which endothelial cells undergo EndMT. As a molecular mechanism for EndMT, we found that TGF- β , a representative EndMT-inducing cytokine, induces the expression of the mesenchymal marker Smooth Muscle Alpha-Actin through inducing the expression and the nuclear translocation of the transcription factor MRTF-A during EndMT in MS-1 endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：がん微小環境

キーワード：血管内皮細胞、がん関連線維芽細胞、内皮間葉分化転換、TGF- β

1. 研究開始当初の背景

(1) 先進諸国の死因トップに挙げられる癌と心疾患において間質細胞が重要な役割を果たすことが明らかにされている。癌の微小環境における腫瘍線維芽細胞(がん関連線維芽細胞)は癌細胞の増殖や遊走などを調節する因子を分泌することによって癌の悪性化を誘導することが示されている。また心疾患に伴って集積する線維芽細胞は細胞外基質を過剰産生することにより心臓の線維化の原因となる。近年こうした間質細胞のおよそ三

割が血管内皮細胞由来であることがマウスモデルにより示され、今後こうした間質細胞の形成機構の解明により治療法の開発につながることを期待される。

(2) このように血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化する現象は内皮間葉分化転換(EndMT)と呼ばれるが、本来心臓発生における弁形成において見られる重要な現象であることが以前から明らかにされていた。心臓の発生異常を示す遺伝性疾患や遺伝子欠損

マウスを用いた解析により、心臓発生における EndMT では transforming growth factor (TGF)- β シグナルが重要な役割を果たすことが示唆されていたが、TGF- β シグナルがどのような転写因子の発現を誘導することにより EndMT を引き起こすかについては未解明のままであった。

(3) 申請者らはマウス ES 細胞由来の血管内皮細胞が TGF- β 2 を添加することにより、間葉細胞へと分化することを発見した。その際、内皮マーカー Claudin-5 の発現が低下し、間葉マーカー Smooth Muscle Alpha-Actin (SMA) の発現が上昇した。TGF- β 2 による EndMT においては転写因子 Snail が重要かつ十分であることを報告した。

また申請者らはさらに複数の内皮培養細胞でも同様に TGF- β 2 により EndMT が引き起こされることを見出している。

(4) 上記のように TGF- β という EndMT 誘導シグナルによって Snail という EndMT 転写因子が誘導され、claudin-5 の発現低下や SMA の発現上昇などにより EndMT が引き起こされる。しかし健康な成体においては EndMT は起こらないことや申請者の所属する研究室の実験系ではすべての内皮細胞で起こるわけではないことも見出していることから、腫瘍などにおける微小環境（外因性因子）または血管内皮細胞そのもの（内因性因子）の違いにより EndMT の誘導効率が規定されていることが推測される。これらのことは内皮細胞が外因性因子により内因性因子の発現量や活性が変化し、細胞自体の性質が変化している（分化転換を受ける）ことを示唆している。しかし、何がこれらの変化効率（EndMT 誘導効率）を規定しているかはほとんど未解明である。

2. 研究の目的

(1) 申請者らは TGF- β （誘導シグナル）が Snail（転写因子）を介して claudin-5 や SMA（実行因子）の発現を調節して EndMT を引き起こすことを見出した。また、このシグナルに Wnt（シグナル）が関与していることが示された。一方で Notch（シグナル）が Slug（転写因子）を介して VE-cadherin（実行因子）の発現を低下させるという報告もある。そこでこれらのシグナルを考慮しながら、様々な内皮細胞を用いて EndMT を誘導する共通の分子機構を見出し、誘導シグナル・転写因子・実行因子をそれぞれ同定する。

(2) 「なぜ成体では癌などの病的状態でしか EndMT は観察されないのか」という疑問を解明するために、腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の性質が異なるという報告に注目して、(1) で同定された因子が腫瘍血管内皮細胞においても同様に機能しているか検討する。正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞において発現が異なるか、EndMT の誘導効率が異なるかを検討し、EndMT 誘導効率を規定する内因性因子を同定する。

(3) (1) と (2) によって同定されたシグナルなどを標的とした阻害剤などを用いて EndMT を抑制できるかを検討する。そのためにまず血管内皮細胞由来の腫瘍線維芽細胞を標識できるトランスジェニックマウスにおいて EndMT による腫瘍線維芽細胞の生成を確認し、さらにそれが抑制できるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 様々な内皮細胞を用いて TGF- β 、Notch などの誘導因子を添加して EndMT を起こしやすい内皮細胞を絞り込み、それを用いて「EndMT を誘導するシグナル→転写因子→実行因子」を網羅的に同定する。また申請者らがこれまでに（他の報告とは別に新たに）EndMT が起こることを見出した内皮細胞を中心にその機能を in vitro レベルで検討する。「外因性シグナル」については同定された EndMT を起こしやすい内皮細胞に TGF- β 、Notch 以外のシグナル (Wnt、FGF、hedgehog など) を伝達させて EndMT が起こるか検討する。またこれらのシグナルが TGF- β 、Notch による EndMT 誘導を調節する可能性についても検討する。「転写因子」については TGF- β 、Notch シグナルに加えて同定された先述のシグナルにより発現が誘導される転写因子を cDNA マイクロアレイの手法を用いて網羅的に同定する。「実行因子」については同様にすでに EndMT において発現が変化することが示されている SMA、claudin-5 などの EndMT に伴う細胞生物学的変化の指標となるマーカーに注目して cDNA マイクロアレイのデータを元に同定する。候補因子の機能解析においては発現が変化した転写因子については EndMT を起こしやすい内皮細胞において遺伝子操作を行うことで gain/loss-of-function の実験を行い、EndMT 誘導シグナルによる EndMT における機能を検討する。これらはすでに当研究室で系が確立されたアデノウィルスによる遺伝子導入、およびリポフェクション試

薬を用いた siRNA 導入により行う。

(2) 当研究室ではマウス ES 細胞由来の血管内皮細胞および培養内皮細胞株が EndMT を起こすことを見出しているが、内皮細胞における共通機構としての EndMT を解明するためにはより多くの細胞で現象をとらえたいと考えており、市販の初代内皮細胞に TGF- β 、Notch などを添加して EndMT を起こしやすい内皮細胞を見出す。

(3) TGF- β や Notch シグナルが発生期や、成体では癌などの病的状態でしか EndMT を誘導しないということは、血管内皮細胞自身が多様性を持ち、何らかの内因性因子によって EndMT の誘導効率が規定されているという仮説が立てられる。同じマウス個体から調製した正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞は異なる性質を示すことが報告されていることから、両者の比較により、EndMT 誘導効率を規定する内因性因子を同定することを試みる。

腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞を比較して TGF- β 、Notch などの誘導シグナルによる EndMT の効率に差があるか検討する。

(4) 血管内皮細胞由来の腫瘍線維芽細胞を標識できるトランスジェニックマウスを樹立する。EndMT により生成した間質細胞を他の間質細胞と見分けるには「以前血管内皮細胞であった」ことを標識するために Cre 遺伝子が一回でも発現すると LacZ 遺伝子が発現し続けるレポーターマウスに血管内皮特異的に Cre 遺伝子を発現する Tie2-Cre または VE-cadherin-Cre マウスを交配する。このマウスに B16 や LLC 細胞などの腫瘍移植を行い、CAF の生成を試みる。このマウスで増大した腫瘍内で LacZ 陽性：FSP1 (間質細胞マーカー) 陽性の細胞が EndMT を起こした細胞である。

(5) 単独のシグナルの抑制は特異的な TGF- β 阻害剤などが存在するため、内因性因子の解析中に随時行うが、EndMT には複数のシグナルが関わっていることが予想され、EndMT を効果的に抑制するにはそれらを抑制することが必要となることが考えられるため、複数の阻害剤を用いた効率的なシグナルの抑制方法を検討する。TGF- β 阻害剤をマウスに投与する実験系は当研究室ですでに確立されている。

4. 研究成果

(1) 我々は以前報告した ES 由来の血管内皮細胞に加えて、臍臓由来マウス血管内皮細胞 MS-1 および脳由来マウス血管内皮細胞 b.End3 が TGF- β により SMA の発現を顕著に上昇させ、EndMT を起こすことを見出した。その後詳細な分子機構の解析を MS-1 で行ったところ、TGF- β により太いストレスファイバーを形成し、内皮細胞特有の敷石状から紡錘形へと著しく形態変化を引き起こしていた。このとき、SMA の発現上昇と同時に VE-cadherin の発現低下が両者の共染色により示された。また、SMA や Smooth muscle protein 22-alpha (SM22 α) の発現誘導には Rho-ROCK シグナルが関与しており、RhoGTPase、ROCK それぞれの阻害剤で SMA や SM22 α の発現上昇は抑制された。TGF- β で他の間葉系マーカー SM22 α 、fibronectin1、MMP2 が同様に発現誘導され、これらは TGF- β 下流の Smad シグナルを介していることが明らかになった。RhoGTPase の活性化に関与する ARHGEF5 (グアニンヌクレオチド交換因子) が Smad シグナル依存的に発現上昇して、SMA の発現に関与していることが明らかになった。さらに血管平滑筋細胞への分化に重要な役割を果たすことが明らかになっている転写因子 MRTF-A が SMA の発現誘導に必須であることがわかり、このメカニズムとして MRTF-A の発現が TGF- β によって誘導され、且つ Rho シグナルによって核内移行が誘導されること、つまり、TGF- β が Rho-ROCK シグナルを活性化しているので、TGF- β が MRTF-A の活性に対して 2 重の活性化機構を持つことにより SMA の発現誘導に関わっていることが明らかになった。

(2) さらに TGF- β シグナルを調節する外因性の因子として MS-1 を用い解析を進めたところ、SMA や SM22 α の発現を協調的に亢進させる炎症性サイトカインおよび抑制的に働く細胞増殖因子 (FGFs) を同定した。前者については中和抗体および下流シグナル因子の阻害剤を用いて SMA の発現を抑制できるかを検討し、後者については下流のシグナル因子の阻害剤を用いて SMA の発現を亢進させることができるかについて検討を行ってきた。TGF- β の効果および FGF の効果を解析するため、それぞれを添加した細胞および両者を添加した細胞から抽出した RNA を元に cDNA マイクロアレイを行った。この解析から FGF の下流で働く転写因子の候補を絞り込み、解析を進め、この転写因子の作用を抑制すると SMA の発現が亢進することを見出した。現在は SMA の発現誘導・抑制メカニズムについて転写因子と作用 DNA 領域について詳細な解析を進めている。

(3) マウスを用いた動物実験では EndMT によって腫瘍線維芽細胞に分化転換した血管内皮細胞をトレースできる Tie2-Cre および VE-cadherin-Cre マウスを用いて B16 の腫瘍移植を行い、LacZ と FSP1 または SMA の共染色により血管内皮由来の線維芽細胞を同定した。内皮細胞マーカーでの染色領域に対して SMA との共染色領域を比較することで EndMT を in situ で検出することができることを見出した。TGF- β 阻害剤および FGF 下流に位置する因子の阻害剤を用いた検討を行い、マウスレベルでの EndMT に FGF シグナルが関与しているかを検討している。

MS-1 を用いて TGF- β によって誘導される EndMT の詳細なメカニズムに迫った解析が行われた。近年、EndMT に関する論文は増えてきているが、ここまで詳細に細胞レベルで分子機構を解析した報告は数少ないため、国内外で EndMT の研究を行っているグループに対してインパクトが大きいのみならず、今回特に TGF- β シグナルについては Smad シグナル non-Smad シグナルの違いにまで踏み込み解析を行うことができたため、TGF- β シグナルについて研究を行っているグループに対しても良い知見になると考えられる。

EndMT において TGF- β のシグナルを調節する因子として FGF シグナルについて主に研究を進めているが、特に血管内皮細胞をトレースできるマウスを使用した解析まで詳細に行っているグループは国内外を含めてほとんどないため、この成果は大きな知見として受け止められると思われる。

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 2 件)

(1) Hajime Mihira, Hiroshi I. Suzuki, Yuichi Akatsu, Yasuhiro Yoshimatsu, Takashi Igarashi, Kohei Miyazono and Tetsuro Watabe
TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. Journal of Biochemistry. 2012 Feb;151(2):145-56. doi:

10.1093/jb/mvr121. 査読有

(2) Yasuhiro Yoshimatsu and Tetsuro Watabe
Roles of TGF- β signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis. International Journal of Inflammation 2011;2011:724080. doi: 10.4061/2011/724080. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

(1) Tetsuro Watabe, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,
Roles of signaling and transcriptional networks during TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition. The 9th AACR-JCA joint conference, 2013 年 2 月 24 日, Maui, HI, U.S.A.

(2) Yuichi Akatsu, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,
FGF signals inhibit the TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition. 第 20 回日本血管生物医学会学術総会, 2012 年 12 月 7 日, 徳島、徳島県郷土文化会館

(3) Tetsuro Watabe, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,
Activation of signaling and transcriptional networks during TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition. International Vascular Biology Meeting 2012, 2012 年 6 月 4 日, Wiesbaden, Germany

(4) Yuichi Akatsu, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,
In vitro and in vivo analysis of

mesenchymal cells originated by endothelial-mesenchymal transition.

International Vascular Biology Meeting 2012, 2012 年 6 月 4 日, Wiesbaden, Germany

(5) Hajime Mihira, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,

TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A

第 19 回日本血管生物医学会学術総会, 2011 年 12 月 8 日, 東京, 東京ステーションコンファレンス

(6) Tetsuro Watabe, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,

Activation of signaling and transcriptional networks during TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition.

TGF- β meeting in Uppsala, 2011 年 8 月 17 日, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden

(7) Hajime Mihira, Yasuhiro Yoshimatsu et al.,

TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A

第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011 年 8 月 12 日東京, グランドプリンスホテル新高輪

〔図書〕(計 1 件)

佐藤靖史・森田育男・高倉伸幸・小室一成 (監修者4名)、朝倉書店、血管生物医学事典、2011 年、217-219.

5. 研究組織

(1) 研究代表者

吉松 康裕 (Yoshimatsu Yasuhiro)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号: 60586684