

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460263

研究課題名(和文) Ras下流シグナルの種類および強度に依存する内皮・上皮組織形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the role of Ras downstream pathways and Ras signal strength in angio/lymphangiogenesis and epidermal morphogenesis

研究代表者

市瀬 広武 (ICHISE, Hirotake)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：10313090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞が内皮細胞としての性質を失い、線維芽細胞あるいは平滑筋細胞に似た性質を獲得する、内皮間葉移行という現象が知られる。この現象がヒト疾患に深く関わるのが近年わかってきているが、その分子基盤は明らかでない。われわれは、リンパ管内皮細胞においても同様の現象が認められることを見出した。さらに、リンパ管内皮細胞において、FGF受容体シグナルおよびRas-Erk MAPキナーゼシグナル経路の活性化が、内皮特異的遺伝子の発現を促進するとともに、TGF-betaシグナル経路を抑制することで内皮間葉移行を抑制し、リンパ管内皮細胞としての性質を維持する役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) is implicated in human diseases. However, the molecular basis of EndMT remains largely unknown. We found that  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive lymphatic endothelial cells (LECs) appear in mouse lymphedematous skin in vivo. Mouse immortalized LECs lost their characteristics and underwent EndMT when cultured in FGF2-depleted medium in vitro. FGF2 depletion acted synergistically with TGF $\beta$  to induce EndMT. In contrast, H-Ras-overexpressing LECs were resistant to EndMT. Activation of Ras not only upregulated FGF2-induced activation of the Erk MAP kinases and LEC-specific gene expression, but also suppressed TGF $\beta$ -induced activation of Smad2 by modulating Smad2 phosphorylation by Erk MAPKs. Our findings provide a new insight into the FGF2-Ras-MAPK-dependent mechanism that maintains and modulates the LEC trait.

研究分野：遺伝学

キーワード：マウス Ras Erk リンパ管 内皮間葉移行 表皮

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達の ON/OFF スイッチとしての GTP 結合タンパク質 Ras (H, N, K-Ras)の機能は、生化学的にはよく理解されており、活性変異型 Ras の発がんにおける重要性も広く認識されるようになって久しい。近年では、RAS 遺伝子の活性型変異によるヒト遺伝性疾患 (RASopathy あるいは RAS/MAPK 症候群) の存在も明らかになった。しかし、野生型 Ras の発生および分化における役割については、KO マウスの致死的表現型によって Ras の必要性が示されているものの (Nakamura, 2008; 引用文献) その発生異常の機序や分子機構の詳細については不明であり、ほとんど理解が進んでいない。

われわれは、*ras* 遺伝子多重欠損マウスの表現型解析 (Nakamura, 2008; 引用文献) を発展させ、遺伝子改変マウスおよび不死化リンパ管内皮細胞を用いて、リンパ管内皮細胞における Ras の発現量および活性がリンパ管の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした (図 1、Ichise, 2010; 引用文献)。また、Ras シグナルがリンパ管形成において重要な役割を果たす受容体 VEGFR-3 の下流で機能すると同時に、VEGFR-3 の発現を転写レベルで調節していることを見出した (Ichise, 2010; 引用文献)。そして、Ras/MAPK シグナルによる *Vegfr3* 遺伝子発現の転写制御機構の実体を明らかにした (Ichise, 2012; 引用文献)。

しかし、Ras シグナルは、複数のエフェクター分子の存在によって複数の下流シグナル経路に分岐する。そのため、発生異常の機序とその分子機構を知る上で、Ras シグナルの変化に起因する細胞・組織の変化が、どの Ras 下流シグナルによって引き起こされるのかを理解する必要があった。

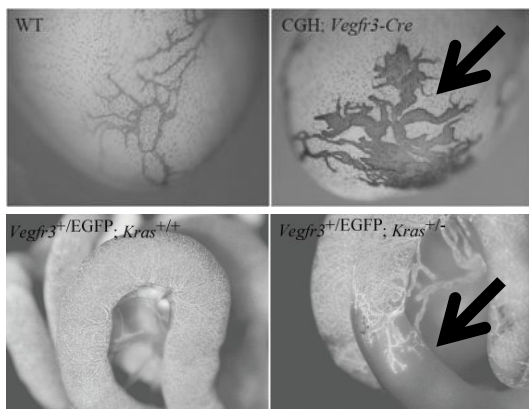


図 1 Ras の発現量および活性に依存したリンパ管形成。写真は、CGH4; *Vegfr3-Cre* マウスでの H-Ras 過剰発現 Lyve1 陽性リンパ管の過形成 (右上矢印) *Vegfr3-EGFP* ノック

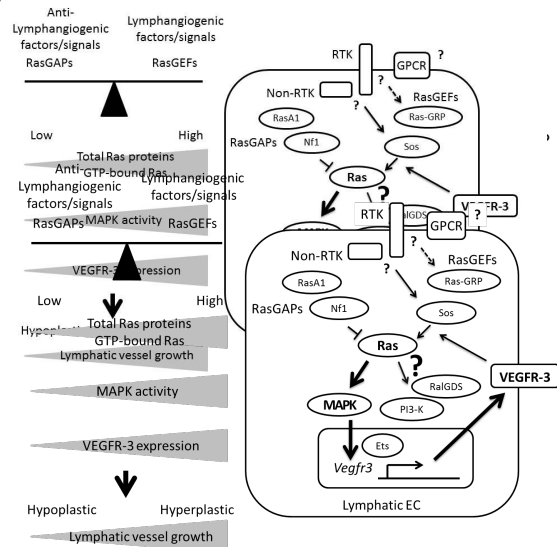


図 2 研究開始時における、Ras の発現量および活性に依存したリンパ管形成に関する知見を示した模式図。リンパ管内皮細胞における Ras 活性制御のバランスが、リンパ管形成に重要であることは確かであるが、Ras 下流シグナル (MAPK、PI3K、RalGDS (RalGEF) など) の意義、役割について、さらに理解を深める必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、野生型 H-Ras あるいは H-Ras エフェクタードメイン変異体を Cre 組換えに依存してコンディショナルに過剰発現するマウスを用いて、血管・リンパ管・皮膚の形成異常の有無や性状を比較し、当該組織での Ras 下流エフェクター経路の役割を明らかにすること、そして、*in vitro* の実験によって、分子レベルでの Ras 下流エフェクター経路の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) H-Ras エフェクタードメイン変異体を Cre 組換えに依存してコンディショナルに過剰発現するマウスの作成

用いた H-Ras エフェクタードメイン変異体は、以下の 4 種類である。HrasS35 (T35S 変異、MAPK 経路をドライブする)、HrasG37 (E37G 変異、RalGEF 経路をドライブする)、HrasC40 (Y40C 変異、PI3K 経路をドライブする)、HrasE38 (D38E 変異、MAPK 経路をドライブする)。野生型 H-Ras を発現するマウスとして、引用文献 (Ichise, 2010) に記載したマウス (CGH4 トランスジェニックマウス) を用いた。H-Ras の *in vivo* での発現パターンおよび発現量を一定にするために、CGH4 トランスジーン組み込み位置への標的遺伝子組換えでトランスジーンを導入することで H-Ras エフェクタードメイン変異体を発現するマウスを作成した。CGH4 遺伝子組み込み位置をクローニングして構築し

たターゲティングベクターを用いて、同じゲノム上の位置に ES 細胞での相同組換えで導入することで、全システムを作成した。CGH4 マウス同様、H-Ras と同時に EGFP が発現するようにし、EGFP を利用して Cre 組換えによる H-Ras 過剰発現マウスの迅速な同定、H-Ras 過剰発現組織・細胞の同定および定量・数値化を行えるようにした。

(2) 血管・リンパ管形成異常および皮膚形成異常を指標にした、生体における Ras 下流シグナル経路の解析

Cre ドライバーとして、内皮細胞での機能解析には *Tie2-Cre Tg* マウス (JAX) および *Lyve1-EGFP<sup>h</sup>Cre* knock-in マウス (JAX) を、皮膚表皮細胞での機能解析には *K14-Cre* マウス (JAX) を用いた。血管・リンパ管の解析は、免疫染色による組織学的解析を中心に行った。脈管のパターンや面積の評価を行った。皮膚の解析については、パラフィン切片の HE 染色による病理学的定義付けと、皮膚組織の表皮・毛胞分化マーカーの免疫染色による形態形成異常の定義付けを行った。

(3) 外的刺激に対する応答性や培養下での形態形成異常を指標にした、細胞における Ras 下流シグナル経路の解析

変異型 SV40 抗原による不死化内皮細胞の分離・培養手法 (Yamaguchi, 2008; 引用文献) を利用して、マウスから遺伝子改変内皮細胞を準備した。2 次元培養やマトリゲル上での内皮細胞のネットワーク形成系において、増殖因子刺激、シグナル伝達阻害剤などを利用したシグナル伝達の解析を行った。

表皮細胞についても、マウス表皮細胞の初代培養を行い、細胞の増殖、生存性や Ras 下流シグナルの分子機構について解析した。

#### 4. 研究成果

野生型 H-Ras を Cre 組換えに依存してコンディショナルに過剰発現するトランスジェニックマウス、CGH4 マウス (Ichise, 2010; 引用文献) においてトランスジーンが組み込まれているゲノム領域が、トランスジーンを発現を抑制しないゲノム領域、いわゆる safe harbor 領域であることを明らかにし、査読有雑誌論文 として公表した。この成果は、遺伝子改変マウス作出技術の向上に寄与するとともに、Ras シグナル解析のための、十分にコントロールされた実験系が作出できていることを裏付けるものである。

Ras 下流シグナルのうち、Erk MAP キナーゼ経路がリンパ管内皮細胞において果たす役割について、新たな知見を得た。血管内皮細胞が、内皮細胞としての性質を失い、線維芽細胞あるいは平滑筋細胞に似た性質を

獲得する、内皮間葉移行 (あるいは内皮・間充 織 転 換、Endothelial-to-Mesenchymal Transition: EndMT) という現象が知られる。この現象が、正常発生や疾患に深く関わることが近年明らかになってきているが、われわれは、生体および培養系の両方において、リンパ管内皮細胞においても類似した現象が認められることを見出した。さらに、リンパ管内皮細胞において、FGFR を介した FGF2 の刺激、および Ras-Erk MAP キナーゼシグナル経路の活性化が、内皮特異的遺伝子の発現を促進するとともに、Smad2 を介した TGFβ シグナル経路を抑制することで内皮間葉移行を抑制し、リンパ管内皮細胞としての性質を維持する役割を果たすことを明らかにした (図3)。この成果は、査読有雑誌論文 として公表した。

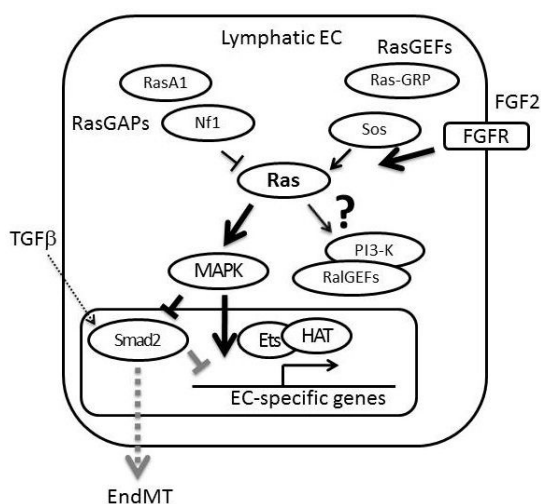


図3 本研究課題で明らかにした、リンパ管内皮細胞における FGF2/FGFR/Ras/MAPK シグナルの役割を示す模式図。

一方、皮膚形成異常を指標にした、Ras の下流シグナル経路の表皮細胞における役割の検討では興味深い知見を得た。変異型 Ras の種類にかかわらず、胎生期から出生にかけての表皮および毛包の形成には異常が認められなかったが、生後の発育に伴い、変異型 Ras の種類に特徴的な、毛包間表皮および毛包の形態形成異常が認められた。表皮細胞の増殖、分化において、Raf 経路、PI3 キナーゼ経路、RalGEF 経路がそれぞれ独自の役割を担っている可能性が示唆された。

#### 引用文献

Nakamura, K., Ichise, H., Nakao, K., Hatta, T., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Katsuki, M. Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. *Oncogene*. 27:2961-2968, 2008

Ichise, T., Yoshida, N., Ichise, H. H-, N- and Kras cooperatively regulate lymphatic vessel growth by modulating VEGFR3 expression in lymphatic endothelial cells in mice. *Development*. 137:1003-1013, 2010

Ichise, T., Yoshida, N., Ichise, H. Ras/MAPK signaling modulates VEGFR-3 expression through Ets-mediated p300 recruitment and histone acetylation on the Vegfr3 gene in lymphatic endothelial cells. *PLoS One*. 7:e51639, 2012

Yamaguchi, T., Ichise, T., Iwata, O., Hori, A., Adachi, T., Nakamura, M., Yoshida, N., Ichise, H. Development of a new method for isolation and long-term culture of organ-specific blood vascular and lymphatic endothelial cells of the mouse. *FEBS J*. 275:1988-1998, 2008

#### 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)

Ichise, H., Ichise, T., Sasanuma, H., Yoshida, N. The Cd6 gene as a permissive locus for targeted transgenesis in the mouse. *genesis*. 52:440-450, 2014  
doi: 10.1002/dvg.22779

Ichise, T., Yoshida, N., Ichise, H. FGF2-induced Ras-MAPK signalling maintains lymphatic endothelial cell identity by upregulating endothelial-cell-specific gene expression and suppressing TGFβ signalling through Smad2. *J Cell Sci*. 127:845-857, 2014  
doi: 10.1242/jcs.137836

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cem\\_ger/HPid\\_enshikinou/main.html](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cem_ger/HPid_enshikinou/main.html)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

市瀬 広武 (ICHISE, Hirotake)  
東京大学・医科学研究所・講師  
研究者番号：10313090

##### (2)研究分担者

市瀬 多恵子 (ICHISE, Taeko)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：00396863

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：