

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460473

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミング法によるリンパ管内皮細胞の作製

研究課題名(英文)Establishment of induced lymphatic endothelial cells by direct reprogramming

研究代表者

渡部 徹郎(Watabe, Tetsuro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00334235

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)：体液の恒常性を維持しているリンパ管の機能不全により引き起こされるリンパ浮腫は、国内外で多くの患者がいるにも関わらず、有効な治療法は開発されていない。本課題においてはリンパ管内皮細胞を誘導する因子を同定し、線維芽細胞に導入することでリンパ管内皮細胞を作製することを試みてきた。これまでProx1などの複数の転写因子を導入することでリンパ管内皮細胞のマーカーの内因性発現が上昇すること、さらにリンパ管内皮細胞をTGF- $\beta$ 等の阻害剤を添加することでリンパ管内皮細胞の増殖と特異マーカーの発現が亢進することを見出してきた。以上の成果は、リンパ浮腫の再生医療に向けた大きな一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The lymphatic system is a network of lymphatic vessels throughout the body which collect excess lymph fluid. Impaired flow of the lymphatic system results in lymphedema. The present study attempted to establish induced lymphatic endothelial cells using direct reprogramming. Introduction of several transcription factors to fibroblasts including Prox1 led to the increased expression of various lymphatic endothelial cells. Furthermore, addition of specific inhibitors for TGF- $\beta$  increased the proliferation of lymphatic endothelial cells, and the expression of lymphatic endothelial cell markers. These findings will aid to establish novel therapeutic methods for the regenerative medicine of lymphedema.

研究分野：病態生化学

キーワード：リンパ管

1. 研究開始当初の背景

血液は心臓から動脈へ送り込まれ毛細血管・静脈を経て心臓へ戻る。この血管系とは別個に組織液の排水路を形成するものがリンパ管である。リンパ管は末梢組織で血管から漏出した間質液、などを血管系へと環流することにより血液の量や組成を一定に保ち、閉鎖循環系を維持している。リンパ管の形成異常により引き起こされる疾患としてリンパ浮腫があり、国内外で多くの患者がいるにも関わらず、有効な治療法は開発されていない。リンパ管を構成するリンパ管内皮細胞を用いた再生医療的な治療法には期待が集まっているため、リンパ管形成機構の解明は急務である。

さまざまな遺伝子改変動物を用いた研究から胎生期においてリンパ管を構成するリンパ管内皮細胞は血管内皮細胞から分化することが明らかになっている(図1)。申請者を含めた複数のグループがリンパ管内皮細胞の分化過程において Prox1 転写因子がマスター因子として機能していることを見出している。ただ、Prox1 は単独でリンパ管内皮細胞への分化を誘導することはできず、COUP-TFII や Ets2 などの転写因子と協調して分化を誘導することを申請者は報告してきており、この分野で申請者は国際的に先駆的な研究を進めてきた(図1)。

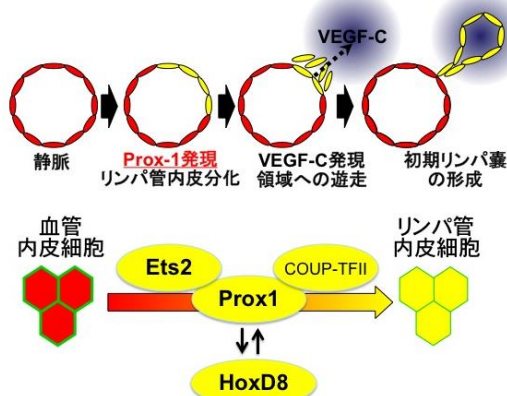


図1. リンパ管内皮細胞の分化機序

2. 研究の目的

近年、細胞の周辺環境や遺伝子発現パターンに人為的な操作をくわえることで、その細胞がおかれた分化状態を強制的に変更して、まったく別の性質をもった細胞を生み出せることが明らかになった。この現象はダイレクトリプログラミングとよばれ、これまで皮膚から抽出した線維芽細胞を神経系細胞や血管内皮細胞などへ直接に変化させることが可能になっている。したがって、リンパ管内皮細胞の運命決定因子を同定することができれば、それらを使って線維芽細胞をリンパ管内皮細胞へと直接に変化させることができるかもしれない。そこで本研究では、リンパ管内皮細胞の運命決定因子を同定し、皮膚の線維芽細胞からリンパ管内皮細胞(induced lymphatic endothelial cells: iLEC)を直

接作製することを試みる。

3. 研究の方法

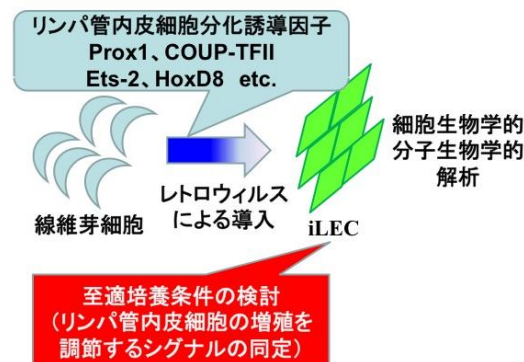


図2. 研究の方法

(1) ダイレクトリプログラミングによるリンパ管内皮細胞の分化誘導

マウス胎仔線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast: MEF)にリンパ管内皮細胞の分化に関与する転写因子をレトロウイルスを用いて導入し、リンパ管内皮細胞特異マーカーの発現を定量的 RT-PCR などの手法で検討した。

(2) リンパ管内皮細胞の至適培養条件の検討

ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞(HDLEC)に対して、様々なサイトカインを添加して、細胞増殖ならびに、リンパ管内皮細胞マーカーの発現を定量的 RT-PCR などの手法で解析した。

4. 研究成果

(1) ダイレクトリプログラミングによるリンパ管内皮細胞の分化誘導

リンパ管内皮細胞への分化に重要な役割を果たす Prox1 などの転写因子群を発現するレトロウイルスを作成し、マウス胚性線維芽細胞に感染させた。得られた細胞の遺伝子発現を解析したところ、線維芽細胞マーカーの発現が低下し、リンパ管内皮細胞のマーカーの発現が上昇していることを見出した。以上の結果から、検討した転写因子がリンパ管内皮細胞へのダイレクトリプログラミングを誘導する可能性が示唆された。

(2) リンパ管内皮細胞の至適培養条件の検討

リンパ管内皮細胞に対して transforming growth factor-β (TGF-β)を加えたところ、細胞の増殖が阻害され、さらにリンパ管内皮細胞のマーカーの発現が低下することを見出した。さらに、内因性 TGF-β シグナルを阻害するために TGF-β 受容体キナーゼ阻害作用を有する低分子化合物を加えたところ、リンパ管内皮細胞の増殖と特異マーカーの発現が亢進した。さらに、以前本課題でリンパ管内皮細胞の増殖を亢進する作用を有する骨形成因子(BMP)-9 シグナルの阻害剤と併せて TGF-β 阻害剤を用いたところ、さらに顕著な増殖促進作用が見出された。以上の結果から

内因性の TGF- $\beta$  ならびに BMP-9 シグナルを同時に抑制することにより、ダイレクトリプログラミングにより得られる iLEC の培養の効率の上昇が期待される。

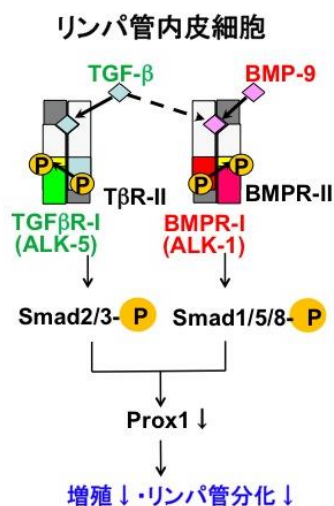


図3. リンパ管内皮細胞に対する TGF- $\beta$  ならびに BMP-9 の作用

#### 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 5 件)

- ① Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Tomizawa T, Takahashi K, Katsura A, Miyazono K, Watabe T. (2017) Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Cancer Science*. 108, 151-155. (査読あり)
- ② Katsura A, Suzuki HI, Ueno T, Mihira H, Yamazaki T, Yasuda T, Watabe T, Mano H, Yamada Y, #Miyazono K. (2016) MicroRNA-31 is a positive modulator of endothelial-mesenchymal transition and associated secretory phenotype induced by TGF- $\beta$ . *Genes to Cells*. 21:99-116. (査読あり)
- ③ Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, Kawasaki N, Holmborn K, Sundqvist A, Tsutsumi S, Watabe T, Aburatani H, Heldin CH, Miyazono K. (2016) BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Krüppel-like Factors. *Stem Cell Reports*. 6:64-73. (査読あり)
- ④ Miyazaki H, Yoshimatsu Y, Akatsu Y, Mishima K, Fukayama M, Watabe T, Miyazono K. (2014) Expression of PDGFR $\beta$  is maintained by Prox1 in lymphatic endothelial cells and is required for tumor lymphangiogenesis. *Cancer Science*. 105, 1116-1123. (査読あり)

- ⑤ Yoshimatsu Y, Lee YG, Akatsu Y, Taguchi L, Suzuki HI, Cunha SI, Maruyama K, Suzuki Y, Yamazaki T, Katsura A, Oh SP, Zimmers TA, Lee SJ, Pietras K, Koh GY, Miyazono K, Watabe T. (2013) Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, 18940-18945. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Watabe T Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *11th International BMP Conference* 2016.10.28 Boston (USA)
- ② 渡部 徹郎. がん微小環境における血管内皮間葉移行(EndMT)のシグナルネットワークの役割. *第75回日本癌学会総会* 2016.10.08 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜)
- ③ Watabe T. Roles of TGF- $\beta$  signals in endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) of lymphatic endothelial cells. *Gordon Research Conference Lymphatics* 2016.03.23 Ventura (USA)
- ④ Watabe T. Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *10th AACR-JCA Joint Conference* 2016.02.17 Hawaii (USA)
- ⑤ Watabe T. Roles of signaling networks during the formation and maintenance of vascular systems. *Asia-Australia Vascular Biology Meeting* 2015.10 Busan (Korea)
- ⑥ Watabe T Roles of signaling networks during endothelial-mesenchymal transition. *TGF- $\beta$  Meeting in Uppsala* 2015.08 Uppsala, (Sweden)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://cellular-biochemistry-tmdu.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 徹郎 (WATABE TETSURO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号：00334235

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし