

研究報告書

「血管の動的恒常性の破綻による疾患進展機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 渡部 徹郎

1. 研究のねらい

血管は血液や酸素、種々の因子などを各組織に運ぶことにより生体の恒常性を維持するのみならず、様々な形で周囲の組織と相互作用しあい、発生過程、臓器形成、病態形成過程等それぞれにおいて多彩な特徴や役割を有しており、生体の動的恒常性を維持する上で中心的な役割を果たしている。このような多様な血管構造は可塑的に変化することにより周辺臓器に影響を与えるが、特に炎症やがんなどの病的状態において血管内皮細胞が内皮間葉移行(EndMT)によって生じる間葉系細胞が病態を進行させることが明らかになりつつあり、治療の新規標的として注目を集めている。EndMT は形質転換増殖因子(TGF- β)ファミリーなどさまざまなシグナルにより調節されているが、まだ詳細な分子機構については不明な部分が多く、関連疾患の診断や治療を困難なものにしている。そこで本研究のねらいは EndMT の時間的な変化をリアルタイムで「見る」システムを構築し、EndMT の詳細な分子機構をゲノムレベルで「知る」ことにより、血管が果たす生体の動的恒常性維持の解明を行なうとともに、がん・心疾患・糖尿病などの疾患を病的な EndMT により血管の動的恒常性が破綻した状態ととらえて EndMT を標的として「治す」ことである。

2. 研究成果

(1) 概要

腫瘍組織において存在する線維芽細胞ががん細胞の増殖を亢進する成長因子を分泌することで、がんを進行させることが知られている。つまり、がんを撲滅するために、がん細胞以外のがん関連線維芽細胞(CAF)を標的とすることにより、新たな治療法を開発することができる可能性があるが、CAF がどのように形成させるかについては未解明な部分が多く残されている。本研究では、腫瘍組織において多く存在する炎症細胞が分泌する因子の一つである TGF- β が腫瘍血管における血管内皮細胞に働きかけ、間葉系細胞(線維芽細胞など)へと移行させることを見出した。この現象は内皮間葉移行(EndMT)と呼ばれるが、さらに本研究では腫瘍組織において豊富に存在する他の因子がどのようにして TGF- β による EndMT の誘導を調節するか明らかにした。本研究成果はがんの悪性化因子である EndMT がどのようにして誘導されるか、その分子機構を明らかにしたという点で、基礎医学における意義が大きいとともに、新たながんの治療法が開発できる可能性を開いたという点で社会におけるインパクトの大きさが期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A. EndMT を「見る」

(目的)リアルタイムで EndMT を検出できる実験系を作出する

(成果)血管内皮細胞を遺伝学的に標識する遺伝子改変マウス (EndMT レポーターマウス) を作出した。このマウスにおいては以前血管内皮細胞であったが、その性質を失っている間葉系細胞 (すでに EndMT を起こした細胞) ならびに現在 EndMT 過程にある細胞を検出することができることを見出した。

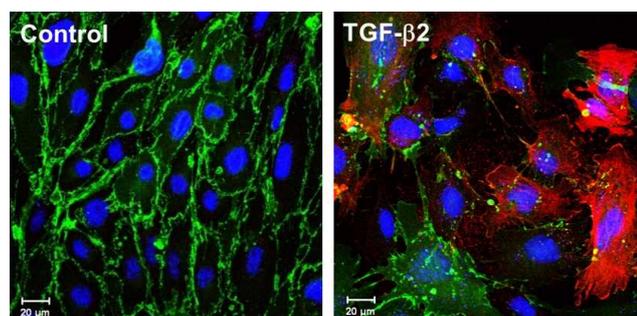
研究テーマ B. EndMT を「知る」

(目的)EndMT を誘導するシグナルの解明を試みる

(成果)がん微小環境におけるがん関連線維芽細胞 (CAF) はがん細胞の増殖や悪性を亢進することから、がん治療の新たな標的として注目を集めている。また、近年の報告により CAF の約 30% が血管内皮細胞から EndMT により形成されることが示されており、EndMT を抑制することでがんの進展を抑制する方法に期待が集まっている。多くの種類のがんにおいて炎症細胞由来が分泌する TGF- β が EndMT を誘導することが示されている。しかし、TGF- β がどのようにして EndMT を誘導するかについては詳細なメカニズムは解明されていない。

腫瘍組織における炎症細胞は TGF- β や TNF- α などの炎症性サイトカインを分泌することが知られており、TGF- β と TNF- α が協調してがん細胞の上皮間葉移行 (EMT) を誘導することにより、がんの悪性に重要な役割を果たすことが私たちのグループを含む複数のグループにより報告されているが、TNF- α の TGF- β による EndMT における役割については未解明な部分が多く残っていた。そこで、本研究課題においてはマウス脾臓由来の血管内皮細胞 MS-1 を用いて、TNF- α が TGF- β による EndMT の誘導においてどのような作用を持つか検討した。

MS-1 細胞は通常では血管内皮細胞のマーカである VE-cadherin を発現し、敷石状のシートを形成する (図左)。しかし、TGF- β を加えると多くの細胞において VE-cadherin 発現は消失し、間葉系マーカである smooth muscle α -actin (α SMA) の発現が上昇するとともに、細胞間接着が失われた (図右)。この TGF- β



緑：内皮マーカ (VE-cadherin) 赤：間葉系マーカ (α SMA) 青：核

による EndMT の誘導を TNF- α 存在下で行うと、TNF- α が TGF- β による EndMT を顕著に亢進していることが見出された。以上の結果から、がん微小環境において豊富に存在する炎症性サイトカインである TGF- β と TNF- α が協調して EndMT を誘導し、がんの悪性に寄与していることが示唆された。

研究テーマ C. EndMT を「治す」

(目的)EndMT を誘導するシグナルを抑制することにより、がんなどの EndMT が関連する疾患の新規治療方法の開発を目指す

(成果)TGF- β はEMT(上皮間葉移行)を誘導することにより、がん細胞の浸潤・転移を促すとともに EndMT を誘導することでがん微小環境におけるがん関連線維芽細胞の量を増やし、がん細胞の増殖や悪性化を亢進することから、TGF- β シグナルはがん治療の標的として注目を集めている。TGF- β には 1~3 の3つのアイソフォームがあり、それぞれ発現様式やシグナル伝達形式に差が見られる。TGF- β の阻害剤としてこれまで II 型受容体の細胞外領域に抗体の Fc 領域を結合したキメラ受容体(T β RII-Fc)が用いられてきたが、これは TGF- β 1 と TGF- β 3 は抑制するものの、TGF- β 2 は抑制できないことが示されてきた。一方 TGF- β 2 は発生過程において EndMT の誘導に重要な役割を果たすことが報告されていることから、本半期では TGF- β 2 を含む全ての TGF- β アイソフォームを抑制する阻害剤の開発を試みた。

T β RII-Fc に I 型受容体(ALK5)の細胞外領域を結合したタンデムキメラ受容体(ALK5-T β RII-Fc)を作成した。数種類の培養細胞を用いて T β RII-Fc と ALK5-T β RII-Fc の TGF- β 1~3 に対するシグナル抑制能を検討したところ、T β RII-Fc は TGF- β 1 と TGF- β 3 のみを抑制したが、ALK5-T β RII-Fc は全てのアイソフォームを抑制することができた。以上の結果から、ALK5-T β RII-Fc は全ての TGF- β アイソフォームを標的とできる新規阻害剤であることが示唆され、TGF- β 2 を高発現するがんなどの治療への使用が有効であることが期待される。本研究成果は特許出願を行った(特願 2014-163803)。

3. 今後の展開

本研究においては、がんなどの疾患において悪性化要因である EndMT の分子機構を明らかにすることを目的として TGF- β をはじめとした複数のシグナル伝達経路の役割と明らかにするとともに、それらのシグナルを標的とした新たな治療方法の開発を試みた。今後も本研究をさらに発展させていく予定であるが、これから EndMT を司る分子機構を詳細に明らかにすることにより、さまざまな疾患のみならず心臓の形成などの発生機序の解明が進むという点で基礎生物学上の意義は大きい。さらに、臨床医学の観点では、本課題において開発された TGF- β シグナルの新規阻害剤の利用などを通じて EndMT を標的とした癌や心疾患の治療法開発が期待されるという点でインパクトが大きい。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

本研究課題を開始した際には、EndMT レポーターマウスと培養細胞の両者を用いて EndMT の分子機構を解明し、関連疾患の治療法の樹立を試みる計画であった。後者の培養細胞を用いた解析は順調に進展し、すでに1報の論文が受理され、現在 2 報の論文を投稿中であり、さらに 2 報の論文を準備中である。得られた知見をもとに特許出願も2件行い、現在これらのツールを用いて前臨床試験を進行中であり、対象としている疾患ががん・心疾患・糖尿病といった患者数が多いことも考慮して、社会・経済への波及効果の大きさが期待される。つまり、本研究課題においては戦略的な基礎研究を推進することで、科学技術イノベーションのためのシーズを創出することができたと考えられ、この点では研究目的の達成状況は極めて良好である。

また、本研究課題の開始時(平成 24 年 10 月)には研究者は東京大学大学院医学系研究科

において准教授であったが、平成 25 年 7 月に東京薬科大学生命科学部において教授として独立した。研究室の運営は順調であり、研究実施体制及び研究費執行状況といった研究の進め方は良好であった。また、平成 27 年 7 月には東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科へ異動した。研究者自身にとっては、この異動は臨床研究の機会を大きくするなどの利点も考慮した上での重要な選択であったが、研究課題の遂行に対しては、これらの異動は多少の遅延を招いたと認めざるを得ない(特に EndMT レポーターマウスの樹立)。しかし、領域代表ならびに JST のご理解とご支援のおかげでこれらの遅延を最小限に留めて、研究期間中に EndMT レポーターマウスから血管内皮細胞を調製するところまで到達できたことは大変有難いと感じています。

このような中で、研究者自身にとってはさきがけ研究期間は研究者として大きな飛躍の期間となった。本研究課題は主に血管研究についてのものであったが、本さきがけ研究の成果が認められ、研究者は日本血管生物医学学会と日本リンパ学会の理事、さらに日本癌学会と日本生化学会の評議員に就任した。特に日本血管生物医学学会では中心的なメンバーとして第 18 回国際血管生物学会(平成 26 年 4 月)の開催に尽力した。また、国際学会の招待講演の回数が増え、血管・リンパ管研究においてはトップランナーの一人として活躍した。現在は血管をテーマとした新学術領域研究の課題を領域代表として提案しており、もしこの提案が採択されればさらに大きなステップアップが期待できる。以上は、領域代表、アドバイザーの先生方ならびにさきがけ研究者との交流のおかげであり、心より感謝しています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年 2 回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

炎症やがんなどの病的状態において血管内皮細胞が内皮間葉移行(EndMT)によって間葉系細胞を生じる。この間葉系細胞が各種病態を進行させることが明らかになりつつある。本研究者は腫瘍組織において TGF- β が腫瘍血管における血管内皮細胞に働きかけ、EndMT を誘導することを見出し、さらに腫瘍組織において豊富に存在する他の因子の TGF- β による EndMT の誘導における調節機構を明らかにした。本課題において開発された TGF- β シグナルの新規阻害剤の利用などを通じて EndMT を標的とした癌や心疾患の治療法開発が期待される。

研究費は、異動に伴って購入が必要となったリアルタイム PCR システムの購入のために 4160 千円の増額、さらに EndMT において起こる遺伝子発現変動をゲノムワイドで解析するために蛍光顕微鏡 2057 千円の増額を行った。

本研究者は、さきがけ研究により、海外の学会における招待講演も多数実施しており、原著論文の執筆も増えており、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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- β . *Genes to Cells*. 21:99-116

2. Miyazaki H, Yoshimatsu Y, Akatsu Y, Mishima K, Fukayama M, *Watabe T , Miyazono K. (2014) Expression of platelet-derived growth factor receptor β is maintained by Prox1 in lymphatic endothelial cells and is required for tumor lymphangiogenesis. <i>Cancer Science</i> . 105:1116-1123
3. 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. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> . 110:18940-18945
4. Yamazaki T, Suehiro J, Miyazaki H, Minami T, Kodama T, Miyazono K, *Watabe T . (2013) The COUP-TFII variant lacking a DNA-binding domain inhibits the activation of the Cyp7a1 promoter through physical interaction with COUP-TFII. <i>Biochemical Journal</i> . 452:345-357.
5. Suzuki HI, Mihira H, Watabe T , Sugimoto K, *Miyazono K. (2013) Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation in cancer transcriptome analysis. <i>Nucleic Acids Research</i> . 41:e62.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

1.

発 明 者: 渡部徹郎、宮園浩平、鯉沼代造、江幡正悟、赤津裕一

発明の名称: TGF β 阻害機能を持つキメラタンパク質

出 願 人: 東京大学

出 願 日: 2014/8/11

出 願 番 号: 特願 2014-163803

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、等)

主要な学会発表

1. **Watabe T**. Roles of signaling and transcriptional networks during the formation of vascular systems (2015) *Asia-Australia Vascular Biology Meeting*, Busan, Korea (招待講演)
2. **Watabe T**. Roles of signaling and transcriptional networks during the formation of vascular systems. (2014) *The 18th International Vascular Biology Meeting*, Kyoto, Japan (招待講演)
3. **Watabe T**. BMP-9/ALK-1 Signals Negatively Regulate Lymphatic Vessel Formation during Development and Cancer Progression through Down-regulation of Prox1 Expression (2014) *Gordon Research Conference on Molecular Mechanisms in Lymphatic Function and Disease*, Lucca, Italy (招待講演)
4. **Watabe T**. Roles of TGF- β family signals during the formation of vascular systems. (2013) *Joint Symposium of 2nd Asia-Pacific Vascular Biology and 10th Frontiers of Biomedical Sciences*, Tainan, Taiwan (招待講演)
5. **Watabe T**. FGF2 negatively regulates endothelial-to-mesenchymal transition in tumor microenvironment. (2013) *TGF- β Meeting in Uppsala*, Uppsala, Sweden (招待講演)