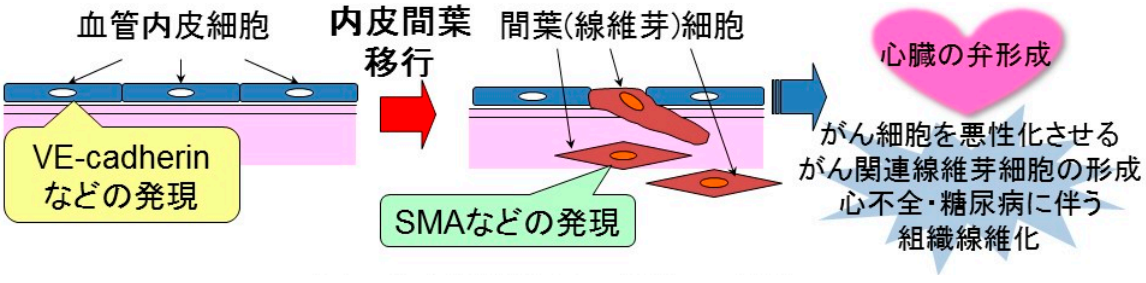
67　内皮間葉移行の分子基盤の解明と関連疾患治療法の開発	渡部　徹郎

【目的】血管は全身に分布し、組織に酸素や栄養分を供給することで生体の恒常性を維持するために中心的な役割を果たしている。近年、がんや心不全などの病的状態において血管を構成する血管内皮細胞が可塑的に変化し、間葉系細胞へと移行することがあきらかになりつつある。この内皮間葉移行（Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT）は、胎生期の心臓の弁形成において見出された生理的現象であるのみならず、がん・心不全に加えて、糖尿病・動脈硬化など様々な疾患の治療の新規標的として注目を集めている。我々はこれまで transforming growth factor（TGF）-βシグナルが内皮間葉移行を誘導することを報告してきたが、内皮間葉移行を制御する詳細な分子機構についてはいまだ不明な部分が多く、関連疾患の診断や治療を困難なものにしている。そこで本研究においては、内皮間葉移行の詳細な分子機構をゲノムレベルで理解することにより、がん・心不全・糖尿病などの内皮間葉移行により悪性化する疾患の新規診断・治療法を開発することを目的とする。

【方法】マウスならびにヒトの培養血管内皮細胞を用いて、TGF-βによる内皮間葉移行の誘導に対する線維芽細胞増殖因子（FGF-2）や骨形成因子（BMP-9）の作用を、αSMA などの間葉系マーカーの発現を定量的 RT-PCR、Western blotting、細胞免疫染色などの手法により検討した。また、内皮間葉移行を制御する BMP-9 シグナルの腫瘍形成に対する作用を検討するために、BMP-9 受容体である ALK1 の細胞外領域に抗体の Fc 領域を結合したキメラ受容体（ALK1-Fc）ならびに ALK1-Fc にさらに血管内皮細胞増殖因子（VEGF）受容体の細胞外領域を加えた ALK1FLT1-Fc を作製して、BxPC3 ヒト膵臓がん細胞において発現させたものを免疫不全マウスへ移植した

【結果】マウス血管内皮細胞を用いた解析により、腫瘍血管内皮細胞において発現が高い FGF-2 存在下では TGF-βによる内皮間葉移行の誘導は抑制され、FGF シグナルの下流因子である MEK の阻害剤により FGF-2 シグナルを阻害すると内皮間葉移行が亢進することが示された。また、ヒト血管内皮細胞に対して様々な腫瘍組織において発現が高い BMP-9 を加えたところ、複数の間葉系マーカーの発現が上昇すること、そして BMP-9 シグナルを阻害すると血管内皮細胞における TGF-β受容体の発現が低下することにより、内皮間葉移行の誘導は抑制されることが示された。以上の結果から、がん微小環境におけるさまざまな因子がバランスをとって血管内皮細胞の性質を決定していることが示唆された。さらに、BMP-9 シグナルと VEGF シグナルを同時に抑制する Fc キメラ受容体を発現させた BxPC3 膵臓がん細胞を免疫不全マウスの皮下に移植すると、腫瘍形成が低下することが示された。以上の結果から、内皮間葉移行を標的とした新たながんの治療方法の開発が期待されるという点で本研究成果のインパクトは大きい。

様々な病態の進行における内皮間葉移行の関与



67. 内皮間葉移行の分子基盤の解明と関連疾患治療法の開発

渡部　徹郎

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 硬組織病態生化学分野

Key words：血管，内皮間葉移行，がん，TGF-β，BMP

緒　言

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、近年、がんや心不全などの病的状態において血管を構成する血管内皮細胞が可塑的に変化し、間葉系細胞へと移行することがあきらかになりつつある。この内皮間葉移行（Endothelial Mesenchymal Transition：EndMT）は、1990 年代に胎生期の心臓の弁形成において見出された生理的現象である。しかし、近年内皮間葉移行によって生じる線維芽細胞ががんや心不全を悪性化させることを報告してから、爆発的に内皮間葉移行に関する論文数が増加し、現在内皮間葉移行は、がん・心不全に加えて、糖尿病・動脈硬化など様々な疾患の治療の新規標的として注目を集めている[1]。がん微小環境において豊富に存在する transforming growth factor（TGF）-βは、がん細胞の上皮間葉移行（EMT）を誘導することで、がんの悪性化・転移において重要な役割を果たしている［2]。我々はこれまで血管形成における TGF-βシグナルの役割を研究してきており［3]、TGF-βシグナルが様々な種類の血管内皮細胞の内皮間葉移行を誘導することを報告してきた［4, 5]。しかし、内皮間葉移行を制御する詳細な分子機構についてはいまだ不明な部分が多く、関連疾患の診断や治療を困難なものにしている。

そこで本研究においては病態の悪性化における内皮間葉移行の詳細な分子機構を理解することにより、がん・心不全・糖尿病などの内皮間葉移行により悪性化する疾患の新規診断・治療法を開発することを目的とした。

方法および結果

1. 内皮間葉移行の分子基盤を理解し、抑制するための分子標的を同定する

（1）線維芽細胞増殖因子（FGF）シグナルは TGF-βによる内皮間葉移行を阻害する

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化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内皮間葉移行により形成されることが示されており、内皮間葉移行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がん微小環境に豊富に存在する TGF-βが内皮間葉移行を誘導することが示されている。MS-1 培養血管内皮細胞は通常では血管内皮細胞のマーカーである VE-cadherin を発現し、敷石状のシートを形成する（図 1)。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、間葉系マーカーであるα-smooth muscle actin（αSMA）の発現が上昇するとともに、細胞間接着が失われた（図 1)。しかし、TGF-βによる内皮間葉移行の誘導がどのように制御されているかについては詳細なメカニズムは解明されていない。

腫瘍血管内皮細胞は TGF-βなどの内皮間葉移行を誘導するサイトカインが豊富な中で血管内皮細胞の性質を維持していることから、何らかの内皮間葉移行を抑制する機序が働いていることが予想される。我々は腫瘍組織から調製した腫瘍血管内皮細胞（TEC）を用いて内皮間葉移行を調節する因子の同定を試みた。その結果、TEC が発現する線維芽細胞増殖因子（FGF-2）により活性化されるシグナルが TGF-βによる内皮間葉移行の誘導を阻害することを見出した。MS-1 血管内皮細胞を用いた解析により、FGF-2 存在下では TGF-βによる内皮間葉移行の誘導は抑制され、FGF シ

グナルの下流因子である MEK の阻害剤（inh）により FGF-2 シグナルを阻害すると内皮間葉移行は亢進した（図 1）。以上の結果から、腫瘍血管内皮細胞は自ら FGF-2 を産生することで、がん微小環境においてその性質を失わないようにしていることが示唆された（投稿中）。

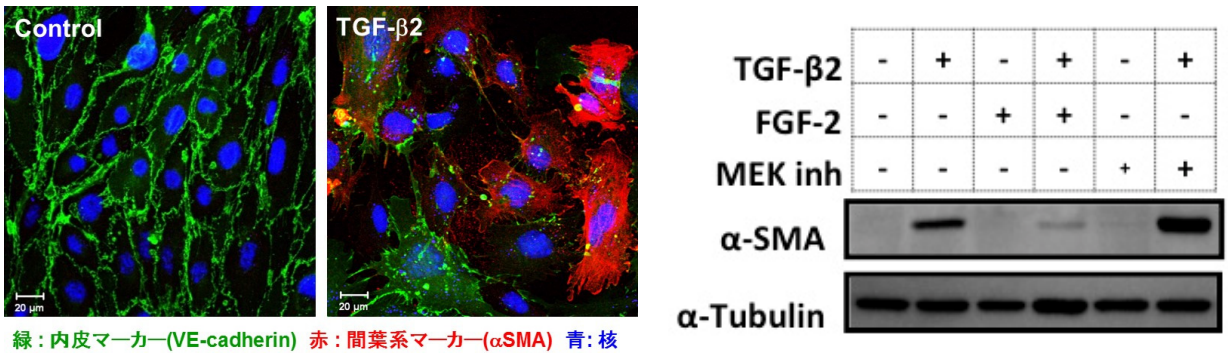


図 1. TGF-βによる内皮間葉移行に対する FGF シグナルの作用

（左）MS-1 血管内皮細胞（Control）を TGF-β2 存在下で 72 時間培養すると内皮細胞マーカーである VE-cadherin の発現は低下し、間葉系マーカーであるαSMA の発現が上昇する。（右）FGF-2 の添加により、TGF-β2 によるαSMA の発現上昇は阻害され、MEK 阻害剤の添加により FGF シグナルを阻害すると、TGF-β2 によるαSMA の発現上昇が亢進することが Western blotting により明らかになった。

（2）TGF-βシグナルによる内皮間葉移行において JAM-A の細胞膜表面における発現が重要な役割を果たす

我々はこれまで TGF-βシグナルにより血管内皮細胞が間葉系細胞の性質を獲得することを報告してきた。しかし、内皮間葉移行を介して生成した間葉系細胞がどのような表面抗原を発現しているか、そしてどのような分子機序で内皮間葉移行が誘導されるかについては未解明な部分が多く残されている。我々は、MS-1 血管内皮細胞に TGF-βおよび MEK 阻害剤を処理して得られた間葉系細胞を免疫原として Swiss ラットに免疫した。得られたハイブリドーマの培養上清を用いて、FACS 解析を行った。これまでに複数の抗体を樹立しており、得られた抗体を用いて免疫沈降を行い、質量分析を用いて抗原を同定することを試みた。このうち 90G4 抗体については CD321 を抗原として同定した。CD321 は JAM-A としてタイトジャンクションを構成するタンパク質の一つとしても知られている。90G4 抗体を用いて血管内皮細胞における CD321 の機能を解析したところ、細胞の接着や遊走時に細胞内へ内在化されていることが明らかとなった。また、90G4 抗体を用いた免疫染色により、in vitro で TGF-βにより誘導した内皮間葉移行後に分子の細胞内局在を変化させ内在化されることを明らかにした［6］。

（3）BMP-9 シグナルは TGF-βによる内皮間葉移行を亢進する

骨形成因子（BMP-9）は TGF-βスーパーファミリーのメンバーであり、そのシグナル伝達因子の異常はヒト遺伝性血管疾患の発症の原因となることから、BMP-9 シグナルは血管形成に重要な役割を果たすことが考えられる。我々は BMP-9 シグナルが血管［7］そしてリンパ管［8］の形成を制御していることを報告してきた。また、BMP-9 はがんの進展に伴い発現が上昇することから、内皮間葉移行を制御している可能性が考えられるが、その機序については明らかになっていなかった。そこで、本研究においてはヒト臍帯動脈内皮細胞（HUAEC）を用いて、BMP-9 が TGF-βによる内皮間葉移行の誘導においてどのような作用を持つか検討した。

HUAEC に対して BMP-9 を加えたところ、複数の間葉系マーカー（α-SMA、SM22a、SMcalponin）の発現が上昇することが示された（図 2）。また、BMP-9 シグナルを阻害すると血管内皮細胞における TGF-β受容体（ALK5）の発現が低下することから、BMP-9 が TGF-βシグナルを活性化することにより内皮間葉移行を亢進することが示唆された。

また、以上の結果からがん微小環境におけるさまざまな因子がバランスをとって血管内皮細胞の性質を決定していることが示唆された（投稿準備中）。

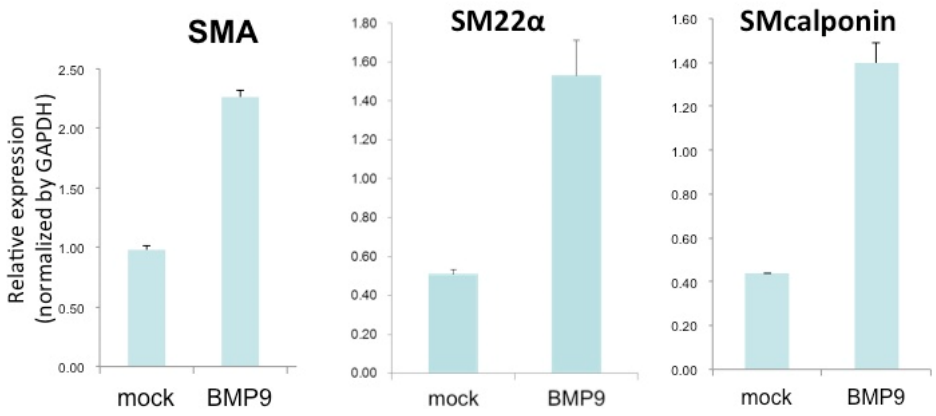


図 2. TGF-βによる内皮間葉移行に対する BMP-9 シグナルの作用
ヒト臍帯動脈内皮細胞（HUAEC）に BMP-9 存在下で 72 時間培養することにより、複数の間葉系マーカー（α-SMA、SM22a、SMcalponin）の発現が上昇することが定量的 RT-PCR により明らかになった。

2. 内皮間葉移行を標的とした関連疾患の新規診断・治療法を開発する

我々の過去の研究により、BMP-9 が血管新生を亢進する作用があることが示されている［7］。また、本研究課題の成果により、BMP-9 シグナルががんの悪性化要因である内皮間葉移行を亢進することが明らかとなった。そこでがん微小環境における BMP-9 シグナルを阻害するために、BMP-9 受容体である ALK1 の細胞外領域に抗体の Fc 領域を結合したキメラ受容体（ALK1-Fc）ならびに ALK1-Fc にさらに血管内皮細胞増殖因子（VEGF）受容体の細胞外領域を加えた ALK1FLT1-Fc を作製して、BxPC3 ヒト膵臓がん細胞において発現させたものを免疫不全マウスへ移植したところ、ALK1-Fc は腫瘍形成を阻害しなかったが、ALK1FLT1-Fc は腫瘍形成を有意に抑制することが示された（図 3）［9］。また、BMP-9 シグナルを抑制することで内皮間葉移行も低下した（投稿準備中）。以上の結果により、腫瘍組織内の BMP-9 シグナルならびに VEGF シグナルを抑制することによって複数のメカニズム（血管新生ならびに内皮間葉移行）によってがんの進展を抑制できることが示唆された。

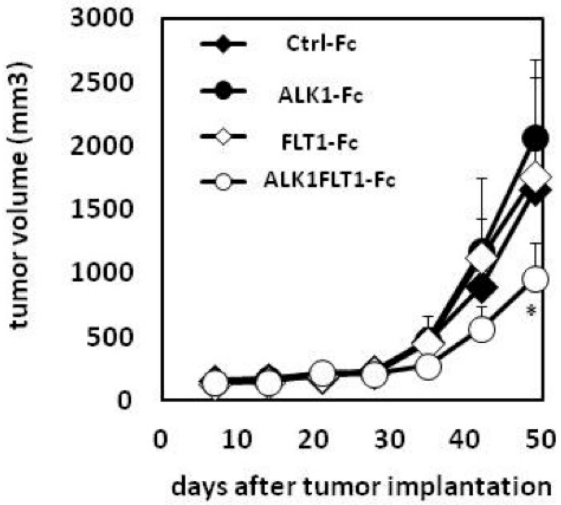


図 3. BxPC3 膵臓がん細胞移植モデルにおける腫瘍形成に対する BMP-9 シグナル抑制の作用
BMP-9 シグナルと VEGF シグナルを抑制する Fc キメラ受容体を発現させた BxPC3 膵臓がん細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して、腫瘍形成能を測定したところ、両シグナルを同時に抑制できる ALK1-FLT1-Fc を発現させることにより、腫瘍形成が低下することが示された。統計解析は Student-t 検定により行い、$p < 0.05$ を有意差あり（*）とした。

考　察

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内皮間葉移行の分子機構を明らかにすることを目的にして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。共同研究の成果として、TGF-βによる内皮間葉移行の誘導においてmiRNAが関与することも明らかになっており［10］、これから内皮間葉移行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Fcキメラ受容体などの新規阻害剤の利用などを通じて内皮間葉移行を標的としたがん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。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたっては、共同研究者である東京大学大学院医学系研究科分子病理学分野の宮園浩平先生に多大なご助力を頂いた。ここに深く感謝致します。

文　献

1) Yoshimatsu Y, Watabe T. Roles of TGF-ß signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis. Int J Inflam. 2011;2011:724080. doi: 10.4061/2011/724080. Epub 2011 Nov 30. PubMed PMID: 22187661; PubMed Central PMCID: PMC3235483

2) Watabe T, Nishihara A, Mishima K, Yamashita J, Shimizu K, Miyazawa K, Nishikawa S, Miyazono K. TGF-ß receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. J Cell Biol. 2003 Dec 22;163(6):1303-11. Epub 2003 Dec 15. PubMed PMID: 14676305; PubMed Central PMCID: PMC2173713.

3) Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, Miyazono K. TGF-ß-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. J Biochem. 2012 Feb;151(2):205-16. doi: 10.1093/jb/mvr136. Epub 2011 Dec 7. PubMed PMID: 22161143.

4) Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGFß-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. J Cell Sci. 2008 Oct 15;121(Pt 20):3317-24. doi: 10.1242/jcs.028282. Epub 2008 Sep 16. PubMed PMID: 18796538.

5) Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, Watabe T. TGF-ß-induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. J Biochem. 2012 Feb;151(2):145-56. doi: 10.1093/jb/mvr121. Epub 2011 Oct 8. PubMed PMID: 21984612.

6) Fukuhara T, Kim J, Hokaiwado S, Nawa M, Okamoto H, Kogiso T, Watabe T, Hattori N. A novel immunotoxin reveals a new role for CD321 in endothelial cells. PLoS One. 2017 Oct 13;12(10):e0181502. doi: 10.1371/journal.pone.0181502. eCollection 2017. PubMed PMID: 29028806; PubMed Central PMCID: PMC5640210.

7) Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. J Cell Sci. 2010 May 15;123(Pt 10):1684-92. doi: 10.1242/jcs.061556. Epub 2010 Apr 20. PubMed PMID: 20406889.

8) 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. 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. 2013 Nov 19;110(47):18940-5. doi: 10.1073/pnas.1310479110. Epub 2013 Oct 16. PubMed PMID: 24133138; PubMed Central PMCID: PMC3839734.

9) Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Tomizawa T, Takahashi K, Katsura A, Miyazono K, Watabe T. Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. Cancer Sci. 2017 Jan;108(1):151-155. doi: 10.1111/cas.13103. PubMed PMID: 28133920; PubMed Central PMCID: PMC5276835.

10) Katsura A, Suzuki HI, Ueno T, Mihira H, Yamazaki T, Yasuda T, Watabe T, Mano H, Yamada Y, Miyazono K. MicroRNA-31 is a positive modulator of endothelial-mesenchymal transition and associated secretory phenotype induced by TGF-β. Genes Cells. 2016 Jan;21(1):99-116. doi: 10.1111/gtc.12323. Epub 2015 Dec 10. PubMed PMID: 26663584.