

# がん脈管新生における TGF- $\beta$ シグナルの生体解析

東京薬科大学 生命科学部 心血管医科学研究室

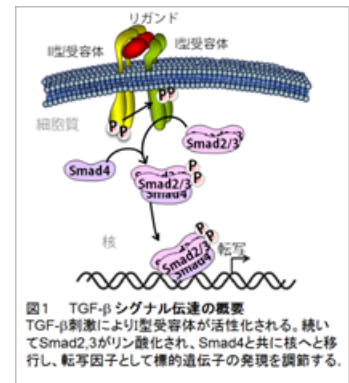
伊東 史子

## 1. 序論

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は細胞増殖をはじめ多様な作用を有するサイトカインである。がんの進展においても重要な役割を担っており、がんの形成初期には細胞増殖を抑制するが、がんの後期では増殖・転移を促進してがんの悪性化に関与する 2 面性を有している<sup>1</sup>。それゆえ、がん治療を目指して TGF- $\beta$ に関する研究が世界中で精力的に展開されているが、その中心は細胞増殖やがん転移の分子メカニズム解明を目指した研究である<sup>2,3</sup>。さらに TGF- $\beta$ は、免疫系を抑制するだけでなく腫瘍血管新生を促進させ、がんの進展に関与している。これらの TGF- $\beta$ による悪性化メカニズムの中で、腫瘍血管新生に関しては生体解析の困難さから十分な解析が行われていない。この理由として、TGF- $\beta$ シグナル系分子のノックアウト (KO) マウスの多くが血管新生不全により胎生致死となることが挙げられる<sup>4</sup>だけでなく、腫瘍血管に特化した研究の困難さが挙げられる。

TGF- $\beta$ は細胞膜上の I 型 II 型セリン/スレオニン受容体を介して細胞内へシグナルを伝達する<sup>3</sup>(図 1)。II 型受容体は恒常活性型受容体であるのに対し、I 型受容体はリガンド存在下、I 型 II 型ヘテロ複合体が形成されて II 型受容体によって活性化される。活性化された I 型受容体は、細胞内シグナル伝達分子・Smad を介した canonical シグナルと Smad によらない non-canonical シグナルを伝達することが可能である。それゆえ II 型受容体遺伝子を欠損させれば、TGF- $\beta$ シグナルの下流を完全に遮断することが可能である。

近年開発されたマウスにより、出生後にタモキシフェン誘導的に目的の遺伝子を臓器依存的に欠損させることが可能となった。中でも Pdgfb-iCreER<sup>5</sup> マウスや Prox1-creER<sup>6</sup> マウスを利用すれば、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞特異的かつ誘導的に遺伝子を欠損させることが可能である。これらのマウスと TGF- $\beta$ シグナル系のコンディショナル KO マウスと交配させることにより、血管またはリンパ管特異的に TGF- $\beta$ シグナルを欠損させることが可能である。そこで本研究では



これらマウスを利用して、腫瘍血管・リンパ管新生における TGF- $\beta$ シグナルの役割を解明し、治療戦略としての TGF- $\beta$ シグナルの有用性について検討した。これまでの遺伝子改変マウスを用いた生体解析から、TGF- $\beta$ シグナルが血管新生に重要なサイトカインであることが示唆されているだけでなく、TGF- $\beta$ シグナルの異常は、家族性毛細血管拡張症、マルファン症候群といった難治性血管疾患を引き起こすことが示されており、TGF- $\beta$ シグナルが血管新生に重要なサイトカインであることは明らかである。胎生期、大動脈から発生するリンパ管は、近年研究が盛んにおこなわれている分野であるが、リンパ管新生における TGF- $\beta$ シグナルの役割の詳細については未解明な点が多い。これまでに明らかとなったリンパ管新生に関与するシグナルは、血管新生にも重要な役割を果たすことが多いため、腫瘍転移を目指した研究を推進するにあたり、血管だけでなくリンパ管にも注目して研究を推進する必要がある。

## 2. 方法

### 2-1. 腫瘍血管新生に対するTGF- $\beta$ シグナル欠損の影響

血管内皮細胞特異的にTGF- $\beta$ シグナルを欠損させるために、TGF- $\beta$  II 型受容体のコンディショナルノックアウトマウスとPdgfb-iCreERマウスを交配させたマウスTBR1<sup>BEC-KO</sup>マウスの背部皮下にがん細胞(LLC: Lewis肺癌細胞)を移植し、タモキシフェンを投与して遺伝子を欠損させ、血管構造への変化を検討した。尾静脈より赤色蛍光標識したレクチンを投与し、血管の恒常性について検討した。さらに、血管内皮細胞特異的にTGF- $\beta$ シグナルを欠損させたマウスにおいて転移への影響を検討するために、マウスのFootpadにB16F10メラノーマ細胞を移植し、肺転移への影響について検討した。

## 2-2. 腫瘍リンパ管新生に対するTGF-βシグナル欠損の影響

リンパ管内皮細胞特異的にTGF-βシグナルを欠損させるために、TGF-β II 型受容体のコンディショナルノックアウトマウスとProx1-creERマウスを交配させたマウスTβRII<sup>LEC-KO</sup>マウスの背部皮下にがん細胞 (LLC: Lewis肺腺癌細胞) を移植し、タモキシフェンを投与して遺伝子を欠損させ、リンパ管構造への変化を検討した。さらに、リンパ管内皮細胞特異的にTGF-βシグナルを欠損させたマウスにおいて転移への影響を検討するために、マウスのFootpadにB16F10メラノーマ細胞を移植し、肺転移への影響について検討した。

## 3. 結果 研究成果

### 3-1. 腫瘍血管新生に対するTGF-βシグナル欠損の影響

遺伝子の欠損が的確に行われたことを確認するために、TβRII<sup>BEC-CKO</sup>マウスの新生仔を用いて検討した。出生後2日目にタモキシフェンを腹腔内投与し、出生後5日後に網膜を摘出した。CKO新生仔の網膜では微小血管から出血が認められ、TGF-βシグナルが成体の血管新生制御にも関与していることが示唆された(図2)。タモキシフェンの誘導率を検討するために、TβRII<sup>BEC-CKO</sup>マウスとRosa-GFPレポーターマウスを交配させ、タモキシフェンにより誘導されるCreリコンビネース活性について確認を行ったところ、検討した網膜のほぼすべての血管においてGFPの発現が確認できたことから、今回実験に用いたマウスはタモキシフェン投与により血管特異的に遺伝子を欠損させることを確認した。

続いてLLC移植腫瘍モデルマウスを作製し、腫瘍血管の恒常性について検討した。腫瘍移植12日目に尾静脈より赤色蛍光標識したレクチンを投与した。投与5分後腫瘍を摘出し、凍結切片を作製したのち、血管内皮細胞のマーカーであるPECAM1を用いて血管を緑色に染色した。その結果、野生型のマウスでは、緑色に染色された血管のほとんどにおいて赤い蛍光が確認できたが、TβRII<sup>BEC-KO</sup>マウスに形成された腫瘍では、血管外に漏れ出した赤色蛍光が確認できた。つまり、血管内皮細胞においてTGF-βシグナルを欠損させると血管の恒常性に異常をきたし、漏れやすい機能的でない血管が形成されることが明らかとなった。

さらにB16メラノーマを用いた腫瘍転移モデルマウスにおいて、肺転移への影響について検討を行った。その結果、血管内皮細胞においてTGF-βシグナルを欠損させると、肺への転移が優位に抑制された。以上の結果より、TGF-βシグナルは腫瘍形成において、血管新生を抑制するシグナルであるが、血管の恒常性を亢進し、がん転移を促進する因子であることを明らかとなった。

### 3-2. 腫瘍リンパ管新生に対するTGF-βシグナル欠損の影響

腫瘍モデルマウスを作製し、腫瘍リンパ管新生におけるTGF-βシグナルの役割について検討を行った。LLC細胞をマウス背部皮下に移植するとともにタモキシフェンを腹腔内投与し、移植後9日後に腫瘍組織を摘出した。野生型と比較して腫瘍の大きさには変化は見られず、また生存率にも影響は見られなかった。TβRII<sup>LEC-CKO</sup>では腫瘍組織周辺に組織液の貯留が確認できた。これら摘出腫瘍より病理切片を作製し、腫瘍組織について検討を行った。リンパ管・血管構造を比較するために、病理切片をリンパ管内皮細胞のマーカーであるLYVE-1と血管内皮細胞のマーカーであるPECAM-1抗体を用いて蛍光免疫染色して比較した。野生型と比較してTβRII<sup>BEC-CKO</sup>では、リンパ管内皮細胞の面積が優位に増加していただけでなく、血管内皮細胞の面積が増加していることが明らかとなった。実際にタモキシフェンに誘導されたCreリコンビネースが作用しているか否かを検討するために、病理切片をTβRII抗体を用いて免疫染色をしたところ、リンパ管内皮細胞特異的にTβRIIの発現が低下していることを確認した。これらの結果より、TGF-βシグナルは腫瘍リンパ管新生を抑制するだけでなく、機能維持にも重要であることが示唆された。

続いて腫瘍転移におけるリンパ管内皮細胞のTGF-βシグナルの影響について検討を行った。B16F10メラノーマ細胞をFoot Padへ移植し、肺転移への影響を検討した。野生型と比較してTβRII<sup>LEC-CKO</sup>では肺への転移が優位に抑制されたことから、リンパ管におけるTGF-βシグナルは腫瘍転移を促進するシグナルであることが示唆された。

## 4. 考察 まとめ

本研究より、血管内皮細胞においてTGF-βシグナルを欠損させると腫瘍転移が抑制されたことから、TGF-βシグナルは機能的な血管を維持し、腫瘍転移を促進する因子であることが明らかとなった。特に、新生仔の網膜血管においてTGF-βシグナルを欠損させると出血が確認できたことから、血管新生が盛んな血管においてTGF-βシグナルは特に重要な役割を担うことが分かった。TGF-βシ



図2 血管内皮細胞におけるTGF-βシグナル欠損の影響

グナルの抑制により血管新生の亢進が確認できたが、残念ながら LLC 細胞を用いた腫瘍モデルマウスでは、生存率に差が見られなかった。これは LLC 細胞の増殖が異常に早いことと、がん悪液質の発現が早い段階から起こるためにマウスの体力消耗が激しいことが挙げられる。また、腫瘍血管内皮細胞において TGF- $\beta$  シグナルを遮断した結果、腫瘍の転移が抑制されたことから、TGF- $\beta$  シグナルはがん細胞だけでなく血管内皮細胞を制御して腫瘍転移を促進していることが示唆された。この結果は、がん細胞ではなく血管内皮細胞を標的にすることにより、腫瘍転移を抑制する技術開発の可能性を示唆するものと期待できる。今後、腫瘍血管内皮細胞の特性を明らかにして標的とすることにより、新規の腫瘍転移抑制薬の開発が可能となる。現在、腫瘍血管内皮細胞を分取して、変動している遺伝子群を同定し、血管の恒常性維持に関与する分子メカニズムを明らかにするために検討を行っている。

腫瘍リンパ管内皮細胞において TGF- $\beta$  シグナルを遮断するとリンパ管新生が促進されるほか、浮腫が誘導されることが明らかになった。それゆえ、リンパ管新生と機能維持における TGF- $\beta$  シグナルの役割の詳細を明らかにすることができれば、リンパ浮腫の治療薬の開発につながるものと期待できる。血管と同様にリンパ管内皮細胞においても TGF- $\beta$  シグナルは腫瘍転移を促進するサイトカインであることが明らかとなった。今後の課題として、リンパ管内皮細胞において TGF- $\beta$  シグナルを欠損させる結果、血管新生を促進するメカニズムを明らかにすれば、リンパ管—血管の相互作用のメカニズムにさらに迫ることができるものと期待できる。特に、血管とリンパ管は類似のサイトカインによって新生と機能が維持されていることから、同様のメカニズムによって内皮細胞側の腫瘍転移ファクターが制御されている可能性がある。現在、TGF- $\beta$  シグナルを欠損した際に変動した遺伝子群の役割の詳細について解析を行っており、新たな腫瘍転移制御機構を明らかにしていきたいと考えている。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、アステラス病態代謝研究会より助成いただきましたことを、心より感謝申し上げます。

## 6. 発表論文、

1. Nakano, N., Maeyama, K., Ikeno, S., Itoh, F., Togawa, Y., Katsu, Y., Thanh Thao, V.N., Watanabe, Y., Kato, M., and Itoh, S. C18ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- $\beta$  Signaling. *J. Biol. Chem.*, *in press* (2014)

## 参考文献

1. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.*, 3: 807-821, 2003.
2. Itoh S & Itoh F. Implication of TGF- $\beta$  as a survival for during tumor development. *J. Biochem.*, 151: 559-562, 2012.
3. Massagué J. TGF- $\beta$  in Cancer. *Cell*, 134: 215-230, 2008.
4. Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGF $\beta$  receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.*, 44: 253-265, 2000.
5. Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis*, 46: 74-80, 2008.
6. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, Samokhvalov IM, Oliver G. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev.*, 21: 2422-2432, 2007.
7. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ & ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smad proteins, *Eur. J. Biochem.*, 267: 6954-6967, 2000.