

論文題目 **Enhancement of lymphangiogenesis by inhibition of
endogenous TGF- β signaling**

TGF- β シグナルの抑制によるリンパ管新生の促進

指導教員名 宮園 浩平
専攻名 病因病理学 専攻
入進学年 平成 16 年 4 月 1 日
学生氏名 岡 雅子

はじめに

リンパ管新生は血管新生とともにがん転移に密接な関係があると考えられている。また、リンパ管に異常が生じるとリンパ浮腫などの疾患が起こる。したがって、リンパ管新生を制御することによる疾患治療が考えられるが、そのためにはリンパ管新生のメカニズムを明らかにすることが重要であると考えられる。近年 LYVE-1、Prox1、Podoplanin、VEGF-R3 などリンパ管に特異的なマーカーが明らかになってきたことにより、今まで難しかったリンパ管新生に関する研究が進んできている。リンパ管新生を促進する因子としていくつかの増殖因子が報告されており、特に VEGF-C、VEGF-D から VEGF-R3 を介して入るシグナルはリンパ管新生の重要な経路と考えられている。

一方、TGF- β シグナルは血管新生には深く関係があることがすでに報告されてきている。TGF- β 1 遺伝子ホモ欠損マウスの約半数と TGF- β II 型受容体のノックアウトマウスにおいて、胎生 10.5 日目に卵黄嚢における血管形成と造血の異常

より胎生致死になることが報告されている。また、腫瘍モデルにおいては TGF- β シグナルを抑制することにより血管内皮細胞に対する血管壁細胞の被覆が少ないことから、腫瘍血管の漏出性が増すことが報告されている。リンパ管新生は血管新生と並んで癌の中で観察される現象である。このため血管新生に影響を及ぼす TGF- β シグナルの阻害効果がリンパ管新生にも影響を及ぼすかどうかに関心を持ち、これまで解明されていないリンパ管新生への TGF- β シグナルの関与について検討を行うことにした。

In vitro における TGF- β のリンパ管内皮細胞に対する作用

まずヒト由来リンパ管内皮細胞 (HDLEC) を用いて *in vitro* での実験を行った。HDLEC において内因性の TGF- β により Smad2 のリン酸化が起きているが、TGF- β 刺激により Smad2 のリン酸化が亢進し、TGF- β 阻害剤 (LY364947, SB431542) によって抑制された。また TGF- β シグナルの標的遺伝子である Smad7、PAI-1 の mRNA の発現は、TGF- β 刺激により上昇し、TGF- β 阻害剤により減少した。これらのことから HDLEC は TGF- β シグナルに応答することが確認された。次に HDLEC の増殖は TGF- β 刺激で抑制され、TGF- β 阻害剤存在下では促進された。次にリンパ管新生に関わる重要な転写因子である Prox1 の発現について調べたところ、Prox1 の発現は TGF- β 刺激で減少し、TGF- β シグナル抑制により増加することが、細胞蛍光免疫染色とウェスタンブロッティングで確認された。Prox1 と他のリンパ管マーカーである LYVE-1 の mRNA の発現についても発現を調べたところ、TGF- β 刺激により減少し、TGF- β シグナル抑制により増加することが確認された。Prox1 の発現を制御する因子の報告は限られており、多くのことはまだ明らかになっていないことから、TGF- β シグナルが Prox1 の発現を調節するという知見は重要であると考えられる。なお、シクロヘキシミドを用いて新規の

タンパク質合成を阻害することで、これらの遺伝子の発現調節が Smad による転写調節を介した直接作用かどうかを検証したところ、TGF- β シグナルの標的遺伝子 PAI-1 の発現は誘導されたが、Prox1、LYVE-1 の発現は上昇しないことから、Prox1、LYVE-1 の誘導は TGF- β による直接作用ではなく、他のタンパク質を介した間接作用であることが示唆された。

次に、VEGF-C に対する HDLEC の走化性は TGF- β 刺激で抑制され、TGF- β シグナル抑制により促進されることが確認された。また、マトリゲル 2 次元培養、タイプ I コラーゲン 3 次元培養において HDLEC による管腔様構造の形成が TGF- β で抑制され、TGF- β シグナルの抑制により促進されることが観察された。さらに、ES 細胞が形成する Embryoid body において VEGF-C と VEGF-A によりリンパ管内皮細胞への分化を誘導する実験系においても TGF- β 阻害剤がリンパ管発生をさらに促進したことから、発生におけるリンパ管内皮の分化の過程においても TGF- β シグナル抑制がリンパ管新生を促進することが示唆された。

TGF- β 阻害剤による In vivo でのリンパ管新生

さらに、In vivo の炎症モデル、ならびに癌モデルを用いて TGF- β 阻害剤のリンパ管新生に対する影響を調べた。まず、マウス無菌性腹膜炎モデルにおいて TGF- β シグナル抑制により横隔膜上のリンパ管新生が促進されることが観察された。なお炎症性リンパ管新生ではマクロファージにより産生される VEGF-C が関与することが報告されている。このため、BALB/c マウスから採取した炎症性マクロファージを用いて TGF- β 阻害剤の作用を検討したところ、TGF- β シグナル抑制により VEGF-C の産生は促進されず、むしろ抑制された。このことから、この炎症モデルでの TGF- β シグナル抑制によるリンパ管新生促進は、マクロフ

アージ由来の VEGF-C を介した間接的効果ではなく、リンパ管内皮細胞に対する直接的効果であるということが示唆された。

次にヒト由来膵臓腺癌細胞である BxPC3 細胞と MIA PaCA2 細胞の皮下移植モデルを用いて、腫瘍リンパ管新生に対する TGF- β シグナル抑制の効果を調べた。VEGF-C リガンドの存在下で、TGF- β シグナル抑制により LYVE-1 陽性細胞が増加することが観察された。これらの LYVE-1 陽性細胞は、共焦点顕微鏡を用いた 3 次元的解析により管構造を形成していることが示された。また LYVE-1 陽性細胞は他のリンパ管マーカーである Prox1 や Podoplanin と共染色され、ならびに血管マーカーである PECAM1 とほとんど共染されなかったことから、リンパ管であることが確認された。

結語

以上の結果より、TGF- β シグナルは Prox1 発現を負に制御することでリンパ管新生を負に制御しており、TGF- β シグナル抑制はリンパ管新生を促進することが示された。