

論文の内容の趣旨

論文題目 TGF- β による内皮間葉移行における Rho シグナルと MRTF 転写因子の役割

三平 元

要旨

【背景】

内皮間葉移行 (endothelial-to-mesenchymal transition: EndMT) とは、細胞同士が密に接着している「血管内皮細胞」の状態から、細胞同士の接着に乏しく運動性の高い「間葉系細胞」の状態に変化することである。EndMT が心臓の中隔・弁の発生や臓器線維症などにおいて重要な役割を果たしていることが、Tie2-Cre: R26R-loxP-STOP-loxP-LacZ などのダブルトランスジェニックマウスを用いた細胞系譜解析法により証明された。また、いくつかの培養内皮細胞においても、TGF- β などの誘導因子により EndMT が誘導されていることが示されてきた。一方、上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) は原腸陥入や神経堤細胞の脱上皮化などの発生段階、創傷治癒過程、臓器線維症、がん細胞の浸潤などにおいて認められ、培養上皮細胞を用いた *in vitro* 実験系にて分子機構の解明が進んでいる。しかし EndMT の分子機構の詳細については不明な点が多く残されている。

【目的と方法】

本研究は、EndMT の分子機構を解明するために、マウス臍臓由来内皮細胞 (MS-1 細胞) に TGF- β 2 を投与して EndMT を誘導し、間葉系細胞に特異的に発現する分子 (間葉系細胞マーカー) の発現誘導機序を検討することを目的とした。これまで報告されている EMT の誘導を制御する分子機構である、Snail ファミリーおよび δ EF-1 ファミリー転写因子群、Rho シグナル活性化、MRTF-A 転写因子群について、MS-1 細胞における TGF- β 2 による EndMT の誘導との関連を検討した。

【結果】

(1) MS-1 細胞は TGF- β 2 により EndMT が誘導される

MS-1 細胞に TGF- β 2 を投与して、24 時間後にはアクチンストレスファイバーの形成が認められ、72 時間後には細胞間接着が消失し、内皮細胞マーカーである細胞膜上の VE-カドヘリンタンパク質が検出されなくなり、間葉系細胞マーカーである α -SMA、SM22 α 、フィブロネクチン 1、MMP2 の発現が上昇した。以上の結果より、MS-1 細胞は TGF- β 2 により EndMT が

誘導されることが示唆された。

(2) TGF- β 2 による MS-1 細胞における α -SMA の誘導に Snail 転写因子は必要でない

EMT においては、Snail ファミリー (Snail、Slug)、 δ EF-1 ファミリー (δ EF-1、SIP-1) の関与が多く報告されているが、MS-1 細胞に TGF- β 2 を投与して EndMT を誘導しても、Slug、 δ EF-1、SIP-1 の発現誘導は認められなかった。一方、TGF- β 2 刺激により Snail の発現上昇は認められたが、Snail の発現をノックダウンしても TGF- β 2 刺激による α -SMA の発現上昇は影響をうけなかった。以上の結果より、TGF- β 2 による MS-1 細胞における α -SMA の誘導に、Snail 転写因子は必要ではないことが示唆された。

(3) TGF- β 2 による MS-1 細胞における α -SMA の誘導には、Rho シグナルの活性化が必要である

Rho ファミリータンパク質は細胞運動、細胞周期、細胞質分裂、アポトーシス、転写など広範に細胞機能の制御に関わっており、EMT においても Rho シグナルの活性化の関与がいくつか報告されている。そこで、TGF- β 2 による MS-1 細胞における α -SMA の発現における Rho シグナルの関与を検討した。TGF- β 2 は MS-1 細胞において RhoA を活性化した。TGF- β 2 によるアクチンストレスファイバー形成ならびに α -SMA の発現誘導は、Y27632 や C3 菌体外酵素といった Rho シグナル阻害剤により抑制された。以上の結果より、TGF- β 2 による MS-1 細胞における α -SMA の誘導には、Rho シグナルの活性化が必要であることが示唆された。

(4) TGF- β 2 による MS-1 細胞における間葉系細胞マーカーの発現上昇には Smad 経路が関与する

乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞における TGF- β による EMT における Rho シグナルの活性化は non-Smad 経路に依存している。そこで MS-1 細胞における TGF- β 2 による間葉系細胞マーカーの発現上昇に Smad 経路が関与するか検討した。TGF- β 2 による α -SMA、SM22 α 、ファイブロネクチン 1、MMP2 の発現上昇は、Smad4 発現のノックダウンにより抑制された。以上のことより TGF- β 2 による MS-1 細胞における間葉系細胞マーカーの発現上昇には Smad 経路が関与することが示唆された。

(5) Smad 経路依存的に発現上昇する Arhgef5 は TGF- β 2 による α -SMA 発現上昇を制御する

RhoA を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF) は約 60 種類以上知られており、TGF- β による EMT において Net1、GEF-H1 などの GEF の関与が報告されている。TGF- β 2 処理した MS-1 細胞で発現が上昇する GEF を同定するために、cDNA マイクロアレイ解析による mRNA の発現プロファイリングを行った。Arhgef5 が TGF- β 2 により発現が上昇しており、TGF- β 2 による α -SMA の発現上昇は Arhgef5 発現のノックダウンにより抑制された。また、TGF- β 2 による Arhgef5 の発現上昇は Smad4 発現のノック

ダウンにより抑制された。以上の結果より、Smad4 依存的に TGF- β 2 により発現が上昇する Arhgef5 は、TGF- β 2 による α -SMA の発現上昇に寄与していることが見出され、Arhgef5 が Smad 経路の下流で Rho 活性化を制御する分子の候補であることが示唆された。

(6) TGF- β 2 は MRTF-A の発現上昇と核内移行を制御する

MRTF-A は myocardin ファミリーに属し、細胞の筋分化関連遺伝子の転写を促進する血清応答因子のコファクターとして働く。G-アクチンに結合して細胞質に局在する MRTF-A は Rho シグナルが活性化されストレスファイババーが形成される際に、G-アクチンから遊離し核内へ移行することが知られている。そこで TGF- β 2 による MS-1 細胞の EndMT における MRTF-A の局在を検討した。TGF- β 2 により核内 MRTF-A タンパク質量は増加したが、Y27632 による Rho シグナル経路の抑制によって阻害された。TGF- β 2 により細胞全体の MRTF-A の発現上昇が認められたが、この発現変化は Rho シグナル阻害の影響を受けなかった。一方、TGF- β 2 による細胞全体の MRTF-A の発現上昇は Smad4 発現のノックダウンにより抑制された。以上の結果より MS-1 細胞においては、TGF- β 2 は MRTF-A の核内移行および発現上昇を促進し、MRTF-A を活性化していることが見いだされた。さらに、その核内移行には Rho シグナル活性化が重要であるが、一方で、その発現上昇には Rho シグナル活性化を促す Smad 経路が、Rho シグナルとは独立して、重要であることが示唆された。

(7) MRTF-A は MS-1 細胞における TGF- β 2 による α -SMA の発現上昇に必要な十分である

MS-1 細胞において TGF- β 2 による α -SMA の発現上昇に MRTF-A が必要か検討するため、MRTF-A 発現のノックダウンを行ったところ、TGF- β 2 による α -SMA の発現上昇は顕著に抑制された。次に、MRTF-A が α -SMA の発現上昇に対して十分条件であるか検討した。恒常活性型 MRTF-A をレンチウイルスを用いて MS-1 細胞に発現させると α -SMA の発現上昇が認められた。以上の結果より、TGF- β 2 による α -SMA の発現上昇には MRTF-A が必要であり、MRTF-A は TGF- β 2 と同様に α -SMA の発現上昇をもたらすことが示唆された。

【考察】

本研究は、MS-1 の EndMT における間葉系細胞マーカー発現調節メカニズムを探索し、Rho シグナルの活性化、MRTF-A の発現量調節がいずれも Smad 経路により調節されているという新たな知見を見出した。

EndMT は心臓の中隔、弁の発達プロセスにおいて起きており、適切な EndMT の誘導不全が先天性心疾患の原因の一つとなっている可能性がある。EndMT 機構の詳細な解明により、EndMT 異常を引き起こす環境要因などが判明すれば、先天性心疾患の発症予防および治療応用につながる可能性がある。

また、EndMTは臓器線維症に寄与している可能性があり、EndMT機構の詳細な解明による有効なEndMT阻害方法の確立は臓器線維症の治療応用につながる可能性がある。

更に、近年、EndMTの研究で得られた知見が、弁膜症の治療に応用されつつある。弁膜症の治療として現在人工弁置換手術に用いられている機械弁および生体弁は、血栓症、石灰化、耐久性などの問題を抱え、また小児期に置換した小さい人工弁は成長に伴って相対的狭窄を呈することから、これらの問題点を解決できる新しい人工弁の開発が急務である。近年、自己組織を用いたtissue-engineered heart valve (TEHV)の開発が進んでおり、生体の成長・加齢に伴う弁の大きさや組織の構造変化を模倣できるようEndMTやECM産生を自動調節できる弁の開発が進んでいる。

ゆえに、本研究におけるEndMT機構の解明は、EndMTの関与が示唆される病態の解明、疾病予防および治療法の開発に、大いに貢献する可能性がある。