

## 内皮細胞の機能低下がもたらす生体恒常性の破綻とその分子機序

吉松 康裕

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 薬理学分野

**Disruption of homeostasis by endothelial cell dysfunction and its molecular mechanisms**

Yasuhiro YOSHIMATSU

*Division of Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata, Japan*

キーワード：EndoMT, EMT, TGF- $\beta$ , Activin A, TNF- $\alpha$

### はじめに

脈管は主に血管やリンパ管によって構成され、それぞれ血液およびリンパ液を循環させる機能を持つため、体液の恒常性維持に重要な役割を果たす。よって、これら脈管の機能低下はすなわち、体液の恒常性維持機構の破綻を意味する。脈管の内腔側にある内皮細胞がその性質を失い間葉系細胞の性質を獲得する過程である、内皮間葉移行 (EndoMT: Endothelial-Mesenchymal Transition) は脈管における内皮細胞の機能低下を示す現象の一つとして、近年重要視され始めている。EndoMTは臓器の線維化、動脈硬化、肺高血圧症、糖尿病性腎症など、さまざまな病態に加え、老化組織においても血管やリンパ管の機能不全を伴って起きていることが示されている。EndoMTの代表的な誘導因子として transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が知られているが、EndoMTにおける

その詳細な分子作用機序については未解明な部分が多く残されている。我々は今回この分子機序の一部を明らかにしたので、以下に報告する。

### 内皮間葉移行について

EndoMTは、内皮間葉転換とも呼ばれ、この過程では、内皮細胞がサイトカインなどの刺激によって、vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) などの内皮細胞特異的なマーカータンパク質発現の低下、さらに smooth muscle  $\alpha$ -actin, fibroblast specific protein 1 (FSP1/S100A4) などの間葉系細胞特異的なマーカータンパク質の発現上昇が起きる。

また、これらのマーカータンパク質の発現の変化に伴って、内皮細胞同士の強固な細胞間接着が弛緩して間葉系細胞の特徴である細胞の遊走性の

Reprint requests to: Yasuhiro YOSHIMATSU  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences,  
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科 薬理学分野  
吉松 康裕

亢進が起こる。

## 今回の研究結果

### 1. 老化組織における TGF- $\beta$ 2 の発現上昇

リンパ管の部分的な切除によりリンパ浮腫を誘導したモデルマウスではリンパ液の漏出による透過性の亢進が観察される<sup>1)</sup>。このマウスのリンパ管内皮細胞においては間葉系細胞マーカーの発現が観察されており、EndoMT が起きていることが示唆されている<sup>2)3)</sup>。また、リンパ管発生のマスター転写因子 Prox1 を発現する点から、近年、リンパ管内皮細胞と似た性質を示す脈管としてシュレム管が報告された。老化の過程で機能低下したシュレム管では緑内障のリスクが増大することが示されている<sup>4)</sup>。老化したシュレム管では Prox1 の発現低下が起こるため、内皮細胞としての性質維持ができなくなると見られ間葉系細胞マーカーの発現が上昇する。このように、シュレム管においても EndoMT 様の現象が起きていることが示唆される<sup>4)</sup>。以上のことから、老化はリンパ管の機能低下の要因になっており、リンパ管内皮細胞において EndoMT を惹起される可能性が考えられる。

そこで、我々はまず EndoMT の強力な誘導因子である TGF- $\beta$  の発現が老化に伴って変動するか検討した。生後1年以上の高齢マウスと生後2ヶ月以内の若齢マウス由来の皮膚の組織から RNA を調製し定量解析を行ったところ、TGF- $\beta$ 1~ $\beta$ 3 のアイソフォームのうち、高齢マウスの TGF- $\beta$ 2 の発現が若齢マウスと比べ有意に上昇していた。

このことからマウスの皮膚において、老化に伴って TGF- $\beta$ 2 の発現が上昇することが示された<sup>5)</sup>。

他の老化組織でも、TGF- $\beta$ 1 の発現上昇が報告されており、組織における老化と TGF- $\beta$  シグナルの増加には相関があると考えられる。

### 2. ヒトリンパ管内皮細胞における TGF- $\beta$ による内皮間葉移行の誘導

これまでにさまざまな哺乳動物のさまざまな組

織・臓器由来の血管内皮細胞で EndoMT が起こることが報告されている。マウスのリンパ管内皮細胞では血管内皮細胞と同様に EndoMT を引き起こすことが報告されている<sup>3)</sup>。ヒトのリンパ管内皮細胞においても、同様に EndoMT が起こるかについてヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 HDLEC を用いて検討を行った<sup>5)</sup>。TGF- $\beta$ 2 を添加した HDLEC を 72 h 培養すると control と比べ細胞は大きな形態を示す傾向が観察された。TGF- $\beta$  受容体 ALK5 のキナーゼ阻害剤である SB431542 (SB) を HDLEC に添加したところ、定量的 RT-PCR 解析では、リンパ管内皮細胞マーカー LYVE-1 の発現が上昇し、間葉系細胞マーカー SM22 $\alpha$  の発現が低下した。一方 TGF- $\beta$ 2 を添加した HDLEC においては LYVE-1 の発現は低下し、SM22 $\alpha$  の発現は顕著に上昇した。また細胞免疫染色による解析結果からも、無添加の HDLEC においては SM22 $\alpha$  陽性の細胞がほとんど存在しないが、TGF- $\beta$ 2 を添加すると、10%程度まで増加した。さらにこのときに、間葉系細胞の特徴である細胞の運動能の亢進について検討するため chamber migration assay を行ったところ、SB を添加した HDLEC においては遊走した細胞数が減少し、TGF- $\beta$ 2 を添加した細胞では遊走した細胞数が増加した。

これらの結果から TGF- $\beta$ 2 は、HDLEC においてリンパ管内皮細胞の性質を失わせるとともに間葉系細胞の性質を獲得させて EndoMT を誘導することが示された。

次にこのときの TGF- $\beta$ 2 を添加した HDLEC において Prox1 の発現を定量的 RT-PCR により検討したところ、TGF- $\beta$ 2 を添加した HDLEC において Prox1 の発現が減少した。さらに SB の添加により内因性の TGF- $\beta$  を抑制すると、Prox1 の発現は顕著に上昇した。このことから Prox1 の発現は TGF- $\beta$ 2 により抑制されていることが示唆された<sup>5)</sup>。

### 3. リンパ管内皮細胞における EndoMT を介した Activin シグナルの亢進

血管内皮細胞においては、TGF- $\beta$  がその下流

シグナル伝達因子である Smad 経路を介して EndoMT を引き起こしていることが知られている<sup>6)</sup>。そこで、HDLEC における Smad 経路の活性化に対する TGF- $\beta$  の効果を検討するため、Smad2 のリン酸化をウエスタンブロッティングにより検討を行った。刺激後 72 h 培養したところ、control に比べて、Smad2 のリン酸化が TGF- $\beta$  2 によって強く亢進していた。通常、TGF- $\beta$  シグナルは短時間でシグナルが惹起され、その後数時間以内に減弱することが知られており、今回の場合、72h 後においても HDLEC において TGF- $\beta$  2 は Smad シグナルを活性化していることが示されたため、培養上清中に「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」が増えていると考えられた。次に、この増加した「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」を同定するため、TGF- $\beta$  ファミリーの発現解析を行った。まず TGF- $\beta$  ファミリーのプロトタイプである TGF- $\beta$  1～3 の発現を解析したところ、これらの発現は TGF- $\beta$  2 添加によっては上昇していなかった。そこで同じ TGF- $\beta$  ファミリーに属する Nodal や Activin のサブユニットについてゲノムワイドな mRNA 発現解析を行ったところ、Activin A のサブユニットである Inhibin  $\beta$  A のみが HDLEC において発現していた (Activin ファミリーには他の種類があるが、Inhibin  $\beta$  A のみでは Activin A しか形成されない)。さらに Inhibin  $\beta$  A は TGF- $\beta$  2 で刺激することにより発現量が増加することが明らかになった。Activin A の阻害因子である

Follistatin の発現は、TGF- $\beta$  2 の添加により発現が低下していた。

これらの結果から、TGF- $\beta$  2 の添加によって HDLEC は Inhibin  $\beta$  A の発現を上昇させることで培養上清に Activin A を放出し、さらに Follistatin の発現を低下させることで Activin A のオートクラインによるシグナルを亢進することが示唆された<sup>5)</sup>。この分子メカニズムにより、リンパ管内皮細胞は不可逆的に EndoMT を亢進していくと考えられる (図 1)。

#### 4. リンパ管内皮細胞における EndoMT の TNF- $\alpha$ による亢進

TGF- $\beta$  は EndoMT の誘導因子として同定される以前から上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) の誘導因子として広く知られている。TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインによって EMT が亢進することが複数のグループによって示されている<sup>7)</sup>。そこで、我々は TNF- $\alpha$  によって TGF- $\beta$  のリンパ管内皮細胞に対する作用が増強されるかについて、検討を行った。TNF- $\alpha$  単独の添加では、Prox1 の発現低下が観察され、リンパ管の性質を喪失させる作用があることが明らかになった。TGF- $\beta$  との共添加によっては Prox1 の mRNA レベルでは増強作用は観察されなかった。一方、間葉系細胞マーカー SM22 $\alpha$  の発現は TNF- $\alpha$  単独では上昇しないものの、TGF- $\beta$  との共添加によって顕著に発現が上昇し、TGF- $\beta$  の作用を亢進していた。

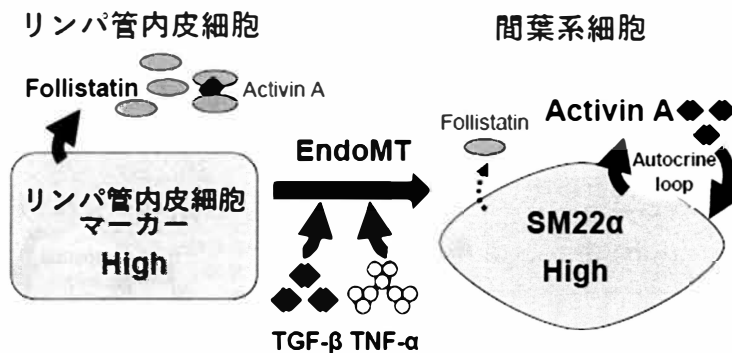


図 1

また、細胞免疫染色の結果からも、共添加によって SM22 $\alpha$  陽性細胞の増加が確認された。

以上のことから、TNF- $\alpha$  には、単独でリンパ管内皮細胞の性質を喪失させる作用があるとともに、TGF- $\beta$  による間葉系細胞への分化転換を増強する作用があることが示された<sup>5)</sup>。

### 5. 血管内皮細胞の EndoMT において TNF- $\alpha$ によって増強される TGF- $\beta$ の作用

次に、血管内皮細胞においても TNF- $\alpha$  が同様の作用があるかについて、ヒト臍帯動脈内皮細胞・静脈内皮細胞を用い、リガンドの添加後 72h の培養後に解析を行った<sup>8)</sup>。内皮細胞マーカーについては、血管内皮型クローデインである Claudin-5 の発現が TGF- $\beta$  および TNF- $\alpha$  でそれぞれ低下していたが、増強作用については特に大きな変化が見られなかった。しかし、内皮細胞の性質を示す管腔形成能を tube formation assay によって検討すると、TGF- $\beta$  および TNF- $\alpha$  でそれぞれ低下しており、共添加によって管腔形成がほぼ消失した。

一方、SM22 $\alpha$  については、TNF- $\alpha$  では発現の誘導は起きないが、TGF- $\beta$  によって発現が誘導され、この作用を TNF- $\alpha$  が顕著に増強した。また、SM22 $\alpha$  陽性細胞数についても免疫染色により検討を行ったところ、TNF- $\alpha$  単独ではほとんど効果がないが、TGF- $\beta$  の添加によって出現する SM22 $\alpha$  陽性細胞は TNF- $\alpha$  によって顕著に増加した。

以上のことから、TNF- $\alpha$  には TGF- $\beta$  による EndoMT の誘導能を増強する作用があること

が示された<sup>8)</sup>。

### 6. 血管内皮細胞の EndoMT における、TGF- $\beta$ I 型受容体および TGF- $\beta$ 2, Inhibin $\beta$ A の発現上昇

次に、以上のような現象の詳細な分子メカニズムの解明にあたり、リンパ管内皮細胞で見られた Smad2 のリン酸化について解析を行った。同様に血管内皮細胞でも EndoMT 誘導後にリン酸化が維持されていた。培養上清中の「Smad2 のリン酸化を誘導する液性因子」について遺伝子発現を検討したところ、TGF- $\beta$ 2 および Inhibin  $\beta$  A が TGF- $\beta$  および TNF- $\alpha$  の作用で発現が上昇し、共添加によってさらに発現が亢進した。また、TGF- $\beta$  の I 型受容体 ALK5 の発現も共添加によって発現が亢進していた<sup>8)</sup>。

以上のことから、これらの分子が Smad2 のリン酸化の維持（長時間の維持）に寄与していることが示唆された。

### 7. EndoMT を介して産生される TGF- $\beta$ 2 の作用によるがん細胞の EMT 誘導

TGF- $\beta$  および TNF- $\alpha$  の共添加によって発現が上昇していた TGF- $\beta$ 2 および Inhibin  $\beta$  A (最終産物は、Inhibin  $\beta$  A のホモダイマーである Activin A) については、培養上清中に産生されることが予想され、これらの作用によりオートクラインに働いて EndoMT がさらに亢進していると考えられる。

上皮細胞由来のがん細胞は TGF- $\beta$  や類似の

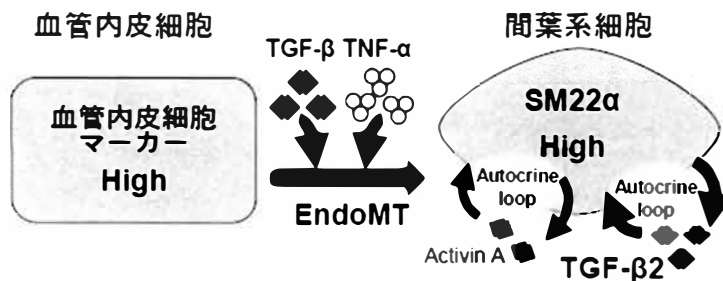


図2

サイトカインによって、がん悪性化の指標となる EMT を起こすことが知られている。そこで、次に、これら TGF- $\beta$ 2 および Activin A のどちらがより強く産生されて作用しているかについて検討した。EndoMT を起こした血管内皮細胞の培養上清に対し、TGF- $\beta$ 2 の作用を抑制する中和抗体および Activin A の阻害因子である Follistatin を混ぜ、口腔がん細胞 HSC-4 に添加し、72h 培養した。EndoMT を起こした血管内皮細胞の培養上清により HSC-4 は間葉系細胞マーカーの発現が上昇し、これらのマーカーの一つである Vimentin の陽性細胞が顕著に増加し、EMT が起きていることが示された。この EMT は Follistatin の添加によっては抑制されず、TGF- $\beta$  に対する中和抗体によって抑制された<sup>8)</sup>。

以上のことから、EndoMT を起こした血管内皮細胞が産生する液性因子について、がん細胞の EMT の誘導能という評価からは Activin A よりも TGF- $\beta$ 2 が重要であることが示唆された。また、血管内皮細胞の EndoMT は内因性の TGF- $\beta$ 2 のオートクラインによるシグナルが亢進することで、自身の EndoMT がさらに亢進していくとともに、周囲の細胞へも影響を与えるであろうと考えられる (図 2)。

## ま と め

今回、リンパ管および血管の内皮細胞における EndoMT の解析を行い、これらの EndoMT の進展メカニズムを明らかにした。EndoMT の過程でリンパ管内皮細胞においては Activin A のシグナルが、血管内皮細胞においては TGF- $\beta$ 2 のシグナルが重要であることが示された。ともに、TGF- $\beta$ ファミリーに属しており、細胞内シグナル伝達因子 Smad2 を介したシグナルを伝達することから標的遺伝子(群)の多くを共有していると考えられる。

がんの微小環境における間葉系細胞の一部は線維芽細胞として機能し、特にがん関連線維芽細胞 (Cancer Associated Fibroblast: CAF) と呼ばれ、がんの悪性化に寄与している。血管内皮細胞の

EndoMT を経て生成した CAF もそれに寄与していることが示されている。今回、EndoMT を経て間葉系細胞の性質を獲得した血管内皮細胞は、がん細胞の EMT を誘導したことから、生体内においても CAF として機能し、がんの悪性化に寄与すると考えられる。また、リンパ管内皮細胞も TGF- $\beta$  に類似した作用を持つ Activin A を産生することから CAF として機能する可能性がある。血管もリンパ管も、がんの進展においては「管」として機能しがん細胞の転移経路として知られるが、その前段階の悪性化において、血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞が共に CAF として機能している可能性が考えられる。

## 謝 辞

本研究は主に、東京大学 大学院医学系研究科分子病理学分野、東京薬科大学 腫瘍医科学研究室、東京医科歯科大学 分子細胞機能学分野 / 硬組織病態生化学分野で行われた。特に、今回の解析について中心的な役割を果たした紀室志織氏および若林育海氏、さらに重要な助言をいただいた東京医科歯科大学の渡部徹郎先生、東京大学の宮園浩平先生に深謝致します。また、以上の研究における共同研究者の皆様のご尽力に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Tian W, Tian W, Rockson SG, Jiang X, Kim J, Begaye A, Shuffle EM, Tu AB, Cribb M, Nepiyushchikh Z, Feroze AH, Zamanian RT, Dhillon GS, Voelkel NF, Peters-Golden M, Kitajewski J, Dixon JB, Nicolls MR: Leukotriene B4 antagonism ameliorates experimental lymphedema, *Sci Transl Med*, 9 (389): eaal3920, 2017.
- 2) Clavin NW, Avraham T, Fernandez J, Daluovoy SV, Soares MA, Chaudhry A, Mehrara BJ: TGF- $\beta$ 2 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295 (5): H2113-2127, 2008.
- 3) Ichise T, Yoshida N, Ichise H: FGF2-induced Ras-MAPK signalling maintains lymphatic endothelial cell identity by upregulating endothelial-cell-specific gene expression and

- suppressing TGF  $\beta$  signalling through Smad2. *J Cell Sci*, 127: 845-857, 2014.
- 4) Park DY, Lee J, Park I, Choi D, Lee S, Song S, Hwang Y, Hong KY, Nakaoka Y, Makinen T, Kim P, Alitalo K, Hong YK, Koh GY: Lymphatic regulator PROX1 determines Schlemm's canal integrity and identity. *J Clin Invest*, 124(9): 3960-74, 2014.
- 5) Yoshimatsu Y, Kimuro S, Pauty J, Takagaki K, Nomiya S, Inagawa A, Maeda K, Podyma-Inoue KA, Kajiya K, Matsunaga YT, Watabe T: TGF-beta and TNF-alpha cooperatively induce mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells via activation of Activin signals. *PLoS One*, 15(5): e0232356, 2020.
- 6) Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, Watabe T: TGF- $\beta$  -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *J Biochem*, 151(2): 145-56, 2012.
- 7) Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, Miyazono K: TGF- $\beta$  -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J Biochem*. 151(2): 205-16, 2012.
- 8) Yoshimatsu Y, Wakabayashi I, Kimuro S, Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi M, Maishi N, Podyma-Inoue KA, Hida K, Miyazono K, Watabe T: TNF- $\alpha$  enhances TGF- $\beta$  -induced endothelial-to- mesenchymal transition via TGF- $\beta$  signal augmentation. *Cancer Sci*, 111(7): 2385-2399, 2020.
-