

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ管内皮細胞及び腎臓がん細胞における TGF- β ファミリーの機能解析

田口 瑠奈

Transforming growth factor (TGF)- β ファミリーのメンバーには、TGF- β 、Bone morphogenetic protein (BMP) などの 30 種類以上の構造の類似したサイトカインが含まれ、これらがそれぞれ Serine/threonine kinase receptor への結合により、細胞内にシグナルを伝達する。TGF- β ファミリーのサイトカインは、細胞増殖やアポトーシスの制御などの多彩な作用を示すため、悪性腫瘍や線維症をはじめとする多くの疾患の発症にかかわっている。様々な疾患における TGF- β ファミリーシグナルの機能の解明は、病態の分子メカニズムの理解を助け、治療の開発につながる新たな知見を与えると期待されている。

リンパ管形成における TGF- β ファミリーシグナルの機能解析

<背景>

リンパ管は一層のリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell : LEC) から構成されており、血管と共に全身にネットワークを形成している。リンパ管は末梢組織において組織液を汲み出すことで体液の恒常性を維持し、その破綻はリンパ浮腫を引き起こす。さらにがんの進行に伴って形成されるリンパ管はリンパ行性転移の経路となることから、リンパ管の形成機構を解明することは重要な意義を持つが、未解明な部分が多く残されている。リンパ管は成体においては既存のリンパ管の伸展により新たに形成されるが、胎生期においては血管内皮細胞において Prox1 転写因子が発現することによりリンパ管内皮細胞が分化することで形成され、様々なヒト遺伝性疾患や遺伝子欠損マウスの解析結果から TGF- β ファミリーシグナルの関与が明らかとなっている。

TGF- β は I 型受容体である Activin receptor-like kinase (ALK)-5 に結合して、細胞内シグナル伝達因子である Smad2/3 のリン酸化を介して、シグナルを伝達する。一方、BMP-9 は広く発現している ALK-2 または血管・リンパ管内皮細胞に選択的に発現している ALK-1 に結合して、Smad1/5 のリン酸化を介して TGF- β と独立したシグナルを伝達する。ALK-1 遺伝子の変異は遺伝性出血性毛細血管拡張症の発症の原因となることから、BMP-9/ALK-1 シグナルが血管の形成に重要であることは示されていたが、リンパ管形成における役割については明らかになっていなかった。そこで本研究では、TGF- β ならびに BMP の LEC における細胞内シグナル、遺伝子発現、増殖などの細胞応答への効果を検討した。

<結果>

TGF- β 2 ならびに BMP-9 で LEC を刺激したところ、細胞増殖が抑制されることから、これらの細胞増殖抑制作用がどのような細胞内シグナルにより誘導されるか検討した。この結果、TGF- β 2、BMP-9 とともに Smad2 ならびに Smad1/5 のリン酸化を誘導し、それぞれの標的遺伝子の発現が上昇していた。また、LEC において ALK-1 をノックダウンすると BMP-9

による標的遺伝子の発現誘導ならびに細胞応答は減弱した。また、LECにおいて ALK-5 をノックダウンすると TGF- β 2 による効果は抑制された。つまり、BMP-9 ならびに TGF- β 2 が標的遺伝子発現ならびに細胞増殖抑制を誘導するのは、それぞれ ALK-1 ならびに ALK-5 を介することが示唆された。

本研究室では TGF- β が LEC の増殖を抑制する際に Prox1 の発現が低下することを報告したが、その意義については十分に解明されていなかった。そこで TGF- β 2 ならびに BMP-9 による LEC の増殖抑制における Prox1 の関与を調べるため、まず Prox1 発現に対する効果を検討したところ、LEC において TGF- β 2 ならびに BMP-9 により *PROX1* の発現が低下した。siRNA を用いた検討からこの *PROX1* の発現低下はそれぞれ ALK-5 ならびに ALK-1 を介していると予想された。また *PROX1* の発現をノックダウンすると LEC の増殖が抑制されることから、TGF- β 2 ならびに BMP-9 による LEC の増殖抑制が *PROX1* の発現低下により誘導されることが示唆された。

<考察>

本研究の結果から、TGF- β 2 ならびに BMP-9 がリンパ管の形成においても重要な役割を果たし、その分子機序として Prox1 の発現低下を介することが明らかになった。共同研究者により炎症性リンパ管新生モデルやがん細胞移植モデルなどの個体レベルでの解析でも本研究の結果を支持する結果が得られている。リンパ管形成を調節することによりリンパ浮腫やがんのリンパ行性転移を治療できる可能性もあり、本研究で得られた知見が将来的に創薬の一助となることが期待された。

腎がんの進展における TGF- β ファミリーシグナルの機能解析

<背景>

腎細胞がんは全世界で毎年 10 万人以上が死亡するなど、罹患率の高いがんのひとつである。原発腫瘍に対しては外科的手術が有効であるため、5 年生存率は 65%以上であるが、進行した腎細胞がんに対しては抗 VEGF 薬等の分子標的治療薬などを用いた集学的な治療が行われる。ただしその効果は限定的であり、腎細胞がんの進展に関わる分子メカニズムを解明し、効果的な治療法を確立することが急務となっている。

TGF- β は腫瘍抑制因子としての働きと、腫瘍促進因子としての働きの二面的な作用を有しており、がんの進展に対する作用は複雑である。特に腎細胞がんの進展における TGF- β の作用は、これまでにほとんど解明されていない。そこで本研究では、腎細胞がん腫瘍組織を用いた病理組織学的検討と、ヒト腎細胞がん細胞を用いた *in vivo* と *in vitro* の実験を行い、腎細胞がんの進展における TGF- β の機能を検討した。

<結果>

Public database を用いて腎細胞がん細胞における TGF- β シグナル伝達因子の発現を調べたところ、TGF- β I 型受容体、II 型受容体および Smad の発現に関して特徴的な傾向は見られなかった。一方で腎細胞がん細胞では、Smad 依存的な TGF- β /BMP シグナルを負に制御する

転写共役因子のひとつである **c-Ski** の発現が亢進していることがわかった。この傾向は腎細胞がん腫瘍組織を用いた免疫組織化学染色でも再現されたため、以降は腎細胞がん細胞における **c-Ski** の機能を調べた。

ヒト腎細胞がん細胞に **c-Ski** を安定発現した細胞を作成しマウス腎被膜下に移植を行った。予め腎細胞がん細胞にルシフェラーゼを導入しておき、生物発光イメージング技術を応用して腫瘍形成能を評価したところ、**c-Ski** を安定発現することで腎細胞がん原発腫瘍の形成が亢進することがわかった。同様に **TGF- β** シグナル伝達を阻害する **dominant negative TGF- β receptor II (dnT β R-II)** を腎細胞がん細胞に導入した細胞を移植した場合でも腫瘍形成が促進したが、一方で **BMP** シグナル伝達を抑制する **Noggin** を安定発現した細胞を移植した場合は、腎細胞がん細胞の腫瘍形成に変化が認められなかった。これらの結果から、腎細胞がんの進展において、**TGF- β** は腫瘍抑制因子として作用しているが、腎細胞がん細胞では **c-Ski** の発現が亢進しており、これにより **TGF- β** シグナルが阻害されることが腎細胞がんの進展には重要なのではないかと推測された。

さらに **TGF- β** による腫瘍形成抑制のメカニズムを検討した。**TGF- β** の腎細胞がん細胞の増殖に対する作用を調べたところ、**TGF- β** 刺激により腎細胞がん細胞の増殖が抑制されることが観察された。また、腎細胞がん細胞に **TGF- β** 刺激をすることで **subG0, G1** 期に属する細胞の割合が増加し、**PARP** の分解が促進されたことから、**TGF- β** による腎細胞がんの腫瘍形成抑制にはアポトーシス誘導が関与していると示唆された。

<考察>

以上の結果から、腎細胞がんの進展において、**TGF- β** は腫瘍抑制因子として作用していることがわかった。腎細胞がん細胞では **c-Ski** の発現が亢進しているが、これによって **TGF- β** シグナル伝達が減弱し、**TGF- β** による細胞増殖抑制作用から逸脱することが、腎細胞がんの進展に重要であると考えられた。これらの分子の発現が腎細胞がんの進展や発がんに対するバイオマーカーとしても機能する可能性が示唆された。しかしながら **TGF- β** の古典的な作用として知られる細胞周期の停止機構は、腎細胞がん細胞では顕著でなく、**TGF- β** によるアポトーシス誘導作用などが関与していることが推測された。腎細胞がん細胞において、**TGF- β** によって誘導されるアポトーシス制御因子を同定することができれば、新たな治療戦略の創出につながると期待された。