リンパ管内皮細胞の機能制御における 転写因子・シグナルネットワークの役割

吉松 康裕^{1,2}, 渡部 徹郎²

要 旨：Prox1はリンパ管内皮細胞の分化や細胞機能に必須なマスター転写因子である。われわれはこれまでにProx1の機能を制御する転写因子としてEtsファミリー転写因子を、Prox1が制御するシグナル伝達経路として血小板由来増殖因子（PDGF）シグナルを同定した。また、Prox1そのものの発現を調節するシグナル因子として、内皮間葉移行の誘導因子であるTGF- β を同定した。（J Jpn Coll Angiol 2020; 60: 193–196）

Key words: Prox1, lymphatic endothelial cell, platelet-derived growth factor, Ets family transcription factor, transforming growth factor- β

受付：2020年7月6日 受理：2020年9月8日 公開：2020年11月10日

ホメオボックス転写因子Prox1の リンパ管内皮細胞における役割と機能

ホメオボックス転写因子Prox1は成体において中枢神経系、膵臓、肝臓、レンズ、筋肉、精巣など、さまざまな組織や臓器の発生においてそれぞれ重要な役割を果たしている。しかし、脈管系に限れば、リンパ管内皮細胞に発現が限局している。Prox1はOliverらによってリンパ管発生に必須であることが示されており、現在ではProx1はリンパ管内皮細胞マーカーの一つとして知られる¹⁾。リンパ管の発生は静脈から分岐することにより始まる。静脈内皮細胞においてリンパ管内皮細胞への分化能を獲得したLYVE-1（リンパ管内皮細胞マーカーの一つ）陽性の細胞がProx1を発現するようになると、血管内皮細胞増殖因子ファミリーの一つであるVEGF-Cへの走化性を獲得して初期リンパ嚢を形成し、これを起点として全身に向けて伸長していくと考えられている。

しかしながら、Prox1がどのような分子機構を介してリンパ管内皮細胞分化を誘導するかについてはまだ十分詳細に解析されていなかった。そこで、われわれはマウス胚性幹細胞（ES細胞）から分化させた血管内皮細胞にProx1を発現させることで、リンパ管の発生期にどの

ようなシグナルが機能しているのか、またその役割について解析を行った。通常、血管内皮細胞は血管内皮増殖因子VEGF-Aの受容体であり、血管内皮細胞マーカーでもある血管内皮増殖因子受容体VEGFR2を発現している。われわれはES細胞由来血管内皮細胞にProx1を発現させることで、同じ血管内皮増殖因子受容体ファミリーの一つで、VEGF-Cをリガンドとする受容体VEGFR3の発現が誘導されることを見出した²⁾。これに対して、すでにProx1を発現している皮膚由来のリンパ管内皮細胞においてはProx1の発現をsiRNAにより低下させると、VEGFR3の発現が低下し、細胞のVEGF-Cに対する走化性が低下した。以上から、Prox1はリンパ管内皮細胞がVEGF-Cに対する走化性を発揮するのに必須であることが示された（Fig. 1右）²⁾。

ES細胞由来血管内皮細胞にProx1を発現させると、細胞の運動性が顕著に亢進していることが見出されたので、これを制御するシグナル分子としてintegrinに着目したところ、integrin $\alpha 9$ の発現が亢進していた。同様にヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECにProx1を発現させても、細胞の運動性が亢進しintegrin $\alpha 9$ の発現が高くなったことから、これに対する中和抗体を作用させたところ、顕著に細胞の運動性が低下した。以上から、Prox1がintegrin $\alpha 9$ の発現を介して細胞の運動性を亢進させていることが示された（Fig. 1右）²⁾。

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科薬理学分野

²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科硬組織病態発生学分野

doi: 10.7133/jca.20-00032

Figure 1 Prox1-related signaling pathways in lymphatic endothelial cells

Prox1 induces cell differentiation and migration via induction of expression of VEGFR3 and integrin $\alpha 9$ in lymphatic development during embryogenesis. Ets-2 transcription factor modulates Prox1 function in the regulation of Prox1 target genes. PDGFR β , whose expression is regulated by Prox1, mediates inflammatory and tumor lymphangiogenesis. TGF- β downregulates expression of lymphatic endothelial cell (LEC) markers, LYVE1 and Prox1, via its receptor complex including ALK-5. SB431542 is a selective inhibitor of ALK-5.

Prox1の機能調節因子としての Etsファミリー転写因子の役割と機能

次にわれわれはProx1がさまざまな組織で発現するため、リンパ管内皮細胞特異的な機能を発揮するには、Prox1に対して作用する転写共役因子が存在するのではないかという仮説を立て、Prox1の機能調節を行う候補因子としてProx1結合因子を探索した。得られた複数の因子の中には、Ets-2というEtsファミリー転写因子が含まれていた³⁾。このEtsファミリー転写因子は血管内皮細胞でも発現しており、血管新生において重要な役割を果たすことが報告されていたが、リンパ管内皮細胞における役割は未解明であった。Prox1が調節する標的遺伝子の中からEts-2によって発現調節を受けるものとして、VEGFR3が同定された (Fig. 1右)。HUVECを用いた解析では、Prox1単独、Ets-2単独でそれぞれVEGFR3の発現が亢進するが、共発現させると、さらに顕著に発現が亢進した。この作用機構はProx1の標的遺伝子と考えられるAngpt-2や先述のintegrin $\alpha 9$ の発現調節においても観察された (Fig. 1右)。これらの発現制御が生体でも起きているかを検証するため、無菌性の腹膜炎を誘導する実験モデルにおいてEts-2をコードするアデノウィルスをマウスに投与したところ、コントロールのアデノウィルスに比べて顕著に炎症性のリンパ管新生を亢進した。

以上から、Ets-2がリンパ管形成（新生）を正に制御する転写因子であることが示された³⁾。

Prox1が制御する血小板由来増殖因子 (PDGF) シグナルの役割と機能

CaoらはPDGFを過剰発現させた腫瘍においてはリンパ管新生が亢進し、さらにリンパ節転移が亢進することを報告している⁴⁾。しかし、炎症やがんにおいて内因性のPDGFシグナルが存在するか、さらにこれを阻害することでリンパ管新生が抑制されるかについては未解明であったため、内因性のPDGFシグナルを阻害することで、炎症やがんにおけるリンパ管新生に対するPDGFシグナルの役割について検討した。PDGFの細胞外ドメインに抗体のFc領域を融合させたキメラタンパク質を設計し、炎症性のリンパ管新生および腫瘍リンパ管新生を誘導したマウスにおいて、これを用いてPDGFシグナルを抑制したところ、炎症性および腫瘍リンパ管新生がともに抑制された⁵⁾。以上の結果から炎症およびがんにおいてはともにPDGFシグナルが存在しておりリンパ管新生に寄与していることに加え、今回設計したPDGFシグナルの特異的阻害分子がリンパ管新生の抑制に有効であることが示された。さらに、われわれはこのシグナルの受容体についてProx1により発現調節を受ける可能性について検討したところ、2種の受容体のうち、PDGFR

Figure 2 Mechanism of TGF- β -triggered EndMT in lymphatic endothelial cells

In normal tissues, lymphatic endothelial cells maintain expression of activin A at a high level as well as that of LEC markers such as LYVE1 and Prox1, but suppress that of follistatin, an inhibitory molecule of activin A. In TGF- β -enriched tissues affected during senescence, inflammation and cancer, TGF- β induces EndMT, which is characterized by decreased expression of LEC markers and increased expression of mesenchymal markers including SM22 α . During EndMT of LECs, production of Activin A is increased while expression of follistatin is decreased, which leads to activation of autocrine loop of Activin signals. Such changes result in the long-lasting activation of Activin signal in LEC-derived mesenchymal cells and stabilization of EndMT.

α ではなく PDGFR β がProx1によって発現調節を受けていることを見出した (Fig. 1 中央)⁵⁾。

リンパ管内皮細胞における内皮間葉移行因子 TGF- β の役割とその作用機序

OkaらはTGF- β がリンパ管内皮細胞に直接作用して増殖を抑制し、リンパ管形成に抑制的に働くことを報告している⁶⁾。TGF- β は上皮間葉移行において強力な誘導因子として知られるが、近年、内皮細胞にも作用して内皮間葉移行 (Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT) を誘導することが示されている。リンパ浮腫を誘導した病態モデルや老化した組織では、機能低下を起こしたリンパ管内皮細胞が観察され、間葉系細胞マーカーの共発現が見られることから⁷⁻⁹⁾、われわれは、TGF- β がリンパ管内皮細胞に対してもEndMTを引き起こすと予想し、ヒトリンパ管内皮細胞を用いて、この役割とその作用機序について検討した。TGF- β の添加により72時間後では、リンパ管内皮細胞マーカー LYVE-1およびProx1の発現が顕著に低下し、TGF- β の受容体阻害剤SB431542の添加により顕著に上昇した (Fig. 1左)。一方、間葉系細胞マーカーであるSM22 α の発現はTGF- β の添加により顕著に上昇し、SB431542の添加により抑制された。さらに、間葉系細胞の特徴である細胞の運動性の亢進について検討したところ、TGF- β の添加により運動性の亢進が観察された¹⁰⁾。以上から、リンパ管内皮細胞がTGF- β の作用により、間葉系細胞の性質を獲得していることが示された。この現象の分子機構について解析を進めたところ、TGF- β 添加後72時間でも、細胞内シグナル伝達因子であるSmad2のリン酸化が亢進していることを見出した。TGF- β 様の液性因子の存在が示唆されたので、関連

因子の発現を検討したところ、3種類あるTGF- β のアイソフォームではなく、類似シグナル因子であるactivin Aを構成するinhibin β Aの発現が亢進しているとともに、この阻害因子であるfollistatinの発現が低下していた。以上から、リンパ管内皮細胞において、TGF- β によって誘導されたEndMTは内因性のActivin Aシグナルの増強によりEndMTが亢進していくと考えられる (Fig. 2)。

謝 辞

本研究は、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。とくに分子病理学分野の宮園浩平教授に心より深謝申し上げます。また、以上の研究室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。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反はない。

付 記

本論文の要旨は第60回日本脈管学会総会学術委員会シンポジウム3 (2019年、東京) にて発表した。

文 献

- 1) Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; **98**: 769–778
- 2) Mishima K, Watabe T, Saito A, et al: Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha 9 and other signaling cascades. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 1421–1429

- 3) Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira M, et al: Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1. *J Cell Sci* 2011; **124**: 2753–2762
- 4) Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, et al: PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* 2004; **6**: 333–345
- 5) Miyazaki H, Yoshimatsu Y, Akatsu Y, et al: Expression of platelet-derived growth factor receptor β is maintained by Prox1 in lymphatic endothelial cells and is required for tumor lymphangiogenesis. *Cancer Sci* 2014; **105**: 1116–1123
- 6) Oka M, Iwata C, Suzuki HI, et al: Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood* 2008; **111**: 4571–4579
- 7) Clavin NW, Avraham T, Fernandez J, et al: TGF-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **295**: H2113–H2127
- 8) 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 β signalling through Smad2. *J Cell Sci* 2014; **127**: 845–857
- 9) Zolla V, Nizamutdinova IT, Scharf B, et al: Aging-related anatomical and biochemical changes in lymphatic collectors impair lymph transport, fluid homeostasis, and pathogen clearance. *Aging Cell* 2015; **14**: 582–594
- 10) Yoshimatsu Y, Kimuro S, Pauty J, et al: TGF-beta and TNF-alpha cooperatively induce mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells via activation of Activin signals. *PLoS One* 2020; **15**: e0232356

Roles of Transcription Factors and Signaling Networks in the Regulation of Lymphatic Endothelial Cell Function

Yasuhiro Yoshimatsu^{1,2} and Tetsuro Watabe²

¹Division of Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata, Japan

²Department of Biochemistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan

Key words: Prox1, lymphatic endothelial cell, platelet-derived growth factor, Ets family transcription factor, transforming growth factor- β

The homeobox transcription factor Prox1 is considered as a master regulator for the differentiation and function of lymphatic endothelial cells. To date, we identified Ets family transcription factors as a positive regulator of Prox1 function, and platelet-derived growth factor (PDGF) signal as a Prox1-regulated signal transduction pathway. In addition to them, we report, as a negative regulator of Prox1 expression, transforming growth factor- β (TGF- β), which is an inducer of endothelial mesenchymal transition (EndMT) in lymphatic endothelial cells, and its underlying molecular mechanism.

(J Jpn Coll Angiol 2020; **60**: 193–196)

Online publication November 10, 2020