

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890022

研究課題名（和文）TGF- $\beta$  シグナルによる血管新生制御機構の時空間的解析研究課題名（英文）The role of TGF- $\beta$  signaling in Angiogenesis

研究代表者

伊東 史子（ ITOH FUMIKO ）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：70502582

研究成果の概要（和文）：Smad2/3CDK0 マウス由来の血管内皮細胞(MEEC)を作製した。より生体に近い条件で検討するために、シェアストレスに対する影響を調べたところ、野生型 EC と比較して反応性が低下していた。応答する変動遺伝子を精査するためにマイクロアレイ解析、miRNA アレイ解析を行った。TGF- $\beta$  シグナルが存在しないと、一部のカドヘリンの mRNA が低下していた。現在 miRNA の標的 mRNA の同定を行っている。

また、リンパ管形成における TGF- $\beta$  シグナルの役割を *in vivo* で明らかにするために、TGF- $\beta$  シグナルの受容体をリンパ管内皮細胞特異的に欠損させたマウスを作製した。胎生 10.5 日にタモキシフェンを母体腹腔内に投与し、13.5 日、14.5 日で解剖したところ、わずかな浮腫を認めた。リンパ管のマーカーである LYVE1 で染色したところ、野生型と比較して TGF- $\beta$  シグナルを欠損した胚ではリンパの拡張及び未熟なリンパ管網を検出した。現在、リンパ管の異常をきたす原因遺伝子の探索を行っている。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate molecular mechanisms by which TGF- $\beta$ /ALK5/Smad2/3 pathway regulates vascular development, we established mouse embryonic endothelial cells (MEECs) from Smad2/3 conditionally inactivated mice. When we checked the reaction against for the shear stress, the Smad2/3KO MEECs did not respond it. Then we analyzed the molecular mechanisms with mRNA and miRNA arrays analysis and found that the expression of some cadherins were reduced in Smad2/3 KO MEEC compared to the wild type MEECs.

Although TGF- $\beta$  signaling is known to play key roles in angiogenesis, it remains veiled how TGF- $\beta$  regulates lymphangiogenesis. To elucidate molecular mechanisms by which TGF- $\beta$  pathway controls lymphatic vascular development, we conditionally inactivated TGF- $\beta$  type II receptor (T $\beta$ RII) in LECs using Prox1-Cre-ER transgenic mice. When we administered Tamoxifen (TM) at E10.5 and E11.5, T $\beta$ RII<sup>F/F</sup>; Prox1-CreER embryos showed edema at E14.5. Therefore we stained blood and lymphatic vessels with anti-PECAM-1 and anti-LYVE-1 antibodies, respectively. Interestingly, blood vessel seemed to be well-established, whereas lymphatic vessels merely existed though they were ragged and poorly organized. These data indicated that TGF- $\beta$  signaling is indispensable for maintenance of lymphatic vessel integrities.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・実験病理学

キーワード：TGF- $\beta$ 、血管新生、Smad2/3、conditional knockout、リンパ管

### 1. 研究開始当初の背景

血管新生に關与するサイトカインの中で、TGF- $\beta$ は血管内皮細胞（EC）だけでなく血管平滑筋細胞（VSMC）の増殖・分化にも作用して血管新生を正負両面から調節している。通常 TGF- $\beta$ は、TGF- $\beta$ I 型受容体・ALK5 を介して Smad2/3 をリン酸化しシグナルを伝達するが、EC では EC 特異的受容体・ALK1 と結合し、BMP によって制御されている Smad1/5/8 をリン酸化し、血管新生を複雑に制御している。ALK1 は ALK5 のキナーゼ活性を利用して Smad1/5/8 をリン酸化するため、ALK5 の遺伝子欠損は TGF- $\beta$  による全ての Smad リン酸化が失われることになり、ALK5 ノックアウト（KO）マウスの解析では、*in vivo* における血管新生における ALK5 の役割解明は不十分であった。そこで EC 特異的に TGF- $\beta$ /ALK5 シグナル欠損した Smad2<sup>F/F</sup>； Smad3<sup>-/-</sup>； Tie2-Cre（Smad2/3 コンディショナルダブル KO（CDKO）マウスを解析したところ、これまでに報告された表現系とは違い、胎生期全身から出血して致死となる胚を得た。

### 2. 研究の目的

EC 特異的に TGF- $\beta$ /ALK5 シグナル欠損した Smad2<sup>F/F</sup>； Smad3<sup>-/-</sup>； Tie2-Cre（Smad2/3 コンディショナルダブル KO（CDKO）マウスの胎仔がなぜ出血性致死をもたらすのか、その分子メカニズムを明らかにし、血管新生における TGF- $\beta$ /ALK5/Smad2/3 シグナルの役割を解明する。

### 3. 研究の方法

- Smad2/3 CDKO マウス胚から血管内皮細胞を単離し、mRNA アレイ解析、及び、miRNA アレイ解析を行い、野生型と比較して変動している遺伝子群を同定する。

- Smad2/3 CDKO マウス胚を用いた臍腸管アッセイを行い、血管内皮細胞の動態を確認する。さらに、アデノウイルスを用いて Smad2/3 の発現を回復させたときに EC の動態を検証する。

- 血管が成熟しないことから、リンパ管新生への分化に対する影響が示唆されたため、ALK5 と Prox1-CreER マウスとの交配を進める。

### 4. 研究成果

Smad2/3CDKO マウス由来の血管内皮細胞（MEEC）を作製した。より生体に近い条件で検討するために、シェアストレスに対する影響を調べたところ、野生型 EC と比較して反応性が低下していた。応答する変動遺伝子を精査するためにマイクロアレイ解析、miRNA アレイ解析を行った。TGF- $\beta$  シグナルが存在しないと、一部のカドヘリンの mRNA が低下していた。miRNA については、その標的 mRNA の同定を行っている。

また、リンパ管形成における TGF- $\beta$  シグナルの役割を *in vivo* で明らかにするために、TGF- $\beta$  シグナルの受容体及び Smad をリンパ管

内皮細胞特異的に欠損させたマウスを作製した。胎生 10.5 日にタモキシフェンを母体腹腔内に投与し、13.5 日、14.5 日で解剖したところ、わずかな浮腫を認めた。リンパ管のマーカーである LYVE1 で染色したところ、野生型と比較して TGF- $\beta$  シグナルを欠損した胚ではリンパの拡張及び未熟なリンパ管網を検出した。現在、リンパ管の異常をきたす原因遺伝子の探索を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, Itoh F & Kato M. Requirement of TCF7L2 for TGF- $\beta$ -independent transcriptional activation of the TMEPAI gene. *J. Biol. Chem.*, **285**, 38023-38033 (2010) (査読有)
2. Ishitobi H, Matsumoto K, Azami T, Itoh F, Itoh S, Takahashi S & Ema M. *Flik1-GFP* BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp. Anim.*, **59**, 615-622 (2010) (査読有)
3. Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S & Kato M. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood*, **115**, 4138-4147 (2010) (査読有)
4. Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, Satoh K, Wiercinska E, Yang W, Shi L, Tanaka A, Nakano N, Mommaas AM, Shibuya H, ten Dijke P & Kato M. TMEPAI, a transmembrane TGF- $\beta$ -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- $\beta$  signaling. *Mol. Cell*, **37**, 123-134 (2010) (査読有)
5. Itoh F #, Itoh S#, Carvalho R.L.C#, Adachi T, Ema M, Goumans MJ, Larsson

J, Takahashi S, Mummery CL, ten Dijke P & Kato M. (#equally contributed) Poor vessel formation in Embryos from Knock-in Mice Expressing ALK5 with L45 loop mutation defective in Smad activation. *Lab. Invest.*, **89**, 800-810 (2009) (査読有)

6. Tanaka A, Itoh F, Itoh S & Kato M. TAL1/SCL relieves the E2-2-mediated repression of VEGFR2 promoter activity. *J. Biochem.*, **145**, 129-35 (2009) (査読有)
7. 血管新生における TGF- $\beta$  ファミリーの役割と疾患. 伊東史子、伊東進、加藤光保. *実験医学* **28**, 877-882 (2010) (査読無)
8. 血管新生における TGF- $\beta$  ファミリーの役割と疾患. 伊東史子、伊東進、加藤光保. *実験医学* **28**, 877-882 (2010) (査読無)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 伊東史子、血管・リンパ管の安定性維持における TGF- $\beta$  シグナルの役割 第 18 回血管生物医学会、優秀ポスター賞受賞 2010.12.3, 大阪
2. Itoh F, Itoh S, Adachi T, Festing M, Weinstein M & Kato M: Impairment of vascular stability by endothelial specific ablation for Smad2 and Smad3 genes the 16<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting. Los Angeles, California, U.S. 2010.6.20-24
3. Itoh F, Itoh S, Adachi T & Kato M: Vascular endothelial cell-specific Smad2 and Smad3 signaling is required for blood vessel integrity. The 59<sup>th</sup> Fujiwara International Seminar. Tomakomai, Japan 2010.7.15
4. Itoh F, Itoh S, & Kato M: Impairment of vascular stability by endothelial specific ablation for Smad2 and Smad3 genes. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.11, 横浜 (ワークショップ、シンポジスト)
5. Itoh F: The TGF- $\beta$  signaling: Impairment of vascular stability by endothelial specific ablation for Smad2 and Smad3 genes. FASEB Summer

Research Conference. Carefree,  
Arizona, U.S. 2009.6.28-7.3 (招待講  
演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 史子

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・  
助教

研究者番号：70502582