

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年 4月 23日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 東京理科大学 生命医科学研究所

住所 千葉県野田市山崎 2669

研究者氏名 昆 俊亮

(研究課題)

がん細胞のリンパ管侵襲を標的とした制がん法の確立

令和5年 1月 30日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【背景と目的】

悪性化したがん細胞は血管もしくはリンパ管に侵襲して転移するため、この機構を制する解法を導出できれば、既存の抗がん剤や外科的処置との併用により、がん治療効率の大幅な改善が期待できる。1970年代から腫瘍血管新生に関する研究は盛んに行われており、血管新生因子 VEGF の分子標的薬であるアバスチンが現在では上市されている。一方、がん細胞のリンパ行性転移の分子機構に関する知見は少なく、これをターゲットとした抗がん剤開発はその諸にも就いていないのが現状である。研究代表者らのグループでは、細胞競合と称される正常上皮細胞が有する抗腫瘍機構が APC 遺伝子の変異によって機能変容し、逐次的に活性化 Ras 変異を誘導すると、本来細胞競合によって管腔側へと排除されるべきがん変異細胞がびまん性に浸潤し、腸管にて発がんすることを最近報告した (Nakai et al., Nat. Commun., 2023)。このマウスのがん病態についてさらに解析を行った結果、Ras 変異誘導 28 日後には、がん細胞は粘膜筋板を穿破し、非常に悪性度の高いがん細胞が産生されることがわかった。さらに興味深いことに、このがん細胞は血管ではなくリンパ管に選択的に侵襲し、リンパ行性特異的に転移することを見出した。そこで、がん細胞が産生されてから腫瘍が形成されるまでのリンパ管構造を経時的に観察した結果、腫瘍進展に伴ってリンパ管が退行することが明らかとなった。そこで本研究では、「がん細胞はリンパ管構造を脆弱化することによってリンパ管内に侵襲する」という仮説のもと、がん細胞のリンパ行性転移の本態を解明することを目的とした。

【研究方法】

がん細胞によるリンパ管退行の機序を解明するために、上記の発がんマウスを用いて single cell RNAseq 解析を行った。具体的には、①正常状態（がん変異誘導前）、②がん発生期（がん変異誘導 7 日後）、③がん定着期（がん変異誘導 28 日後）の 3 つの時間軸を設定し、蛍光顕微鏡下でがんが発生もしくは定着した絨毛をカミソリを用いて切り出し、EDTA と消化酵素にて細胞を乖離させ、生存率が 85% を超える細胞懸濁液を調整した。この方法により採取した腸管細胞を用いて、高感度 single cell RNAseq 解析である TAS-seq を行った。続いて、Rstudio ソフトウェアを用いて、各細胞種のクラスタリングを行い、リンパ管内皮細胞群を定義し、がん進展に伴ってリンパ管内皮細胞でどのような遺伝子発現変化が生じるかを検討した。さらに、がん細胞とリンパ管内皮細胞との間で親和性の高い分子を細胞間コミュニケーションツールである CellChat により探索した。

【実験結果】

まず初めに、がん細胞が誕生してから腫瘍が形成される過程におけるリンパ管内皮細胞の性状変化を調べるため、single cell RNAseq 解析を行った。その結果、がん細胞産生後、腫瘍形成に伴ってリンパ管内皮細胞のクラスターが 2 種に分類されていくことを突き止めた。1 つのクラスターは正常状態のリンパ管内皮細胞であり、もう 1 つのクラスターはがん細胞の拡張に伴って出現するクラスターであることがわかったため、それらのクラスター間にて変化する遺伝子群を抽出し、GSEA 解析を行った結果、inflammation-response genes や EMT 関連の遺伝子が腫瘍随伴リンパ管内皮細胞クラスターで有意に発現変化することを見出した。この結果から、リンパ管内皮細胞では内皮-間葉転換 (EndMT: Endothelial-to-Mesenchymal Transition) が生じることが示唆され、実際に EndMT 関連遺伝子の発現が顕著に変化していた。そこで、リンパ管内皮細胞に EndMT が誘導されると発現が亢進することが知られている Transgelin の免疫染色を行った結果、正常部位ではリンパ管内皮細胞に並走する平滑筋細胞で Transgelin が強く発現し、リンパ管内皮細胞ではその発現が認められなかったが、がん部位ではがん細胞に隣接するリンパ管内皮細胞で Transgelin が強発現していた。また、Transgelin と同様に EndMT マーカーである α -SMA を染色した場合にもがん部のリンパ管内皮細胞の一部で α -SMA が強発現していた。一方、EndMT が誘導されると発現が低下する VE-cadherin を染色したところ、がん細胞周辺に存在するリンパ管内皮細胞にてその発現が失われていた。興味深いことに、血管内皮細胞ではこれらの EndMT 関連分子の発現に変化が認められなかったため、本発がんマウスのがん細胞はリンパ管内皮細胞選択的に作用する

ことが示唆された。さらに、EndMT がリンパ管内皮細胞で誘導されているかどうかを検討するため、リンパ管内皮細胞のマスターレギュレーターである転写因子 Prox1 と LYVE1 との共染色を行った。EndMT が誘導されると、まず Prox1 の発現が低下し、その後リンパ管内皮細胞の機能分子である LYVE1 の発現が低下する。そこで、Prox1-陽性/LYVE1-陽性細胞をリンパ管内皮細胞、Prox1-陰性/LYVE1-陽性細胞を EndMT が誘導されたリンパ管内皮細胞と定義し、発がん後の各細胞群の割合を経時的に定量した結果、腫瘍の進展に伴って Prox1-陰性/LYVE1-陽性細胞の割合が増加することがわかった。この結果より、本発がんマウスにおけるがん細胞はリンパ管内皮細胞特異的に EndMT を誘因することの傍証となった。

続いて、がん細胞がリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導する分子論的なメカニズムを明らかにするため、single cell RNAseq のデータを用いて、細胞-細胞間コミュニケーションの解析ツールである CellChat による解析を行った。がん細胞が血管内皮細胞ではなく、リンパ管内皮細胞特異的に感作する分子を探索した結果、がん細胞にて発現する Macrophage Migration Inhibitory factor (MIF) とリンパ管内皮細胞にて発現する Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3) が腫瘍組織にて親和性が高く、活性化することを突き止めた。そこで、 α -SMA のプロモーター下で GFP を発現する EndMT のレポーター細胞である EMREC 細胞に MIF のリコンビナントタンパクを添加したところ、顕著に EndMT が誘導された。これらの結果より、がん細胞が MIF を分泌、その受容体であるリンパ管内皮細胞の ACKR3 に感作し、EndMT を誘導することが示唆された。

【考察】

がん細胞がどのようにしてリンパ管に侵襲するかは腫瘍生物学において重要な課題の一つであるが、その詳細な機構についてはよく理解されていない。これまでに行われてきた組織学的な研究より、がん細胞の集団塊による物理的な圧力がリンパ管構造を破壊し、がん細胞が管内へ浸潤することが提唱され、すなわちリンパ管内皮細胞ががん細胞を 'passive' に受け入れる現象だと考えられていた。しかしながら最近の研究では、CCR7-CCL21 シグナルが内皮細胞間のギャップにがん細胞が入り込むことを誘引することや、がん細胞から分泌される増殖因子や炎症性シグナルが VE-cadherin を介した細胞間接着を減弱させ、侵襲を促進することなど、がん細胞とリンパ管内皮細胞とで積極的に細胞間コミュニケーションが行われることが提唱されている。本研究成果より、がん細胞はリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導することによりリンパ管構造が脆弱化し、がん細胞のリンパ管侵襲が促進されることを示された。また、その分子実体の候補の一つとして MIF-ACKR3 シグナルを同定した。EndMT、もしくはリンパ行性転移において MIF-ACKR3 の関与はこれまでに報告がなく、これらのプロセスを制御する新規因子としてさらに研究を進める予定である。そして、将来的にはリンパ行性転移を阻害する制がん法を確立していきたい。

【発表論文】

1. Nakai, K., Lin, H., Yamano, S., Tanaka, S., Kitamoto, S., Saitoh, H., Sakuma, K., Kurachi, J., Akter, E., Konno, M., Ishibashi, K., Kamato, R., Ohashi, A., Koseki, J., Takahashi, H., Yokoyama, H., Shiraki, Y., Enomoto, A., Abe, S., Hayakawa, Y., Ushiku, T., Mutoh, M., Fujita, Y., **Kon, S.** Wnt activation disturbs cell competition and causes diffuse invasion of transformed cells through NF- κ B-MMP21 pathway. *Nature Communications* 14, 7048, 2023

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、公益財団法人がん研究振興財団からの温かいご支援に深謝申し上げます。