

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02682

研究課題名(和文) Foxc分子ネットワーク解明による腫瘍リンパ管新生制御と転移阻害手法の確立

研究課題名(英文) Foundation of anti-lymphangiogenesis and metastasis method via Foxc network analysis

研究代表者

久米 努 (Kume, Tsutomu)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・客員教授

研究者番号：60786474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍リンパ管新生は原発巣のリンパ管を主要経路としてリンパ節を介して転移するリンパ行性転移と密接に関与するが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。そこで、まずリンパ管内皮細胞の増殖制御の観点から、Foxc1/2 転写因子の標的の下流制御因子としてRas のnegative regulator RasGAP、Rasa4/Rasa13 を見出し、そのリンパ管内皮特異的な欠損マウスの樹立を進めた。次にリンパ弁形成、安定化における Foxc1/2 の重要性について検討し、リンパ弁先端のリンパ層流を受ける部位では、Foxc1 が、逆に弁内部の乱流部位では Foxc2 が、細胞骨格制御を行うことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織のがん微小環境において、細胞と炎症細胞から分泌されるVEGF-C/D等のリンパ管新生因子は既存のリンパ管内皮細胞の増殖と運動を亢進し、リンパ管新生が起こる。近年VEGFC/VEGFR-3シグナルをブロックする阻害剤の臨床試験が進められているものの、リンパ管新生やリンパ弁形成を含めたリンパ管安定化を標的とした新たな治療法の開発が喫緊の課題である。特にリンパ管内皮細胞の増殖を抑制する新規因子の同定・機能解析は、腫瘍組織およびセンチネルリンパ節におけるリンパ管新生に直接関わるので、その研究成果は創薬開発に繋がる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：The lymphatic vasculature has a critical role in maintaining tissue homeostasis by returning interstitial fluid to the venous circulation, absorbing lipids from the digestive tract, and providing a network for immune surveillance and response. Mutations identified in genes involved in the VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway are commonly associated with primary lymphedema and other lymphatic malformations, which include mutations in critical transcription factors, FOXC or GATA. FOXC1 and FOXC2 are closely related members of the forkhead box (FOX) transcription factor family. Here, we report an essential role for FOXC1 during lymphatic valve maturation and maintenance. Detailed comparison of FOXC1 and FOXC2 expression and roles in lymphatic valves suggests some overlap with a broader importance for FOXC2, but more subtle, key contribution for FOXC1.

研究分野：血管生物学、分子腫瘍学

キーワード：リンパ管新生 リンパ弁 血管新生 FOXC GATA share stress

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍リンパ管新生は原発巣のリンパ管を主要経路としてリンパ節を介して転移するリンパ行性転移と密接に関与するが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。申請者らは転写因子 Foxc1、Foxc2 のリンパ管特異的欠損マウスの解析から、新規下流標的因子として RasGAP を同定し、胎生期におけるリンパ管新生機序 (Ras/MAP kinase signal の関与) を示してきた (Cell *J. Clin. Invest.* 2016)。

(2) 血管やリンパ管内皮細胞は存在する微小環境、即ち異種細胞間相互作用やサイトカイン、血流やリンパ流、酸素分圧の影響を受けて、主にエピゲノムレベルでの可逆的あるいは不可逆的な制御下、その微小環境に即した構造や弁形成・遺伝子発現を行うことが知られている。しかし、網羅的な Omics 解析、顕微鏡下での経時的な構造の変動解析は進められていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

(1) 病態時における腫瘍リンパ管新生の分子基盤、特にリンパ管内皮の増殖制御機構とリンパ行性がん転移のメカニズムを解明し、がん治療の臨床応用へと展開する新たな研究基盤の確立である。そこで以下 4 項目を立案した。

リンパ管特異的 Foxc1/2 欠損マウスで見られる腫瘍リンパ管新生と転移過程を解析する。  
この病態マウスに MEK 阻害剤を投与して腫瘍リンパ管新生と転移の抑制を検討する。

リンパ管特異的 RasGAP 欠損マウスで見られる腫瘍リンパ管新生と転移過程を解析する。

Ras/MAP キナーゼシグナルの負の調節因子 RasGAP と Spred2 の発現制御の機序を解明する。

(2) 血管内皮・リンパ管内皮細胞の考慮されうる多様性 (heterogeneity) について既存の研究成果をまとめると共に、リンパ管の弁形成時における FOXC1/2 の関与、血管・リンパ管内皮特異的な新規遺伝子 (DESM) について、その発現制御を in vivo にて解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) リンパ管特異的 RasGAP 欠損マウスで見られる腫瘍リンパ管新生と転移の解析

Foxc 転写因子の新規下流因子 RasGAP (Rasa4 と Rasa13) は、コンディショナルノックアウト (floxed) マウス系統が樹立されていないので、先ず熊本大学生命資源研究・支援センターにおいて CRISPR/Cas9 系を用いて作製する。loxP をイントロンに導入する系で C57BL6 由来の ES 細胞を用い、マウス樹立を行う。

(2) FOXC1 と C2 の発現パターンを 4 週齢マウスの成熟リンパ管の弁にて探索し、さらにリンパ流での影響をリンパ管内皮特異的 FOXC1, FOXC2 欠損マウスを用い解析する。

(3) DESM に関しては、エクソン 1 に何らかの機能(未解明)を有すると考えられるドメインが存在し、かつヒト、マウス間での共通性も高いことから、エクソン 1 をそのまま lacZ マ

ーカー遺伝子に入れ替えた knock-in マウスを樹立し、マウスをもちいた発現と機能解析を進める。

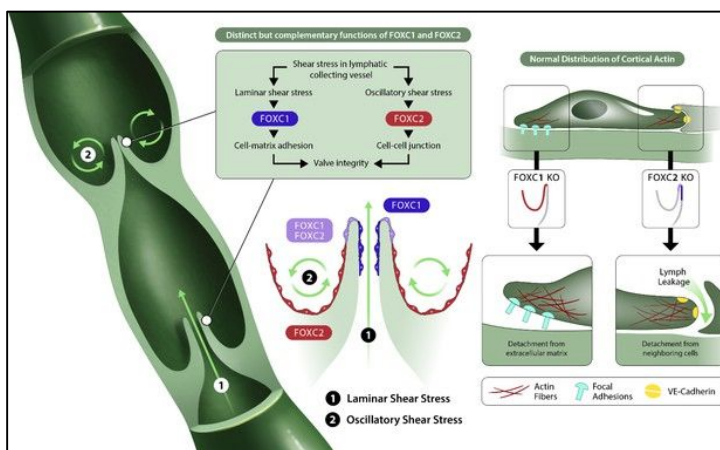
#### 4. 研究成果

(1) Rasa13 ゲノムへの loxP 配列導入は 2018 年度に Rasa4 ゲノムへの loxP 配列導入は 2019 年度に行った。基本的に ES 細胞の改変は Nickase を用いる CRISPR/Cas9 の系にて 2 カ所のガイド RNA にて行った。コロニーPCR、サザンプロットを介して組み換え ES 細胞の評価を行い、ES 細胞 2 種類を aggregation 法にてマウス blastocysts に導入し、個体化を行った。B6 細胞の寄与率の高い 3 種類のキメラマウスを各々維持し、B6 wild type マウスと掛け合わせ、ヘテロ knock-in マウスの作製に至った。リンパ管内皮特異的 Cre 発現マウスはシカゴ Northwestern 大学において維持しているため、熊本から凍結精子の輸入手続きをとり、両マウスの受け入れを完了させた。LoxP ノックインマウスのホモ化を行い、まずは PROX1 promoter-CreERT2 発現マウスと掛け合わせることで、本研究の最終目的である、リンパ管内皮増殖制御機構の表現型解析に移行する予定である。なお、この研究代表者と分担者の連携はコロナ禍の影響を強く受け、マウス維持や凍結精子保存の順番待ちなど大きく遅延する要因が多々生じた。

(2) FOXC1, FOXC2 のリンパ弁での発現制御において、特にリンパ弁先端部分ではリンパ管内皮に層流の影響を受け、リンパ弁の内腔部分では渦を巻いた乱流を受けることが想定される。遺伝子発現の結果、層流

では FOXC1 が乱流では主に FOXC2 が機能的に活性化され、RhoA シグナルの抑制制御、アクチン細胞骨格の変化を伴い、リンパ弁の成熟化に至る仕組みを明らかにすることが出来た (Norden, PR. et.al. eLife 2020)。

#### FOXC1 and FOXC2 maintain



lymphatic valve integrity by regulating cytoskeletal organization in complementary roles.

(3) DESM の lacZ knock-in マウスを樹立した。DESM 自体の欠損では C57BL6 バックグラウンドにおいて、何ら異常は見受けられず、メンデル型の遺伝を維持していることから、グローバルに欠損しても発生や成熟過程に影響を与えないと結論づけた。一方、lacZ の発現をもとに発現組織を詳細に解析したところ、胎生期 8.5 日以降の血管内皮に限局して発現し、生後迅速にその内皮特異的発現が消失することが判明した。また胎生期でのリンパ管やリンパ弁においても発現していること、更にはルイス肺がんやメラノーマの担がんモデル

において腫瘍血管内皮に再度特異的に DESM の promoter 活性化 (LacZ マーカーの発現) が認められることから、DESM 自体は未熟な血管内皮やリンパ管内皮に発現誘導を受けることが示唆された。周皮細胞に覆われること、活発な増殖制御から離脱することが血管の安定化に繋がると想定されるが、この DESM の発現制御と、病態時における DESM の役割については今後更に解明する計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Norden Pieter, Kume Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Lymphangiogenesis and Lymphatic Collecting Vessel Function in Metabolic Disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.00404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Minami Takashi, Muramatsu Masashi, Kume Tsutomu	4. 巻 42
2. 論文標題 Organ/tissue-specific vascular endothelial cell heterogeneity in health and disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1609-1619.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 久米努	4. 巻 41(2)
2. 論文標題 リンパ管の発生・弁形成の分子制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 リンパ学	6. 最初と最後の頁 67-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Norden Pieter R., Kume Tsutomu	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular Mechanisms Controlling Lymphatic Endothelial Junction Integrity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.627647	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Norden Pieter R, Sabine Am?lie, Wang Ying, Demir Cansaran Saygili, Liu Ting, Petrova Tatiana V, Kume Tsutomu	4. 巻 9
2. 論文標題 Shear stimulation of FOXC1 and FOXC2 differentially regulates cytoskeletal activity during lymphatic valve maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 53814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.53814	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc Transcription Factors in Organ-Specific Lymphatic Function
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Lymphatics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pieter R. Norden, Lisa J. Beckmann, Zhen Cai, Xian Zhang, Hao F. Zhang, and Tsutomu Kume
2. 発表標題 Neural-crest derived Foxc2 expression is required for proper morphogenesis of the Schlemm 's Canal
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Lymphatics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Can Tan, Ting Liu, and Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc1 and Foxc2 are required in blood and lymphatic vasculatures for small intestinal mucosal repair after ischemia/reperfusion injury
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Lymphatics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pieter R. Norden, Am&eacute;lie Sabine, Ying Wang, Ting Liu, Tatiana V. Petrova, and Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc1/Foxc2 regulation of RHO/ROCK activation in postnatal lymphatic valve maturation
3. 学会等名 Lymphatic Forum 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc transcription factors in lymphatic valve development
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Mechanisms of lymphatic valve formation
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society of Lymphology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc transcription factors in organ-specific lymphatic function
3. 学会等名 The 2020 Gordon Research Conference on Lymphatics
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Neural-crest derived and endothelial Foxc2 expression is required for proper morphogenesis of the Schlemm's Canal
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting in 2020 (IVBM 2020)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	南 敬  (Minami Takashi)  (00345141)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授   (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ノースウェスタン大学医学研究科		