

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19357

研究課題名（和文）腫瘍リンパ管新生の本態の解明

研究課題名（英文）Analysis of tumor-induced lymphangiogenesis

研究代表者

昆 俊亮（Kon, Shunsuke）

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・准教授

研究者番号：70506641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞は血管またはリンパ管を介して転移するが、がん細胞がどのようにしてリンパ管に侵襲するかはよくわかっていない。本研究では、腸管にてリンパ指向性に転移するマウスモデルを解析した結果、腫瘍の進展に伴って、腸管のリンパ管である乳糜管が退行することを明らかにした。さらに、single cell RNA-seqの結果より、リンパ管内皮細胞では内皮 間葉転換(EndMT)に関わる分子の発現が顕著に変化することを突き止め、実際に腫瘍部位のリンパ管内皮細胞ではEndMTが誘導されることを明らかにした。これらの結果より、がん細胞はリンパ管内皮細胞にEndMTを誘導し、リンパ管内に侵襲することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性化したがん細胞は、血管もしくはリンパ管に侵襲し転移するため、このプロセスを抑止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の治療効率の大幅な改善が期待できる。本研究成果では、がん細胞がリンパ管内皮細胞にEndMTを誘導することにより、リンパ管の構造不安定化を惹起し、管内に侵襲することを示唆する結果が得られた。リンパ管侵襲に関する研究を臨床医学に応用する試みはまだ世界でも始まっておらず、がん手術時にリンパ節郭清が標準的に行われている本邦こそが世界に先んじてこの研究分野のイニシアティブをつかむべきである。

研究成果の概要（英文）： Complete unravelling the mechanism of lymphovascular invasion of cancer cells remains a formidable challenge. In this study, using lymphatic metastasis-prone transgenic mice, we observed the gradual lacteal attrition as the tumors expand. The single cell RNA-seq analysis revealed that the genes related to endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) are profoundly stimulated in lymphatic endothelial cells in tumors. We observed that EndMT markers are substantially upregulated in lymphatic endothelial cells close to cancer cells. Collectively, these results demonstrate that cancer cells invade lymphatic vessels through disruption of lymphatic integrity, which is caused by EndMT induction.

研究分野：腫瘍発生学

キーワード：リンパ行性転移 リンパ管侵襲 EndMT

1. 研究開始当初の背景

悪性化したがん細胞は、血管もしくはリンパ管を介して遠隔臓器に転移する。臨床的には転移の有無が患者の予後を決定する主たる要因であり、またがん転移は脈管内への侵襲により始まるため、がん細胞の脈管侵襲機構の解明が希求されている。がん細胞の血行性転移に関する研究はこれまで精力的に行われており、そのメカニズムに関する知見はかなり蓄積されてきた。一方、リンパ行性転移に関する研究は遅れており、とりわけがん細胞がどのようにしてリンパ管に侵襲するかは不明な点が多い。当初は、腫瘍の成長に伴って、腫瘍塊が物理的にリンパ管を破壊し、がん細胞が管内に侵襲する *passive model* が組織学的研究より提唱された。しかしながら近年の研究では、がん細胞がリンパ管新生を誘導することによりリンパ管を再編成し、がん細胞のリンパ管侵襲を促すといった、*lymphangiogenesis model* が提唱されているが、未だに十分な証拠は示されていない。

2. 研究の目的

1970年代からがんと血管新生との関連についての研究が活発に行われ、現在では血管新生抑制剤が臨床的にも使用されるに至っている。がん細胞が血管内に侵襲するメカニズムに関する研究も進んでおり、例えば、がん細胞から放出される VEGF、MMP1、ANGPTL4 などの分子が血管の透過性を増加させることによりがん細胞が血管内に侵襲しやすくなることが知られている。リンパ管は毛細リンパ管と集合リンパ管の2種類があるが、毛細リンパ管は1層のリンパ管内皮細胞で構成されており、血管とは異なり、基底膜は存在せず、周皮細胞に覆われていない。従って、管外の細胞はリンパ管にアクセスし易いため、がん細胞のリンパ管侵襲機構は血管のそれとは異なることが想定されているが、詳細な機構は明らかとなっていない。研究代表者の研究グループは、マウス腸管にて *de novo* 型に発がんするモデルを作出し、このマウスにて産生されたがん細胞はリンパ指向性に転移することを見出した (Nakai et al., Nat. Commun. 2023)。そこで本研究課題では、このマウスモデルを用いて、がん細胞がリンパ管に侵襲するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) APC^{Min}/RasV12 変異マウスにおける乳糜管の構造変化

研究代表者の研究グループでは、APC 遺伝子がヘテロ接合性に変異した腸管の上皮組織に活性化 Ras 変異をモザイク誘導し、基底膜へとびまん性に浸潤するがん変異細胞を産生するマウスモデルを以前に作出した。基底へと浸潤した変異細胞は絨毛上部の間質内で胞巣を形成し、腫瘍を発生するが、この腫瘍発生部位の周辺には腺腫の成分が全く認められなかったことより、腺腫化を伴わず、正常粘膜より直接的に発がんしたと結論づけた (*de novo* 型発がん)。さらに、*de novo* がんを発症したマウスでは高頻度に腸管膜リンパ節への転移が認められ、興味深いことに、この *de novo* がん細胞は血管ではなく腸管のリンパ管である乳糜管特異的に侵襲することがわかった。これまで行われてきたリンパ行性転移研究のほとんどはがん細胞の移植系であり、真に自然転移能を評価しているとは言い難かった。従って本マウスモデルは、がん細胞が産生され、リンパ管内に侵襲し転移する一連の過程を解析するために非常に有用なモデルとなるため、さらに解析を進めた。

(2) APC^{Min}/RasV12 変異マウスの single cell RNA-seq 解析

正常状態 (タモキシフェン投与前) とがん定着期 (タモキシフェン投与後 28 日) 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する方法を確立した。この手法により腸管細胞を回収した後、高感度 single cell RNA-seq 解析である TAS-seq 法を実施した。これより得られた遺伝子発現情報をもとに、リンパ管内皮細胞を同定し、遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) がん進展に伴う乳糜管の形態変化

APC^{Min}/RasV12 変異が誘引する *de novo* がん細胞がリンパ指向性に転移する要因を明らかにするため、腫瘍の進展に伴って乳糜管がどのように変容するのかを観察した。リンパ管と血

管より構成される脈管構造は3次元的に非常に入り組んだ構造であるため、組織切片による断続的な解析では十分な情報を得るのが難しい。そこで、腸管の whole mount 染色法を立ち上げ、脈管の共焦点画像を3次元構築し、乳糜管の構造的変化を調べた。Ras 変異を誘導して20日、40日、60日後のリンパ管を LYVE1 抗体を用いて免疫染色したところ、腫瘍の拡張に伴って、乳糜管の長さ、幅、体積が経時的に減少

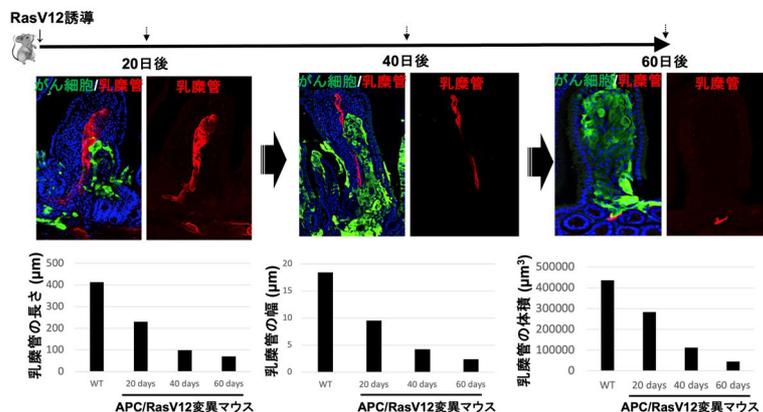


図1. 腫瘍リンパ管退行

APC^{Min}/RasV12 変異マウスにタモキシフェンを投与し RasV12 を発現誘導後、20、40、60 日の乳糜管の長さ、幅、体積を定量した。

することがわかった(図1)。そこで、乳糜管の機能を評価するため、Oil red をマウスに経口投与し、腸管での吸収率を調べた結果、正常部位では絨毛内に吸収されていたのに対し、腫瘍発生部位では表層に蓄積していた。これらの結果から、*de novo* がんの進展に伴って乳糜管は消失することが示され、‘腫瘍リンパ管退行’が生じることが明らかとなった。

(2) *de novo* がん細胞が誘導するリンパ管退行の機序

乳糜管が退行する機序を解明するため、まず細胞死の検討を行った。アポトーシスを cleaved caspase-3 の免疫染色、細胞死全体を TUNEL 染色により評価した結果、がん細胞に近接したリンパ管内皮細胞のほとんどでこれらの細胞死マーカーに陰性であったため、必ずしも細胞死するわけではないことが示唆された。そこで、腫瘍部位に存在するリンパ管内皮細胞を含めた全細胞の変容を網羅的に解析するため、single cell RNA-seq 解析を実施した。がん部位のリンパ管内皮細胞において発現が変動する遺伝子を探索した結果、内皮-間葉転換 (Endothelial-to-Mesenchymal Transition : EndMT) に関わる分子群が有意に変動することを突き止めた。具体的には、Vimentin、Serpine1、Fn1 の発現が増加しており、他方、LYVE1、VE-cadherin、VEGFR3 の発現は低下していた。この結果より、内皮細胞が間葉系細胞に性質転換する可能性が示唆されたため、EndMT マーカーを用いて詳細に解析を行った。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 の免疫染色の結果、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強く発現し、リンパ管内皮細胞では発現が認められないのに対し、腫瘍部位ではがん細胞に隣接したリンパ管内皮細胞で Transgelin が強発現した(図2)。Transgelin と同様に EndMT マーカーである α -SMA で染色した場合でもリンパ管内皮細胞の一部で α -SMA の発現が観察された。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消失した。リンパ管内皮細胞の EndMT 誘導の可能性をさらに検証するため、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。この結果は、APC^{Min}/RasV12 変異が誘引する *de novo* がんでは、リンパ管内皮細胞に EndMT が誘導されることの証左となった。

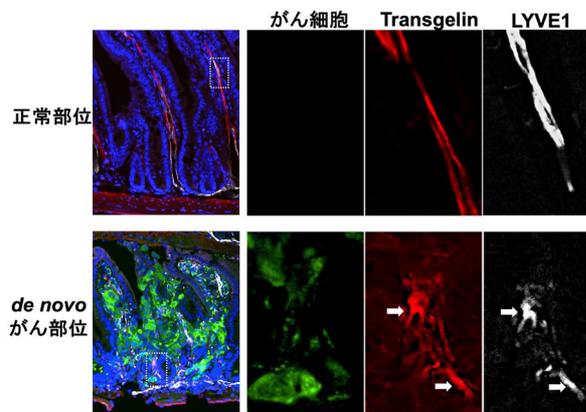


図2. *de novo* がん細胞が誘導する EndMT

APC^{Min}/RasV12 変異マウスの正常部位と *de novo* がん部での Transgelin の免疫染色画像を示す。がん細胞に隣接するリンパ管内皮細胞では Transgelin の発現が増加する(矢印)。

APC^{Min}/RasV12 変異が誘引する *de novo* がんでは、リンパ管内皮細胞に EndMT が誘導されることの証左となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kon, S. and Fujita, Y.	4. 巻 476
2. 論文標題 Cell competition-induced apical elimination of transformed cells, EDAC, orchestrates the cellular homeostasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.03.015	査読の有無 有
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 Nakai, K., Lin, H., Yamano, S., Tanaka, S., Kitamoto, S., Saitoh, H., Sakuma, K., Kurauchi, J., Akter E., Konno, M., Ishibashi, K., Kamata, R., Ohashi, A., Koseki, J., Takahashi, H., Yokoyama, H., Shiraki, Y., Enomoto, A., Abe, S., Hayakawa, Y., Ushiku, T., Mutoh, M., Fujit, Y. and Kon, S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Wnt activation disturbs cell competition and causes diffuse invasion of transformed cells through NF- B-MMP21 pathway.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-42774-6	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 昆 俊亮
2. 発表標題 デノボがん細胞のリンパ管侵襲機構
3. 学会等名 日本リンパ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 昆 俊亮
2. 発表標題 デノボがん細胞のリンパ行性転移機構
3. 学会等名 日本がん転移学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 昆 俊亮
2. 発表標題 がん細胞が誕生したときの生体内反応
3. 学会等名 第53回 フォーラム富山「創薬」(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 昆 俊亮	4. 発行年 2022年
2. 出版社 リンパ学	5. 総ページ数 4
3. 書名 De novoがん細胞のリンパ管侵襲機構 EndoMTとの関連から	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------