

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19001

研究課題名(和文) 転移性乳癌の克服に向けた血管性ニッチの分子機構解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying perivascular niche of breast cancer lung metastasis

研究代表者

本宮 綱記 (HONGU, Tsunaki)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30628920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：二次組織に転移した癌細胞は、「転移ニッチ」と呼ばれる特殊な周囲微小環境と相互作用することにより、転移部位での生存、定着を果たす。本研究はマウス乳癌肺転移モデルを用いて、転移ニッチの分子実体の解明を行った。その結果、肺に転移した乳癌細胞は、肺血管内皮細胞と近接して存在していること、肺血管内皮細胞は乳癌細胞の増殖および癌幹細胞性の維持に寄与していることが明らかとなった。また、肺血管内皮細胞の遺伝子発現解析によって、転移ニッチ分子として、Cthrc1、Cxcl9等を同定した。この結果は、乳癌転移を抑制するための新たなアプローチの開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Disseminated cancer cells functionally interact with their microenvironment, metastatic niche, which supports cancer cell fitness, survival and metastatic colonization at the secondary organ. In this study, I investigated the molecular mechanisms underlying the cross-talk between cancer cells and their microenvironment using mouse breast cancer lung metastasis model. Intriguingly, the cancer cells disseminated in lung closely located with lung microvasculature. Furthermore, in vitro co-culture of cancer cells with lung endothelial cells promotes cancer cell proliferation and stemness maintenance. Gene expression analysis of isolated lung endothelial cells shows the fact that lung endothelial cells are activated by disseminated cancer cells and several secreted proteins such as Cthrc1 and Cxcl9 are up-regulated in endothelial cells during metastasis. This result provide a new insight on the molecular mechanisms of metastatic niche in breast cancer metastasis.

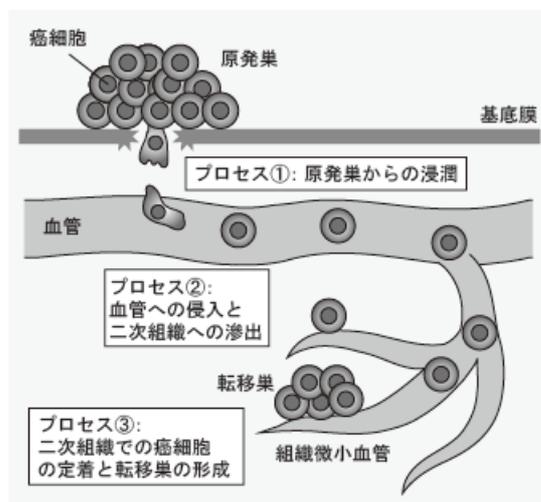
研究分野：癌生物学

キーワード：乳癌 肺転移 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌は、世界中で毎年百万人以上の女性が罹患しており、転移性乳癌によって年間数十万人もの患者が死亡している極めて悪質な疾患である。しかし、その主たる死亡原因である乳癌の転移は、現在基本的に完治させる方法が存在せず、その分子メカニズムの解明および治療法の確立は急務である。乳癌を始めとする癌細胞の血行性転移プロセスは、主に原発巣からの癌細胞の浸潤、血管への侵入および二次組織への滲出、二次組織での癌細胞の定着および転移巣の形成、の3つに大別される(図1)。このうち、プロセスについては、世界中で精力的に研究が進められ、そのメカニズムが徐々に明らかになりつつある。しかし、乳癌が極めて悪質である点の一つとして、この癌は転移進行が非常に早いことが知られており、近年、乳癌と診断された患者の約半数は、すでにプロセスおよびに達していることが解ってきた(Klein C.A., *Nat Rev Cancer*, 2009)。すなわち、臨床的観点から鑑みると、転移性乳癌の治療には、二次組織での癌細胞の定着および転移巣の形成を阻害することが最も重要であると考えられる。しかし現在のところ、このプロセスを制御するメカニズムについては殆ど明らかになっていないのが実状である。

図1. 癌細胞の転移プロセス



(2) 癌研究の大きなブレイクスルーとして、近年、癌幹細胞の存在とその重要性が確立されつつある。癌幹細胞は自己複製能を有し、癌組織を形成する元となり得る。癌幹細胞の重要性は乳癌の転移においても例外ではなく、癌幹細胞マーカーを発現する乳癌細胞は高効率で肺へ定着し、転移巣を形成する(Malanchi I. et al., *Nature*, 2012)。また、肺に転移した乳癌細胞は、周囲の間質組織を幹細胞ニッチとして利用することで自身の幹細胞性を維持し、これにより転移巣の形成

を果たすことが示されている (Malanchi I. et al., *Nature*, 2012; Oskarsson T. et al., *Nat Med*, 2011)。したがって、乳癌転移の後期プロセスである転移巣の形成を抑制するためには、転移組織において癌幹細胞のニッチを破壊し、癌幹細胞性の維持を阻害することが効果的であると考えられる。

(3) 近年の癌幹細胞研究によると、大腸癌や脳腫瘍などの様々な癌・腫瘍において、癌幹細胞は血管に近接して存在しており、「血管性ニッチ」と呼ばれる血管内皮細胞とのクロストークによってその幹細胞性が維持されていることが解ってきた。興味深いことに、肺に転移した乳癌細胞も、血管内皮細胞と近接して存在していることが組織学的に示されており (Ghajar C.M. et al., *Nat Cell Biol*, 2013)、乳癌の肺転移部位においても、血管内皮細胞は癌幹細胞をサポートする重要なニッチ細胞であると推察される。血管内皮細胞が癌幹細胞性の維持に機能していることは、*in vitro*の共培養系によっても再現できるため、血流を介した酸素や栄養素の供給によって癌幹細胞が維持されているのではなく、癌細胞と血管内皮細胞の間で何らかの分子的クロストークが存在することは明白である。これらの知見から、乳癌の肺転移における「血管性ニッチ」の形成メカニズム、および乳癌細胞と血管内皮細胞の細胞間クロストーク機構を解明することで、乳癌転移の後期プロセスを抑制するための有用な薬剤標的を同定することができると考えられ、革新的な抗転移薬の開発に繋がる可能性を有している。

2. 研究の目的

本研究では、肺に転移した乳癌細胞と肺血管内皮細胞との相互作用機構を、トランスクリプトミクスを用いて網羅的に解析し、転移組織における血管性ニッチの実体を明らかにするとともに、転移性乳癌の効果的な薬剤標的の同定を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、マウスを用いた乳癌肺転移モデルを用いて、肺血管内皮細胞と乳癌細胞の相互作用機構を解析した。具体的には、尾微静脈注射により乳癌細胞を移植し、肺転移巣の形成を誘導した。転移巣を有する肺および健常肺より、セルソーターを用いて肺血管内皮細胞を単離し、その遺伝子発現変化をマイクロアレイによって検討した。また、VEGF受容体阻害抗体である DC101 を腹腔内投与し、コントロール郡および投与郡における肺血管内皮細胞の遺伝子変化を同様の方法で検討した。同定した血管性ニッチ候補分子について、そのリコンビナント蛋白質を用いて乳癌細胞スフィア形成実験における効果を検

討し、血管性ニッチ分子としての機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 最初に、肺由来血管内皮細胞が乳癌細胞の幹細胞性の維持・亢進に寄与していることを、悪性度の高い乳癌細胞株 (MDA-MB231 細胞および SUM159 細胞) とヒト肺血管内皮細胞 (HPMEC) の共培養系を用いて、乳癌細胞のスフィア形成実験によって検討した。癌細胞のスフィア形成能は、その幹細胞性に依存するが、HPMEC と共培養した乳癌細胞は、有意にスフィア形成能が亢進した。このことから、乳癌の肺転移において、肺血管内皮細胞は乳癌細胞の幹細胞性に寄与するニッチ細胞として機能し得ることが明らかとなった。さらに、マウスを用いた乳癌肺転移モデルによって、肺に転移した乳癌細胞が肺血管内皮細胞と近接して存在するかどうかを組織学的に検討した。血管外滲出を果した転移性乳癌細胞は、ごく初期の段階 (移植 2 日 ~ 7 日後) では 1 ~ 2 細胞の状態で肺間質に点在している。興味深いことに、このような転移初期の段階から、乳癌細胞は肺血管内皮細胞と隣接して存在する像が得られた。その後、転移のステージが進むにつれて (7 ~ 14 日後)、乳癌細胞は肺血管内皮細胞の近縁において増殖し、小さい転移巣を形成するに至った。乳癌細胞移植後 21 日後には、血管形成が開始され、転移巣サイズの爆発的な増大が観察された。以上のことから、肺血管内皮細胞は転移のごく初期から転移乳癌細胞を支持しており、転移後期には血管形成の開始によってさらなる転移巣の増大に寄与していることが示唆された。

(2) マウス乳癌細胞肺転移モデルを用いて、血管内皮細胞と癌細胞の分子のクロストークをトランスクリプトミクスにより検討した。具体的には、肺への転移能が極めて高い乳癌細胞株 MDA-LM2 細胞をマウス尾静脈に注射し、肺転移を誘導した。その後、異なる転移ステージにおいて肺血管内皮細胞を FACS により単離し、マイクロアレイによってその遺伝子発現変化を解析した。得られた血管内皮細胞の遺伝子セットの主成分分析の結果、転移初期の肺血管内皮細胞はすでに正常状態の肺血管内皮細胞と性質が異なっており、さらに血管新生が起こる転移後期においてその傾向は顕著であった。また、Gene set enrichment 解析の結果、転移の初期において、肺血管内皮細胞ではインターフェロン応答が活発化していた。さらに転移の進行にしたがって、肺血管内皮細胞では細胞増殖系シグナルが著しく亢進していた。これらのシグナル伝達系については今後解析が必要であるが、肺転移した乳癌細胞は、インターフェロン等を含む刺激因子を介して血管内皮細胞を刺激し、その性質を変化させていること

が示された。肺血管内皮細胞で発現変化の見られた遺伝子群のうち、近接細胞とのクロストークが可能な分泌蛋白質に絞って候補因子を絞り込み、転移初期に発現が上昇する 68 個の遺伝子、および転移初期から後期にかけて発現が上昇する 145 個の遺伝子を同定した。そのうち、特に発現上昇の顕著であり、かつ機能的に興味深いものとして、転移初期に血管内皮細胞で発現し、Wnt Non-canonical 経路を促進する *Cthrc1*、および Wnt canonical 経路の阻害因子である *Dkk1* および *Dkk2* を同定した。さらに転移後期には、*C1qa*、*C1qb* などの Wnt canonical 経路促進因子が強く発現していた。また、転移初期から後期にわたって、サイトカインである *Cxcl9*、*Cxcl10*、および *Cxcl13* が顕著に発現亢進しており、反対に *BMP5* の発現が顕著に低下していた。以上のことから、転移巣形成において血管内皮細胞は、少なくとも Wnt シグナル、*Cxcl* サイトカインシグナルを制御することによって癌細胞の転移巣形成に影響を与えている可能性が示唆された。これらの因子が、癌細胞の幹細胞性の維持に関わっているか否かを、癌細胞スフィア実験によって検討したところ、*Cthrc1* および *Cxcl9* はスフィア形成能を顕著に促進した。さらに *BMP5* の添加によって、スフィア形成は有意に減少した。これらのことから、乳癌細胞は肺血管内皮細胞を刺激することで、*Cthrc1*、*Cxcl9* の発現を上昇させ、さらに *BMP5* の発現を減少させることによって、転移部位での癌幹細胞性を亢進させ、転移巣形成を促進することが強く示唆される。今後は *in vivo* におけるこれらの因子の機能阻害が、乳癌の肺転移に与える影響を解析することが大きな課題となる。

(3) 現行の転移性乳癌の治療では、パクリタキセルやカペシタピンなど細胞障害性薬剤を用いた化学治療が主流である。これに加えて、進行性の転移性乳癌後期において転移巣に血管新生が認められるため、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 阻害剤が上記化学療法と併用される。しかし、転移性乳癌における VEGF 阻害剤の治療効果は極めて限定的であり、乳癌患者の無増悪生存期間を僅かに数ヶ月延長するに留まり、最終的な生存期間の延長は認められていない。それゆえ、すでに臨床応用が成されているにも関わらず、転移性乳癌の治療において VEGF シグナルの重要性は未だに議論の下にある。この問題を解決する糸口として、VEGF シグナルが血管性ニッチにどのような影響を与えるかを検討することは有用である。すなわち、VEGF シグナル伝達経路の阻害によって影響を受けない血管性ニッチ分子は、薬剤ターゲットとしてより有用であると考えられ、新たな治療コンセプトとして提案すべきものである。そこで、マウス乳癌肺転移モデルを用いて、VEGFR2 阻害抗体を投与した後、肺血管内皮細胞の性質がどのように変化するのかをマイクロアレイ

により解析した。VEGF シグナルの阻害により、肺血管内皮細胞において VEGF シグナルマーカー遺伝子群の発現は有意に低下しており、VEGF シグナルの阻害が確実に起こっていることが確認された。興味深いことに、本研究で同定した血管性ニッチ候補分子のうちそのほとんどの遺伝子発現は VEGFR2 の阻害によって影響を受けないことが明らかとなった。さらに癌幹細胞性に関与する血管性ニッチ分子として同定した Cthrc1 および Cxcl9 の遺伝子発現においても、VEGF シグナルの阻害によって影響を受けなかった。この結果はなぜ現行の VEGF 阻害剤が転移性乳癌の治療に効果的でないのかを説明する一つの証拠となると考えられ、血管性ニッチ分子を薬剤標的として利用する治療コンセプトを提案するために極めて有用である。すなわち、転移性乳癌において、肺血管内皮細胞は上述の因子等を分泌することで転移乳癌細胞の幹細胞性の維持に寄与しており、この機能は VEGF 阻害によって抑制されないため、VEGF 阻害剤は血管の機能を阻害するには不十分であると考えられる。

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)

本宮綱記、金保安則「低分子量Gタンパク質Arf6の個体における多彩な生理機能」生化学(日本生化学会)Vol.88, No.1, 2016. 査読無
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880078

T. Hongu, Y. Yamauchi, Y. Funakoshi, N. Katagiri, N. Ohbayashi, Y. Kanaho. Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: Tumor angiogenesis and metastasis. *Small GTPases*, 7 (2): 47-53, 2016. 査読有
doi: 10.1080/21541248.2016.1154640.

*Y. Miura, *T. Hongu, Y. Yamauchi, Y. Funakoshi, N. Katagiri, N. Ohbayashi, Y. Kanaho. ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons. *Biochem. J.*, 473 (17): 2591-2602, 2016. *These authors equally contributed to this work. 査読有
doi: 10.1042/BCJ20160183.

H. Mukai, A. Muramatsu, R. Mashud, K. Kubouchi, S. Tsujimoto, T. Hongu, Y. Kanaho, M. Tsubaki, S. Nishida, G. Shioi,

S. Danno, M. Mehruba, R. Satoh, R. Sugiura. PKN3 is the major regulator of angiogenesis and tumor metastasis in mice. *Sci. Rep.*, 6: 18979, 2016. 査読有
doi: 10.1038/srep18979.

本宮綱記、金保安則「新たな抗がん剤創薬標的としての低分子量G蛋白質Arf6」ファルマシア(日本薬学会)Vol.51, No.4, 2015. 査読無
<https://www.bioweb.ne.jp/content/faruma/faruma1504.html>

R. Okada, y. Yamauchi, T. Hongu, Y. Funakoshi, N. Ohbayashi, H. Hasegawa, Y. Kanaho. Activation of the small G protein Arf6 by dynamin2 through guanine nucleotide exchange factors in endocytosis. *Sci. Rep.*, 5: 14919, 2015 査読有
doi: 10.1038/srep14919.

T. Hongu, Y. Funakoshi, S. Fukuhara, T. Suzuki, S. Sakimoto, N. Takakura, M. Ema, S. Takahashi, S. Itoh, M. Kato, H. Hasegawa, N. Mochizuki, Y. Kanaho. Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial beta1 integrin recycling. *Nat. Commun.*, 6: 7925, 2015. 査読有
doi: 10.1038/ncomms8925.

S. Teng, D. Stegner, Q. Chen, T. Hongu, H. Hasegawa, L. Chen, Y. Kanaho, B. Nieswandt, M. A. Frohman, P. Huang. Phospholipase D1 facilitates second-phase myoblast fusion and skeletal muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell*, 26 (3): 506-517, 2015. 査読有
doi: 10.1091/mbc.E14-03-0802.

[図書](計 1 件)

本宮綱記、金保安則「ホスホリパーゼD」モデル動物の作製と利用 - 脂質代謝異常と関連疾患(株式会社エル・アイ・シー)第6章、第2節、2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

本宮 綱記 (HONGU, Tsunaki)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 30628920