

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20818

研究課題名（和文）肺における血管性転移ニッチ因子群の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of perivascular metastatic niche factors in lung

研究代表者

本宮 綱記（Hongu, Tsunaki）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：30628920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺血管内皮細胞から分泌される分子のうち、抗がん剤抵抗性に寄与する分子を探索した結果、SERPINE1を同定した。実際、リコンビナントSERPINE1を用いて乳がん細胞を刺激することで、パクリタキセルに対する抵抗性が向上した。さらに、転移巣において肺血管内皮細胞でSERPINE1が発現するメカニズムについても解析を進めた。その結果、転移が起こった際に、血管透過性が亢進し、それに伴って肺血管内皮細胞でYAP-TEADが活性化されることによってSERPINE1の発現が上昇することが示された。以上、SERPINE1を阻害することで、乳がん肺転移における抗がん剤抵抗性を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性乳癌は、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、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。特に、進行した乳がん転移においては、抗がん剤に対する抵抗性が強く、効果的に転移を阻害する方法論が求められている。本研究では、乳がんの肺転移が起こった際に、肺血管内皮細胞からSERPINE1が分泌され、抗がん剤抵抗性に寄与することを明らかにした。SERPINE1は転移性乳癌の治療における効果的な薬剤標的となり得る。

研究成果の概要（英文）：I identified SERPINE1 as a secretion molecule which provide from lung endothelial cells during metastatic progression of breast cancer in lung. SERPINE1 promoted the resistance to chemotherapy reagent, paclitaxel, in breast cancer cells. Furthermore, the regulation mechanism of SERPINE1 expression was analyzed using lung endothelial cells. As a result, it was identified that YAP-TEAD activity is up-regulated in lung endothelial cells associated with metastasis and regulates SERPINE1 expression during metastasis. Thus, SERPINE1 inhibition may suppress chemotherapy resistance of breast cancer metastasis in lung.

研究分野：腫瘍学

キーワード：転移 乳がん 腫瘍微小環境 血管ニッチ

### 1. 研究開始当初の背景

転移性乳癌は、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、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転移は、原発巣からの癌細胞の浸潤、血管・リンパ管への侵入、二次組織への浸出、二次組織での癌細胞の定着および転移巣の形成など、多段階から成る連続的なプロセスを経る。このうち原発巣からの癌細胞の浸潤プロセスについては、1990年代より培養細胞を用いた解析が精力的に進められ、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とされる所以の一つは、転移進行が非常に早期から起こるという点であり、乳癌と診断された患者の約20%は、すでにリンパ節または遠隔組織に転移が認められる。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、転移の最終プロセスである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重要であると考えられる。しかし、二次組織に到着した1つの癌細胞が、如何にその場で定着・生存し、最終的に転移巣を形成するに至るかについては、未だ知見が乏しいのが現状である。

癌細胞の挙動は、その周囲微小環境(ニッチ)とのクロストークに大きく依存する。これまでに、マウス肺転移モデルを用いた解析から、肺に転移した乳癌細胞は、転移後の極初期の段階から、ほぼ100%の割合で肺血管内皮細胞と密着して存在することを示している。さらに、肺血管内皮細胞と乳癌細胞を *in vitro* で共培養することにより、乳癌細胞の生存、増殖、癌幹細胞性および抗癌剤耐性が著しく向上することを突き止めている。これらの事実から、肺血管内皮細胞は、肺に転移した乳癌細胞の定着・生存や転移巣形成をサポートする極めて重要なニッチ細胞であることが強く推察されるが、現在のところその分子実体は殆ど解明されていない。このような背景のもと、乳癌肺転移における「血管性ニッチ」の機能を解明することで、新規かつ効果的な転移治療法の開発に繋がるもの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、乳癌肺転移をサポートする「血管性ニッチ」の分子実体を解明し、転移の最終プロセスである転移巣形成を阻害するための革新的な創薬標的を提案することを目指す。これまでに、乳癌転移を有するマウス肺の肺血管内皮細胞を用いてその網羅的遺伝子発現解析を行い、その結果、乳癌転移後の肺血管内皮細胞では、分泌蛋白質をコードする遺伝子群の発現が著しく上昇することを見出している。本研究では、これら分泌蛋白質群を血管性ニッチ候補因子として網羅的に解析し、乳癌肺転移を司る血管性ニッチの分子機構を解明することを目的とした。

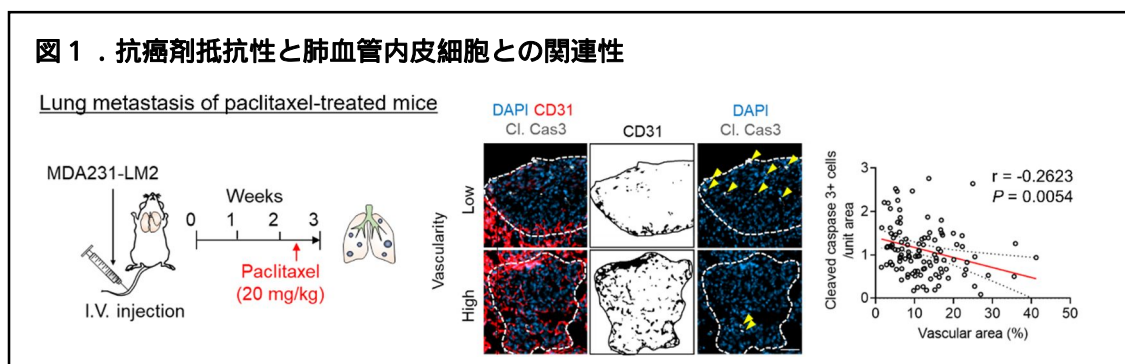
### 3. 研究の方法

これまでに、正常マウス肺および乳癌転移を有するマウス肺より肺血管内皮細胞を単離し、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行っている。またその結果として、乳癌転移後の肺血管内皮細胞では、分泌蛋白質をコードする遺伝子群の顕著な発現上昇が観察され、9遺伝子の発現が著しく上昇することを見出している。そこで本研究では、これら9遺伝子を血管性ニッチの候補分子として解析を行った。特に、転移部位における抗癌剤抵抗性に関与する分子を探索し、その機能解析および発現誘導メカニズムの同定を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗癌剤抵抗性と血管性ニッチの関連性についての検討

乳癌細胞 MDA-LM2 をマウス尾静脈に注射し、乳癌肺転移を誘導した。その後、パクリタキセルをマウスに投与し、肺転移における乳癌細胞のアポトーシスを誘導した(図1)。肺転移巣のアポトーシス細胞数と、血管内皮細胞の侵入の相関を解析したところ、血管内皮細胞の多く存在する



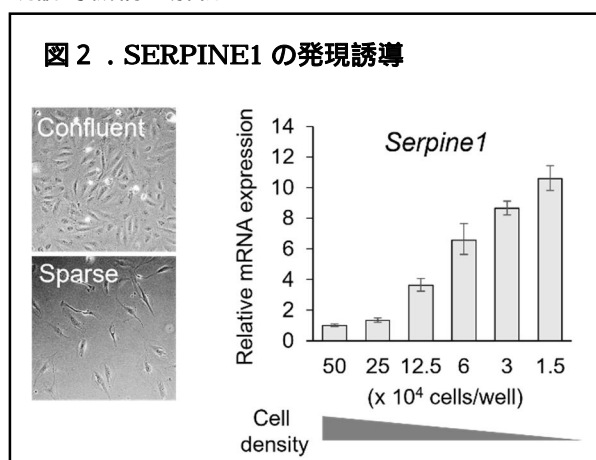
転移巣においては、パクリタキセル投与により誘導された乳癌細胞のアポトーシスが抑制されていた。このことは、肺血管内皮細胞が、転移巣における乳癌細胞の抗癌剤抵抗性を誘導していると考えられた。実際、肺血管内皮細胞の培養上清を用いて、in vitroで乳癌細胞を培養すると、パクリタキセル処理によるアポトーシスの誘導が抑制された。これらの結果から、肺血管内皮細胞は、何らかの液性因子を分泌することで、乳癌細胞の抗癌剤抵抗性を向上させることが示された。

### (2)血管性ニッチ因子 SERPINE1 と抗癌剤抵抗性との関連についての検討

これまでに、乳癌転移後の肺血管内皮細胞では、分泌蛋白質をコードする遺伝子群の顕著な発現上昇が観察され、そのうち、9 遺伝子の発現は著しく上昇することを見出している。パブリックデータベースより、これらの 9 遺伝子の発現と乳癌患者における抗癌剤抵抗性との関連を検討したところ、9 遺伝子のうち SERPINE1 だけが抗癌剤抵抗性の腫瘍において高発現することが明らかとなった。そこで、リコンビナント SERPINE1 を作成し、乳癌細胞を刺激したところ、パクリタキセルに対する抵抗性が向上した。抗癌剤抵抗性と癌幹細胞性はリンクすることが知られている。そこで、リコンビナント SERPINE1 を培地に添加し、癌幹細胞性の指標となるスフィア形成能を測定した。その結果、リコンビナント SERPINE1 添加群においては、スフィア形成能が有意に上昇することが示された。これらのことから、SERPINE1 は癌幹細胞性と抗癌剤抵抗性の両方に機能することが明らかとなった。

### (3)肺血管内皮細胞における SERPINE1 の発現誘導機構の解析

肺転移が引き起こされた際に、肺血管内皮細胞で SERPINE1 の発現は有意に上昇する。しかし、どのように SERPINE1 の発現が制御されるのかについては明らかとなっていない。そこで、その分子メカニズムについての解析を進めた。肺転移が起こった際の血管内皮細胞では、血管透過性が亢進する。このことを確かめるために、肺転移を有するマウスの尾静脈よりエバンスブルーを投与し、肺間質への漏出を定量したところ、血管透過性の亢進が確認された。血管透過性は、血管内皮細胞同士の細胞-細胞間接着が弱まることにより引き起こされる。そこで、培養ディッシュ上でコンフルエントとなる



ように培養した肺血管内皮細胞と、比較的スペースの存在する状態で培養した肺血管内皮細胞の遺伝子発現を検討したところ、SERPINE1 の発現は細胞-細胞間接着が弱い状態で誘導されることが示された。細胞-細胞間接着の喪失によって誘導されるシグナル伝達として、YAP-TEAD の活性化が知られている。そこで、肺血管内皮細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、肺転移が起こった際に、肺血管内皮細胞で YAP ターゲット遺伝子の発現が上昇することが確かめられた。実際に、SERPINE1 の発現が、YAP-TEAD 依存的に誘導されるかどうか、YAP-TEAD の相互作用を阻害する薬剤 Vertepofin を用いて検討した。その結果、Vertepofin で処理した血管内皮細胞では、SERPINE1 の発現が有意に抑制された。以上のことから、乳癌肺転移が起こった際に、肺血管内皮細胞の血管透過性が亢進することによって YAP-TEAD の活性が向上し、SERPINE1 の発現が上昇すると考えられる。

以上のことから、乳癌転移部位における抗癌剤抵抗性のメカニズムとして、肺血管内皮細胞から分泌される SERPINE1 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、SERPINE1 は血管内皮細胞の YAP-TEAD 活性に依存して発現することも示された。この結果から、SERPINE1 の阻害、あるいは SERPINE1 が癌細胞に誘導するシグナル伝達系を阻害することで、乳癌肺転移における抗癌剤抵抗性を抑制できる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsunaki Hongu, Maren Pein, Jacob Insua-Rodriguez, Ewgenija Gutjahr, Greta Mattavelli, Jasmin Meier, Kristin Decker, Arnaud Descot, Matthias Bozza, Richard Harbottle, Andreas Trumpp, Hans-Peter Sinn, Angela Riedel, Thordur Oskarsson	4. 巻 4
2. 論文標題 Perivascular tenascin C triggers sequential activation of macrophages and endothelial cells to generate a pro-metastatic vascular niche in the lungs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cancer	6. 最初と最後の頁 486-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43018-022-00353-6	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 該当する

1. 著者名 Wang Yuming, Hongu Tsunaki, Nishimura Tatsunori, Takeuchi Yasuto, Takano Hiroshi, Daikoku Takiko, Yao Ryoji, Gotoh Noriko	4. 巻 674
2. 論文標題 Mitochondrial one-carbon metabolic enzyme MTHFD2 facilitates mammary gland development during pregnancy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 183 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.06.074	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 Li, Nishimura, Takeuchi, Hongu, Wang, Shiokawa, Wang, Hirose, Sasahara, Yano M, Ishikawa, Inokuchi, Ota, Tanabe, Tada K, Akiyama, Cheng, Liu, Yamashita, Sugano S, Uchida, Chiba, Asahara, Nakagawa, Sato, Miyagi, Shimamura, Nagai, Kanai, Katoh, Nomura, Nakato, Suzuki, Tojo, Voon, Ogawa, Okamoto, Foukakis, Gotoh	4. 巻 133
2. 論文標題 FXD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI166666	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

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本宮綱記、後藤典子、Thordur Oskarsson
2. 発表標題 乳癌肺転移における 血管性ニッチの役割とその制御
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2022年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本宮綱記、後藤典子、Thordur Oskarsson
2. 発表標題 TNC triggers sequential activation of macrophages and endothelial cells to generate a metastatic vascular niche in lung
3. 学会等名 第81回 日本癌学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本宮綱記、楠木啓主、西村建徳、竹内康人、後藤典子
2. 発表標題 乳がん細胞はミトコンドリア内1炭素代謝酵素MTHFD1Lを用いて肺転移を起こす
3. 学会等名 第9回 がん代謝研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本宮 綱記、Pein Maren、Insua-Rodriguez Jacob、Meier Jasmin、Decker Kristin、Descot Arnaud、Trumpp Andreas、Riedel Angela、後藤 典子、Oskarsson Thordur
2. 発表標題 テネイシンCはマクロファージと肺血管内皮細胞の連続的な活性化を介して肺血管性転移ニッチ形成を誘導する
3. 学会等名 第32回 日本がん転移学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本宮 綱記、Pein Maren、Insua-Rodriguez Jacob、Meier Jasmin、Decker Kristin、Descot Arnaud、Trumpp Andreas、Riedel Angela、後藤 典子、Oskarsson Thordur
2. 発表標題 乳癌肺転移における血管性ニッチの役割とその制御
3. 学会等名 第143年会 日本薬学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楠木啓主、本宮綱記、西村建徳、竹内康人、後藤典子
2. 発表標題 乳がん細胞はミトコンドリア内1炭素代謝酵素MTHFD1Lを用いて肺転移を起こす
3. 学会等名 第27回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本宮綱記、後藤典子、Oskarsson Thordur
2. 発表標題 乳がん転移ニッチにおける アンジオクラインの役割とその制御
3. 学会等名 第13回 シグナル伝達ネットワーク研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本宮綱記、後藤典子、Oskarsson Thordur
2. 発表標題 転移ニッチにおける アンジオクラインの役割とその制御
3. 学会等名 第7回 転移シグナル研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本宮綱記、楠木啓主、Yuming Wang、西村建徳、竹内康人、後藤典子
2. 発表標題 乳がん細胞はミトコンドリア内1炭素代謝酵素MTHFD1Lを用いて肺転移を起こす
3. 学会等名 第33回 日本サイトメトリー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本宮綱記、楠木啓主、西村建徳、後藤典子
2. 発表標題 乳がん幹細胞群における1細胞ゲノム変異解析
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 本宮綱記、後藤典子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 2
3. 書名 がんゲノムベディア	

〔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		
米国	Moffit Cancer Center		