

内皮間葉転換を介したがん細胞のリンパ管侵襲機構

東京理科大学 生命医科学研究所
昆 俊亮

1. 研究の背景及び目的

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遠隔転移するため、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などが上市されている。一方、がん細胞のリンパ行性転移の分子機構に関する情報は少なく、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。研究代表者のグループでは、APC 遺伝子の変異により Wnt シグナルが活性化すると細胞競合の機能が変容し、活性化 Ras 変異細胞が基底膜へとびまん性に浸潤し、*de novo* 型に発がんすることを最近報告した¹⁾。このマウスの解析をさらに進めた結果、がん細胞は粘膜筋板を穿破し、リンパ行性特異的に転移することがわかった。そこで、がん細胞が産生されてから腫瘍形成に至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を見出した。そこで、腫瘍部位で生じる性状変化を

解析するために scRNA-seq 解析を行なった結果、内皮-間葉転換 (EndMT: Endothelial-to-Mesenchymal Transition) のマーカー分子の発現が顕著に変化することを突き止めた。実際に、EndMT マーカーの免疫染色を行った結果、がん細胞に近接するリンパ管内皮細胞にてその発現が認められたことから、本マウスで産生されるがん細胞は、リンパ管内皮細胞に EndMT を誘導することの傍証となった(図1)。そこで本研究では、EndMT を司る分子実体を同定することを目的とした。

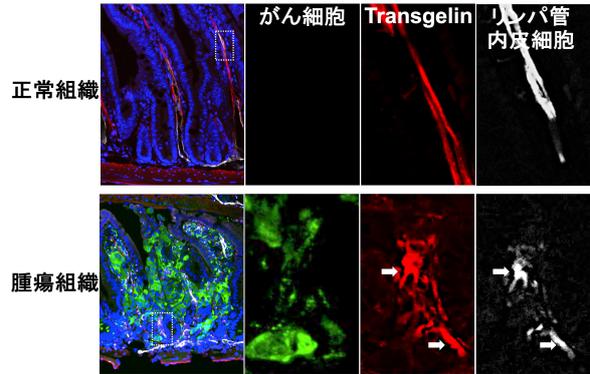


図1. リンパ管内皮細胞の EndMT *de novo* 発がんしたマウスのリンパ管内皮細胞では EndMT マーカーの Transgelin が発現する(矢印)。

2. 研究方法

EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition) に比べて、EndMT を惹起する分子論的メカニズムはよくわかっていない。そこで、EndMT を司る分子機構を明らかにするため、正常マウスと APC、Ras の二重変異により *de novo* 型に発がんしたマウスの腸管細胞を回収し、scRNA-seq 実験を行なったデータより、CellChat 解析を実施した。CellChat 解析では、各細胞群における主要なシグナル伝達入力と出力を予測し、これらの細胞群とシグナルがネットワーク分析とパターン認識アプローチを用いて機能的にどのように強調するかを予測するプログラムであり、異なる細胞間における分子コミュニケーションを推定する方法である。この解析結果より同定した分子ネットワークと EndMT 誘導との関連を調べるため、まずヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (Human Dermal Lymphatic Endothelial cells: HDLEC 細胞) を Matrigel 上で培養し、チューブ状構造を形成した条件にてリコンビナントタンパクを添加し、構造変化を観察した。さらに、がん細胞によるリンパ管内

皮細胞の EndMT 誘導を定量的に評価するために、*de novo* 発がんした APC/Ras 変異マウスの腫瘍組織より単離培養し、株化したがん細胞株(Lymphatic Metastasis-Prone *De novo* Cancer cells : LMPDC 細胞)と恒常的に tdTomato を発現し、かつ EndMT マーカーである α -SMA のプロモーターの下流で eGFP を発現する細胞株、すなわち EndMT が誘導されると eGFP 輝度が増加する細胞株(Endothelial-Mesenchymal Transition Reporter Cells : EMREC 細胞)との共培養系を立ち上げた。そして、上記 CellChat 解析にて見出した分子カスケードの EndMT 誘導における役割を評価するために、各種阻害剤を用いて EndMT への影響を検討した。

3. 研究結果

1. CellChat 解析による EndMT を制御する候補分子の探索

まず初めに、*de novo* 発がんした APC/Ras 二重変異マウスの腫瘍組織におけるがん細胞とリンパ管内皮細胞との間でどのような分子シグナルのコミュニケーションが活性化するかを探索した。本マウスでは、血管内皮細胞はリンパ管内皮細胞に比して EndMT が誘導されにくいことがこれまでにわかっていたため、比較対象細胞として血管内皮細胞を用いた。そして、血管内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞特異的にがん細胞と affinity の高い分子シグナルを CellChat 解析により探索した結果、GDF15 シグナル経路を同定した。さらに具体的な実行分子を調べた結果、がん細胞特異的に強発現する GDF15 とリンパ管内皮細胞の TGF- β 受容体 2 との間で強い相互作用が認められた(図 2)。

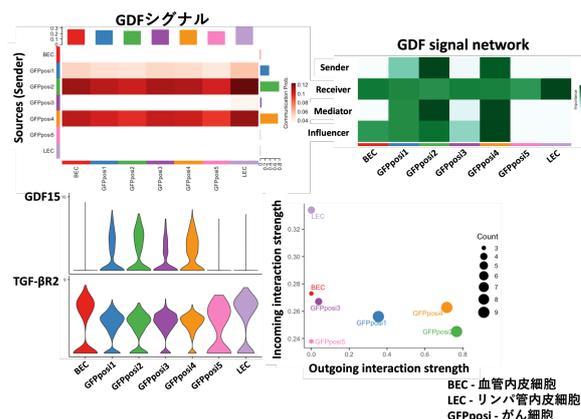


図 2. CellChat 解析の結果
de novo 発がんしたマウスのがん細胞(GFPpos1 細胞)とリンパ管内皮細胞(LEC)、血管内皮細胞(BEC)との CellChat 解析の結果を示す。がん細胞は Sender(リガンド産生細胞)として GDF15 を、LEC は TGFBR2 を介して Receiver(受け手細胞)として相互作用する。

2. HDLEC 細胞のチューブ形成に及ぼす GDF15 タンパクの効果

上記実験結果 1. より、がん細胞がリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導する候補遺伝子として GDF15 を同定した。続いて、GDF15 が実際にリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導するかどうかを検討するため、HDLEC 細胞を用いた tubulation assay を行なった。Matrigel 上で HDLEC 細胞を培養すると、管構造を形成し、チューブ化する。そこで、この培養条件下で TGF- β 1 もしくは GDF15 のリコンビナントプロテインを添加し、チューブ形成能に与える影響を検討した。その結果、内皮細胞に EndMT を誘導することが知られている TGF- β 1 を添加すると、HDLEC 細胞に EndMT が誘導され、管構造が破綻した(図 3)。また、GDF15 を添加した場合でも TGF- β 1 と同様の効果が認められたため、GDF15 は、EndMT を誘導する因子であることが示唆された(図 3)。

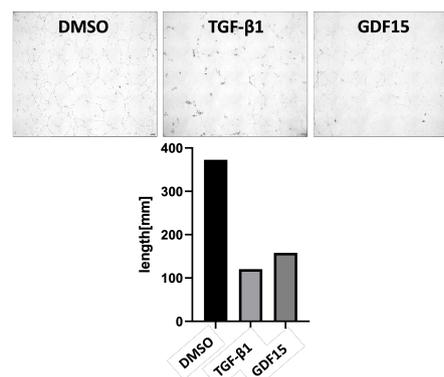


図 3. Tubulation assay の結果
HDLEC 細胞を Matrigel 上でチューブ化させ、TGF- β 1 もしくは GDF15 を添加した際の総管構造の長さを示す。

3. EMREC 細胞の EndMT 誘導における GDF15 の機能

GDF15 がリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導するかをさらに検討するため、EndMT を可視化、評価できる培養細胞系の構築に取り組むために、EndMT 誘導を定量化できるレポーター細胞として樹立された EMREC 細胞を用いた²⁾。EMREC 細胞は、tdTomato を恒常的に発現し、さらに EndMT マーカーである α -SMA のプロモーターの下流で eGFP を発現する。従って、tdTomato の蛍光輝度をインターナルコントロールとし、GFP の輝度を指標に EndMT の誘導を評価できる。そこで、*de novo* 発がんした APC/Ras 変異マウスの腫瘍組織より単離培養し、株化したがん細胞株である LMPDC 細胞と EMREC 細胞を共培養したところ、EMREC 細胞の単独培養に比べて、共培養時に eGFP/tdTomato の値が有意に増加した(図 4)。この結果より、LMPDC 細胞は EMREC 細胞に EndMT を誘導することが示され、がん細胞がリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導する培養細胞系の構築に成功した。続いて、GDF15 を阻害した際の EndMT の誘導率を評価するために、抗 GDF15 抗体である Poncegromab を添加したところ、eGFP/tdTomato の値が顕著に低下した(図 4)。これらの結果より、LMPDC 細胞が EMREC 細胞に EndMT を誘導するために GDF15 が必要であることを示す傍証が得られた。

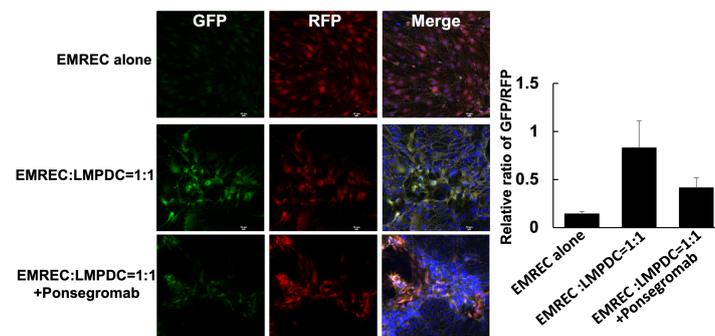


図 4. GDF15 阻害剤が EndMT に与える影響
EndMT レポーター細胞の EMREC 細胞と LMPDC 細胞を共培養、さらに GDF15 阻害剤(Poncegromab)を添加した時の EMREC 細胞の GFP/RFP 値を示す。

4. 考察

本研究成果より、GDF15 を分泌するがん細胞はリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導し、リンパ管構造が不安定化させることにより管内に侵襲することが示唆された。がん細胞がリンパ管内に侵襲する機序を解明することは腫瘍生物学において重要な課題の一つであるが、その詳細なメカニズムは未だによくわかっていない。これまでに行われた組織学的研究の成果より、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、がん細胞が管内へ侵襲することが示唆されているが、実験的に証明するに至っていない(*passive model*)。また、最近では *lymphangiogenesis model* が趨勢となりつつあるが、本研究結果はこれらの既存モデルとは異なり、APC/Ras 変異性の *de novo* がん細胞は、近接するリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導することを提唱するものであり、リンパ管侵襲の新しいモデルとなり得る。また、本研究成果より、GDF15 がリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導することを見出した。将来的には、GDF15 を基軸としたリンパ管侵襲を標的とした新たな制がん法の確立に取り組んでいきたい。

5. 謝辞

公益財団法人アステラス病態代謝研究会からの御支援がなければ本研究を進めることができませんでした。この場を借りまして厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1. 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., Fujita, Y. and 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
2. Takahashi, K., Kobayashi, M., Katsumata, H., Tokizaki, S., Anzai, T., Ikeda, Y., Alcaide, D., Maeda, K., Ishihara, M., Tahara, K., Kubota, Y., Itoh, F., Park, J., Takahashi, K., Matsunaga, Y., Yoshimatsu, Y., Podyma-Inoue, K. and Watabe, T. CD40 is expressed in the subsets of endothelial cells undergoing partial endothelial-mesenchymal transition in tumor microenvironment. **Cancer Science**, 115, 490-506, 2023