

# 乳癌極小転移におけるニッチ因子の同定と機能解析

金沢大学がん進展制御研究所 分子病態研究分野  
本宮 綱記

## 背景

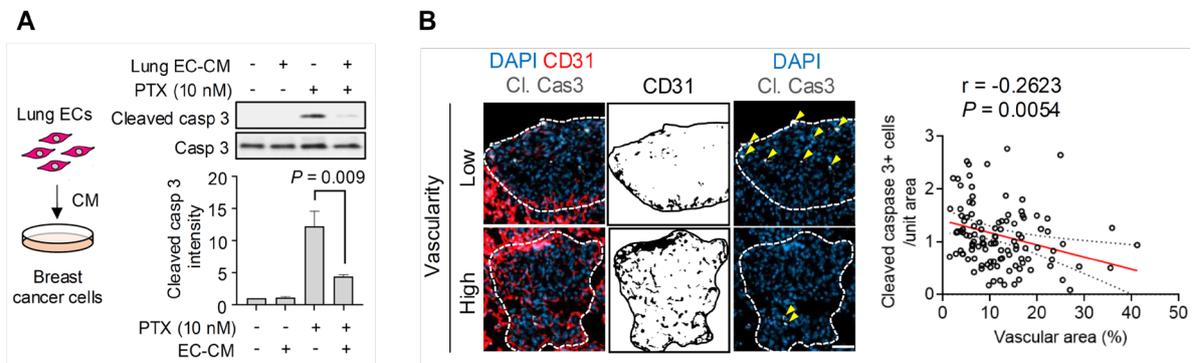
転移性乳がんは、年間数十万人もの患者が死亡している極めて悪質な疾患であり、その効果的治療法の確立が強く求められている。乳がんが悪質であるとされる所以の一つは、この転移進行が非常に早期に起こるという点である(Klein et al., *Nat Rev Cancer*, 2009)。乳がん診断時に、他組織への明らかな転移が認められない場合においても、検査では検出できない「見えざる転移」が既に存在し、原発巣摘出後数カ月から数年をかけて転移がんとして再発する。すでに播種された転移がん細胞を仕留めるために、原発巣摘出後に抗がん剤を全身投与するアジュバント療法が臨床的に用いられている。しかし、転移初期のがん細胞は細胞分裂活性が低く保たれており (Lawson et al., *Nature*, 2015)、それゆえ抗がん剤の効果は極めて限定的である。現在のところ、転移を完全に駆逐する効果的な治療法は存在しない。転移がん細胞が如何にその場で定着・生存しているのかを解明することで、「見えざる転移」を確実にターゲットとする新規治療法の開発に繋がると考えられる。

がん細胞の挙動は、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。興味深いことに、肺に転移した乳がん細胞は、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 (Hongu et al., *Nature Cancer*, 2022)。また、乳がんは肺の他に肝臓や骨、脳に転移するがんであるが、これらの組織に転移した乳がん細胞も同様に、高効率で各組織血管内皮細胞と密な接着を形成する。さらに、肺血管内皮細胞と乳がん細胞を*in vitro*で共培養することにより、乳がん細胞の抗がん剤抵抗性が著しく向上する。これらの事実から、肺血管内皮細胞は、転移がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導する重要なニッチ細胞であると強く推察される。すなわち、転移先で形成される血管性ニッチを阻害することができれば、転移がんを効果的に排除するための新規治療法の開発に繋がると考えられる。しかし現在のところ、組織血管内皮細胞がどのように転移がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導するのかは明らかとなっていない。そこで本研究では、乳がん肺転移をモデルとして、肺血管内皮細胞が誘導する抗がん剤抵抗性の分子メカニズムを明らかにした。

## 結果

最初に、肺血管内皮細胞が乳がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導するか否かを、肺血管内皮細胞の培養上清 (EC-CM) を用いて検討した。その結果、EC-CMで処理した乳がん細胞は、抗がん剤パクリタキセルによって誘導されるアポトーシスが有意に抑制されることが示された (図1. A)。さらに、マウス乳がん肺転移モデルを用いて、肺転移部位における肺血管内皮細胞と転移乳がんの抗がん剤抵抗性の関連性

図 1. 肺血管内皮細胞は乳がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導する



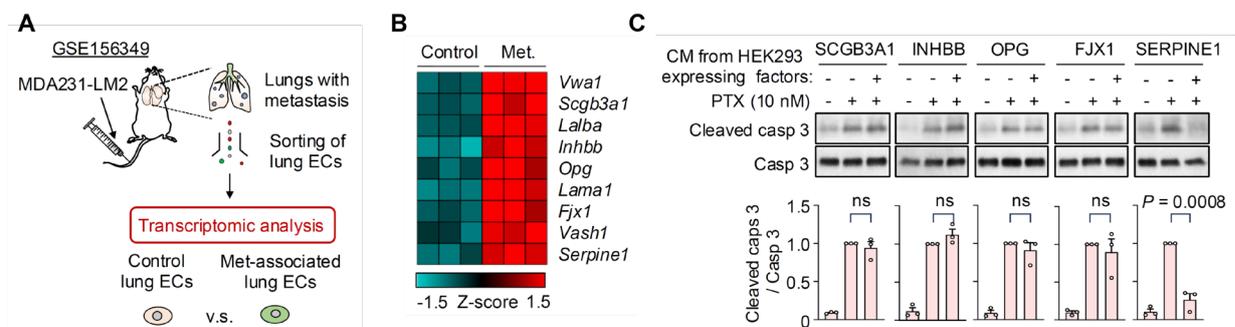
(A) 乳がん細胞の抗がん剤抵抗性に対する肺血管内皮細胞の関与。乳がん細胞 (MDA-LM2 細胞) を、抗がん剤パクリタキセル (PTX) で処理した際にアポトーシスが誘導されるが、肺血管内皮細胞の培養上清を加えると抗がん剤抵抗性が誘導される。

(B) 肺転移巣における血管内皮細胞の侵入と抗がん剤抵抗性との相関。乳がん肺転移を有するマウスにパクリタキセル (PTX) を投与後、肺転移部位におけるアポトーシスを観察した。血管内皮細胞が多く侵入する転移巣では、抗がん剤誘導性のアポトーシスが抑制される。

について検討した。マウスにパクリタキセルを投与し、肺でのがん細胞のアポトーシスを染色したところ、血管密度の低い転移巣と比較して血管密度の高い転移巣では、パクリタキセル誘導性のアポトーシスが抑制されることが明らかとなった（図1. B）。これらのことから、肺血管内皮細胞は、乳がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導するニッチ細胞として機能し得ることが示された。

図1.Aの結果より、肺血管内皮細胞の培養上清を用いることで乳がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導できることから、その仲介因子は分泌蛋白質であることが予想された。そこで、血管内皮細胞から分泌され、抗がん剤抵抗性を誘導する因子の同定を進めた。正常マウスの肺および転移を有するマウスの肺から、肺血管内皮細胞を単離し、その遺伝子発現を比較した（図2. A）。転移肺の血管内皮細胞で発現上昇する遺伝子群のうち、特に分泌蛋白質をコードする遺伝子に着目して解析を進めた。その結果、乳がん肺転移により血管内皮細胞で発現上昇する分泌因子、計9因子を同定した（図2. B）。これらの候補因子が、実際に乳がんの抗がん剤抵抗性に関与するかどうかを、乳がん患者遺伝子発現データ（public data）を用いて検討した。乳がん患者の化学療法に対する感受性と9つの候補遺伝子の発現との関連を調べたところ、候補遺伝子のうちSERPINE1だけが有意に化学療法抵抗性と相関した。そこで、培養乳がん細胞をSERPINE1で処理したところ、パクリタキセル誘導性のアポトーシスが有意に抑制されることが示された（図2. C）。一方、その他の候補遺伝子（SCGB3A1、INHBB、OPGおよびFJX1）は、乳がん細胞のパクリタキセル抵抗性には関与しなかった。以上のことから、乳がん肺転移によって、肺の血管内皮細胞でSERPINE1の発現が上昇し、がん細胞を刺激することで、転移がん細胞の抗がん剤抵抗性が誘導されると考えられる。

図2. SERPINE1は転移に伴って肺血管内皮細胞で発現上昇し、乳がん細胞の抗がん剤抵抗性を誘導する



(A) 肺血管内皮細胞の単離と遺伝子発現解析。正常のマウス肺および転移を有するマウス肺から、肺血管内皮細胞を Cell sorting により単離し、その遺伝子発現の変化を解析した。

(B) 肺血管内皮細胞から産生される血管性ニッチ因子候補遺伝子。転移を有する肺の血管内皮細胞で有意に発現上昇する遺伝子群のうち、特に分泌蛋白質に焦点をあてて解析を行った。

(C) SERPINE1 による乳がん細胞の抗がん剤抵抗性の誘導。血管性ニッチ候補因子を、HEK293T 細胞に発現させ、その培養上清を用いて抗がん剤抵抗性への関与を検討した。SERPINE1 を含む培養上清は、パクリタキセル誘導性の乳がん細胞のアポトーシスを抑制した。

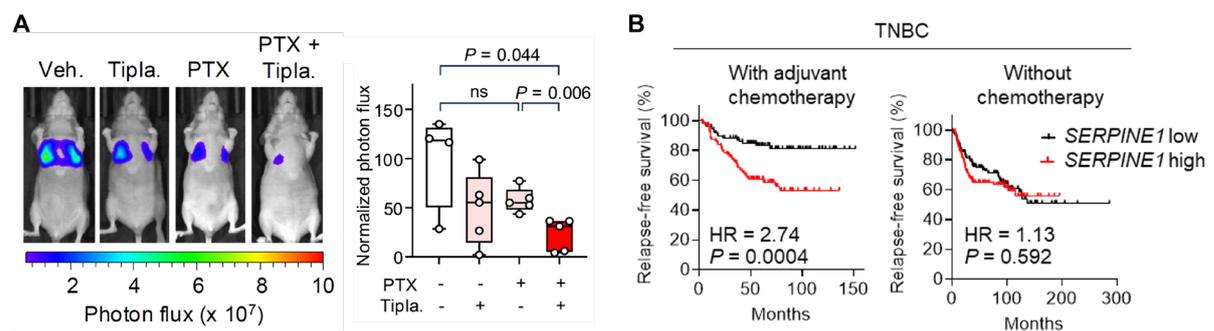
SERPINE1 (serine protease inhibitor family E member 1) は、プラスミノゲン活性化因子を阻害することによって、血栓線溶系に関与することが知られている。プラスミノゲン活性化因子は、プラスミンを活性化し、血栓成分であるフィブリンの分解を誘導することで、血栓を溶かす機能を有する。そのため、SERPINE1は血栓形成と線溶のバランスをとる分子として古くから機能解析が為されてきた。一方、近年ではSERPINE1は線溶系以外にも様々な機能を有することが解ってきている。例えば、SERPINE1は細胞膜蛋白質であるLRP1やuPARを介して、細胞内シグナル伝達を誘導することが示されている。実際、がん細胞やマクロファージをリコンビナントSERPINE1で刺激した際に、p38、Akt、STAT3経路などの重要な細胞内シグナル伝達分子の活性化が誘導される。これらのことから、SERPINE1が抗がん剤抵抗性に関与するシグナル伝達系を活性化することで、乳がん細胞の生存に寄与している可能性が考えられた。そこで、乳がん細胞をリコンビナントSERPINE1で刺激した際にどのようなシグナル伝達系が活性化されるのかを、RNA-seqを用いて検討した。得られた遺伝子発現プロファイルのGene set enrichment analysisの結果から、SERPINE1で刺激した乳癌細胞では、Akt経路およびJAK-STAT経路が有意に活性化することが明らかとなった。これらの経路は、乳がん細胞の生存やがん幹細胞性、抗がん剤抵抗性と深く関わっていることが既に知られている。この結果から、SERPINE1はAktおよびJAK-STATの活性化を介して抗がん剤抵抗性を誘導していることが示唆された。

次に、転移を有する肺の血管内皮細胞ではなぜSERPINE1の発現が上昇するのか、その分子メカニズムを解析した。転移が起こった肺の血管内皮細胞で起こる特徴的な変化として、血管透過性の亢進が観察された。血管内皮細胞同士の細胞-細胞間接着が減弱することによって、血液成分の漏出や、免疫系細胞

のリクルートが活発化する。血管透過性が亢進した状態を *in vitro* で模倣するために、肺血管内皮細胞を低密度で培養した。興味深いことに、低密度で培養した肺血管内皮細胞では、高密度で培養した場合と比較して、*SERPINE1* の発現は著しく上昇した。このことから、*SERPINE1* の発現は内皮細胞の細胞-細胞間接着が減弱することによって誘導される可能性が考えられた。細胞-細胞間接着によって制御される細胞内シグナル伝達の一つとして YAP-TEAD が知られている。細胞-細胞間接着が弱くなることによって、YAP が核移行して TEAD と結合することで、TEAD 標的遺伝子の発現が誘導される。そこで、YAP および TEAD1/2/3/4 をノックダウンした肺血管内皮細胞の *SERPINE1* の発現を検討したところ、これらの分子のノックダウンによって、*SERPINE1* の発現は有意に低下した。また、同様の結果は、YAP-TEAD 阻害剤である Verteporfin を培養液中に添加することでも再現することが可能であった。さらに、*SERPINE1* が YAP および TEAD の直接のターゲット遺伝子であることを確かめるために、クロマチン IP を行ったところ、YAP および TEAD4 の両方ともが *SERPINE1* のプロモーター領域に結合することが示された。以上のことから、肺転移が起こった際に、肺血管内皮の血管透過性が亢進し、内皮細胞の細胞-細胞間接着の減弱に伴って YAP-TEAD の活性化が誘導されることで、内皮細胞で *SERPINE1* の発現が上昇すると考えられる。

最後に、マウス乳がん肺転移モデルを用いて、*SERPINE1* の阻害によって転移乳がん細胞の抗がん剤抵抗性を抑制できるかどうかを検討した。その結果、*SERPINE1* 阻害剤である Tiplaxtinin とパクリタキセルを併用投与した場合、パクリタキセル単独投与と比較して、乳がん肺転移が有意に抑制された (図3. A)。また、乳がん腫瘍の遺伝子発現データ (Public data) を用いた解析から、抗がん剤によるアジュバント療法を受けた乳がん患者では、*SERPINE1* の発現が高いほどの乳がんの再発が起こりやすいことが示された (図3. B)。一方、抗がん剤アジュバント療法を受けなかった乳がん患者では、*SERPINE1* の発現と再発との相関は得られなかった。このことから、*SERPINE1* は乳がんの抗がん剤抵抗性を誘導しており、*SERPINE1* 阻害剤と抗がん剤を併用することによって、がん細胞の抗がん剤抵抗性を減弱させ、効果的に乳がん転移再発を抑制できると考えられる。

図 3. *SERPINE1* 阻害剤は乳がん肺転移における抗がん剤の効果を増強する



(A) 乳がん肺転移モデルにおける *SERPINE1* 阻害剤の効果。 *SERPINE1* 阻害剤 (Tiplaxtinin, Tipla.) およびパクリタキセル (PTX) の併用は、効果的に乳がん肺転移を抑制する。

(B) 乳がん無再発生存期間における *SERPINE1* の関与。抗がん剤によるアジュバント療法を受けた群においては、*SERPINE1* の発現は、乳がんの再発と有意に関連する。 TNBC: triple-negative breast cancer. HR: Hazard ratio.

本研究では、乳がんの肺転移部位において、肺血管内皮細胞は *SERPINE1* を産生することによって転移がん細胞の抗がん剤抵抗性の獲得に寄与することが明らかとなった。肺血管内皮細胞での *SERPINE1* の発現は、YAP-TEAD が *SERPINE1* プロモーターと結合することにより直接誘導されていた。また、そのメカニズムとしては、転移により肺の血管透過性が亢進することによって、肺内皮細胞の細胞-細胞接着が減弱し、YAP が活性化することが示された。さらに本研究では、*SERPINE1* が乳がん細胞の Akt シグナルおよび JAK-STAT シグナルを活性化することで抗がん剤抵抗性に寄与することを示した。マウス転移モデルにおいて抗がん剤と *SERPINE1* 阻害剤を併用することで、効果的に乳がん肺転移を抑制することが可能であった。以上のことから本研究では、*SERPINE1* が乳がん転移を阻害するための新規薬剤標的分子になり得ることが示された。

本研究の成果は、下記の論文にて発表した。

T. Hongu, Sarenqiqige, Shandan, H. Kusunoki, A. Ishimura, T. Suzuki, T. Oskarsson, N. Gotoh. Permeable lung vasculature creates chemoresistant endothelial niche by producing *SERPINE1* at breast cancer metastatic sites. *Cancer Science*, 2025, in press.

最後に、本研究の遂行において多大なご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。