

de novo 発がんマウスモデルを用いたがん臨界点の同定と予防先制医療への応用

申請代表者	昆 俊亮	東京理科大学・生命医科学研究所	講師
所外共同研究者	今野 雅充	東京理科大学・生命医科学研究所	助教
研究統括者	早川 芳弘	研究開発部門病態制御分野生体防御学領域	教授

■背景・目的

がんの80%以上は上皮細胞を起源とする固形癌であり、近年の診断技術や治療法の著しい進歩にも関わらず、本邦におけるがん死亡者数は年々増加している。腫瘍組織は特殊な微小環境が整備されており、がん細胞によって教育された線維芽細胞、脈管系内皮細胞、免疫細胞等の間質細胞が腫瘍進展に有利に作用することが分かっている。これまでのがん研究は、腫瘍化した組織の悪性化がん細胞自身または周辺に存在する腫瘍関連間質細胞の生物学的特性やこれらの細胞間における相互作用機構の解明に重点的に取り組まれてきた。その成果として、分子標的薬の開発や第4の治療法と称される免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がん治療法に新たな選択肢が近年加えられてきた。しかしながら、がん種によっては高い奏効率が得られないことや治療抵抗性を獲得するがん細胞の出現など、万能ながん治療法とは言い難いのが現状である。このような背景より、がん治療戦略の抜本的な見直し、さらには既存のアプローチとは異なるがんの基礎研究が求められている。これまでのがん研究の大半は、最終的に悪性化した腫瘍組織もしくはがん細胞を対象として、これらと正常組織もしくは正常細胞との性状の違いを調べることにより、「がん」という疾病を理解しようと試みられてきた。しかしながら、がん細胞が誕生した瞬間、すなわち平和的な多細胞細胞社会に突如としてがん細胞が出現した際にどのような生体内反応が生じるかはよく分かっていない。がん細胞に従順し、がん細胞の生存・増殖を支持するような環境を整備するのか、もしくはがん細胞に抗い、がん細胞を駆逐しようと作用するのか、その実態は不明である。また、がん細胞が産生されて腫瘍が形成する過程において、どの段階より正確に「がん」と科学的解釈をもって判断できるのかを具体的に定義されたことはこれまでになく、何をもち「がん」とするのか曖昧のままである。このような腫瘍細胞社会の形成プロセスを理解するためには、がん細胞が出現した特異点における間質内での事象を多角的に解析し理解する必要があるが、これまでに適切なマウスモデルが存在しなかったことなどから、がん細胞誕生の瞬間にどのような生体内反応が生じているかはがん研究のブラックボックスである。

申請代表者はこれまでに、正常細胞とがん変異細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」研究に従事してきた。細胞競合とは、性質の異なる上皮細胞が共存したとき、一方が生存し他方が排除されることと定義されている。最近の研究より、ショウジョウバエもしくはマウス生体において、代謝不全、極性異常、酸化ストレスが増加した変異細胞などが細胞競合によって排除されることが明らかとなってきた。申請代表者は、マウス腸管の最終分化した吸収上皮細胞にて、少量のタモキシフェン依存的に活性化 Ras 変異をモザイクに誘導することが可能な細胞競合マウスモデルを作出し(Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウス)、ほとんどの Ras 変異細胞が管腔へと排除されることを明らかにし、哺乳類生体内においても細胞競合によってがん変異細胞が排除されることを世界に先駆けて報告した(Kon et al., Nat. Cell Biol., 2017)。さらに、この細胞競合マウスモデルの解析を深化させ、がん関連遺伝子の変異蓄積の負荷

種目 (特定研究)

による変異細胞の排除効率の変化を検討した結果、APC 遺伝子の変異による Wnt シグナルが活性化した上皮層に少数 Ras 変異を誘導すると、変異細胞の一部は基底膜を分解し、絨毛内間質へと浸潤することを見出した(図1)。このことから、APC 遺伝子の変異によって細胞競合の機能が変容し、変異細胞が上皮層より逸脱する方向性が転換することによって、浸潤性のがん細胞が産生されることが分かった。また、Ras 変異誘導 30 日後には、間質内へと浸潤したがん変異細胞は包巣を形成し、またこの腫瘍形成部位周辺には腺腫の成分が全く認められなかったことから(図2)、正常腸粘膜より直接的に発がんする(*de novo* 型発がん)と結論づけた。従って、本マウス(APCmin/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウス)は、これまで確立されていなかった *de novo* 発がんマウスモデルになり得ること、また「がん細胞が誕生した瞬間」を可視化することが出来るため、正常間質からがん間質への遷移を解析するための生体モデルとして非常に有用であることが考えられた。

研究代表者と所内共同研究者らは、がん成立という特異的臨界点の直前では組織を正常化する機能が弱まり、がん化と正常化のプロセスの拮抗作用により大きな揺らぎが生じるという仮説を立て、何らかの細胞の遺伝子発現量の少なくとも一部が強い同期性揺らぎを示すだろうとの着想に至った。そこで本研究では、研究代表者らが作出した単一細胞レベルでがん細胞が基底膜を超えて間質組織内へと浸潤し発がんする *de novo* 発がんマウスモデルを用いて、がん細胞が正常間質をがん間質へと遷移させる「がん臨界」の本態を解明することを目的とした。そのために、がん細胞誕生から腫瘍が形成されるまでの複数のタイムポイントにおいて、時系列的に時空間細胞アトラス情報と包括的な 1 細胞トランスクリプトーム情報を取得、統合的に解析することによってがん細胞と周辺間質細胞の遺伝子発現様式の変化を網羅的に俯瞰する。さらに、がん細胞の出現により間質細胞ネットワークに生じる攪乱度の指標として「揺らぎ」を同期性揺らぎ遺伝子理論に基づく数理解析により定量化し、正常組織で保たれていた複雑系としての上皮-間質細胞間ネットワークの均衡が破綻する変曲点となる臨界点を同定することを目指した。

■結果・考察

がん細胞が誕生した時より、がん細胞が拡張し腫瘍を形成するまでの周辺正常細胞の遺伝子発現の変化を解析することにより、がん臨界付近で発現レベルに揺らぎが生じる遺伝子群を同定し、がんの臨界点の分子実体を同定することが本研究の目的である。そこで、*de novo* 発がんマウスを用いて、がん細胞誕生からがん形成までの時空間的遺伝子発現アトラス情報の取得に注力した。具体的には、APCmin/Villin-

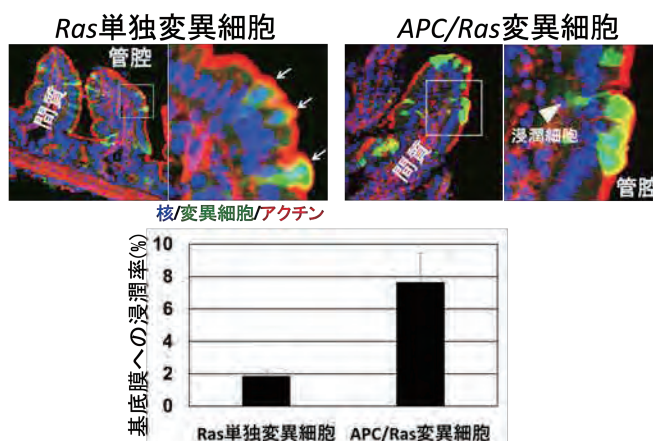


図1. 小腸絨毛でのがん変異細胞の挙動

Ras 誘導 3 日後の小腸絨毛の様子を示す。Ras 変異細胞のほとんどは管腔へ排除されるのに対し(上左図、矢印)、APC/Ras 変異細胞では基底膜に浸潤する細胞数が増加する(上右図、矢頭; 下図)

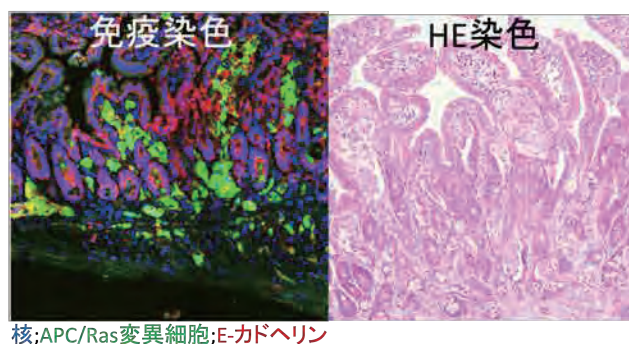


図2. APC/Ras 変異マウスで観察される *de novo* 型発がん Ras 変異誘導 30 日後の腸管の様子免疫染色像(左図)と HE 染色像(右図)を示す。

種目 (特定研究)

CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウスにタモキシフェンを投与し、APC/RasV12 の二重変異がん細胞を産生させた後、14日後のがん初期、28日後のがん形成期のマウス腸管を回収、スイスロール法にて凍結サンプルを作成し、腸管全領域をモニタリングしながら、GFP 蛍光の指標より腫瘍形成部位を同定した。そして、その周辺領域をクライオスタットにより薄切、スライドガラスに貼付し、組織切片の全細胞の遺伝子発現を空間情報を維持したまま解析することが可能な Visium 解析を行な

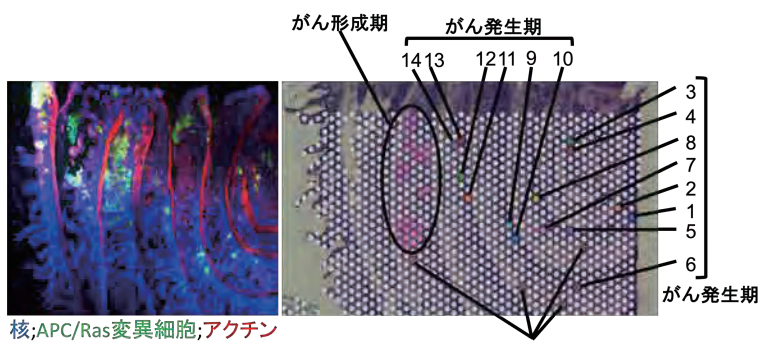


図3. Visium 解析の実際

de novo 発がんマウスに Ras 変異誘導 28 日後の腸管の様子を免疫染色像(左図)と Visium での解析部位(右図)を示す。腫瘍の大きさによりがん発生期とがん形成期とを区別した。

った。Visium 解析では、直径 55 μm のスポットを 5000 箇所等間隔に設定し、各部位に関して RNAseq を実施する。各スポットと免疫染色画像とを照らし合わせ、腫瘍が小さい領域を「がん発生期」、腫瘍が大きい領域を「がん形成期」と定義し、これらと正常組織でのデータを統合して、各がん形成段階における遺伝子発現情報を取得した(図3)。その結果、がん発生期とがん形成期の各フェーズにおいて、特異的に発現低下もしくは発現増加する遺伝子群を複数同定した。さらに、がん発生期の細胞集団のうち、少なくとも1つの細胞集団で遺伝子発現が増加、もしくは低下している Gene Ontology (GO) セットを抽出し、この中からがん形成期の細胞集団にて共通して発現増加する GO セットを探索した。その結果、RNA スプライシング制御、ROBO 受容体シグナルなど複数の GO セットを同定した。これらの GO 群はがん発生期にはその発現に「揺らぎ」が生じるが、がん形成期には安定して発現増加すると解釈される。同様の手法にて、がん発生期の「揺らぎ」を経て、がん形成期に安定して発現低下する GO セットを調べた結果、ER ストレス応答の GO セットを同定した。

研究代表者のこれまでの研究成果より、*de novo* 発がんする APC^{min}/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウスはリンパ行性特異的ながん細胞が転移することが分かっていた。そこで、腸管の whole mount 染色法を立ち上げ、がん細胞がリンパ管に侵襲する様子を詳細に解析した。その結果、腸管間質内に浸潤したがん細胞が組織内を拡充するにつれて、腸管の既存リンパ管構造である乳糜管が退

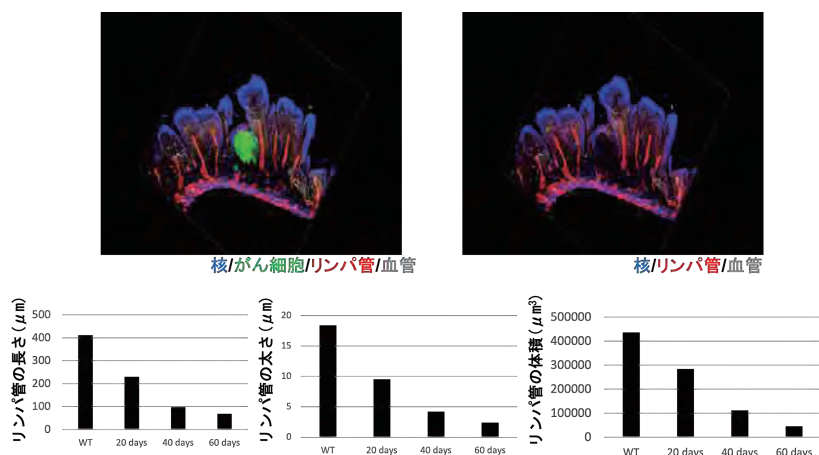


図4. *de novo* 発がんマウスで観察されるリンパ管退行

行することになった(図4)。一般的に、がん細胞は血管新生と同様にリンパ管の新生を促し(腫瘍リンパ管新生)、これががん細胞のリンパ管侵襲を助長するという説がこれまでの趨勢であったが、今回発見した現象はこれとは相反する結果であった。そこで上述の Visium 解析によって得られた情報を活用し、腫瘍部での遺伝子発現変化を詳細に解析した。その結果、内皮-間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal Transition; EndMT) に特徴的なマーカー分子の変化が複数認められた。そこで、代表的な EndMT マーカーである Transgelin の免疫染色を行った結果、腫

種目 (特定研究)

瘍部に存在するリンパ管内皮細胞で Transgelin の発現が著増していることが分かった(図5)。これらの結果より、APC/RasV12 がん細胞はリンパ管内皮細胞の EndMT を誘導することにより、リンパ管構造を脆弱化させ、その結果リンパ管侵襲することが示唆された。

■結論

本研究では、*de novo* 発がんマウスを用いた Visium 解析を行うことによって、がんが進行する過程における遺伝子発現様式の遷移を追跡した。その結果、がん発生期ではその発現シグニチャーが細胞集団によってばらつきの強度が比較的高

いのに対し、がん形成にかけて安定的な遺伝子発現パターンを示すようになることが分かった。また、GO 解析の結果より、がん発生期では RNA スプライシング制御や ROBO 受容体シグナルの発現、活性の強度にばらつきが認められるが、がんが形成されると安定的に増強されることが分かった。他方、ER ストレス応答はがん形成期では安定的に発現低下することを見出した。ER ストレスは一般的にがん細胞の生存・増殖を正に制御することが知られているが、本研究成果で見出した、がん形成後には安定的に発現低下するという結果は大変興味深い。今後は、ER ストレス関連遺伝子群の遺伝子変容を詳細に解析することを含め、より細かな時間軸を設定し(タモキシフェン投与後、7日、14日、21日、28日)、がん細胞誕生の瞬間からがんの臨界転移を経て、がん形成まで至る過程での空間的遺伝子発現情報を Visium 解析にて引き続き取得する予定である。しかしながら、Visium 解析を行ううえで十分に考慮すべきことは、1つのスポットではおおよそ 10 細胞ほどが含まれているため、これら複数の細胞の遺伝子発現の平均を解析していることである。すなわち、1細胞レベルで発現に「揺らぎ」が生じる分子を同定することは Visium 解析では不可能であるため、真のがん臨界点を同定するためには異なる解析法との併用が肝要である。そのため、がん発生期またはがん形成期の部位を単離し、1細胞 RNAseq 解析を行うことによって、がん臨界点を規定する揺らぎ分子群や、がん臨界点で同期的に揺らぎが生じる間質細胞クラスターとしての揺らぎ細胞群を今後同定する予定である。また、本研究成果より、*de novo* 発がん部ではリンパ管内皮細胞が EndMT を引き起こしていることを明らかとした。一般的に、個体の老化や慢性炎症などの病変では EndMT が誘導され、リンパ管の構造が脆弱化することが知られているが、がんと EndMT の関連についてはよく分かっていない。また、がん細胞がどのようにしてリンパ管内へと侵襲するかについても不明な点が多い。従って、本成果はがん細胞のリンパ転移機構の理解に資することが今後期待でき、将来的にはこの過程を制御する分子群を同定し、新規のリンパ行性転移の治療法確立へと昇華していきたい。

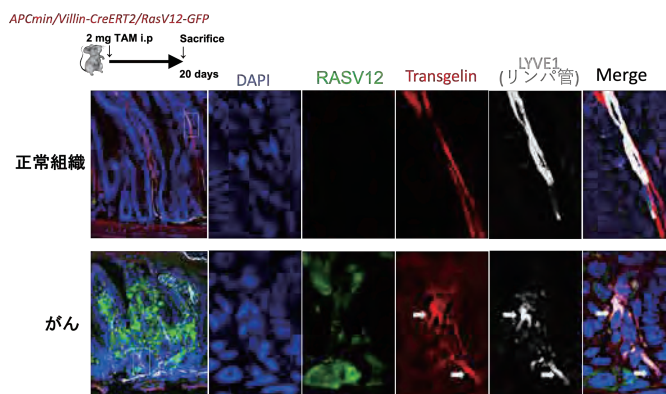


図5. *de novo* 発がんマウスで観察される EndMT

de novo 発がんマウスに Ras 変異誘導 20 日後の腸管での Transgelin、もしくはリンパ管の免疫染色像を示す。また、リンパ管内皮細胞で Transgelin の発現が認められる(矢印)。