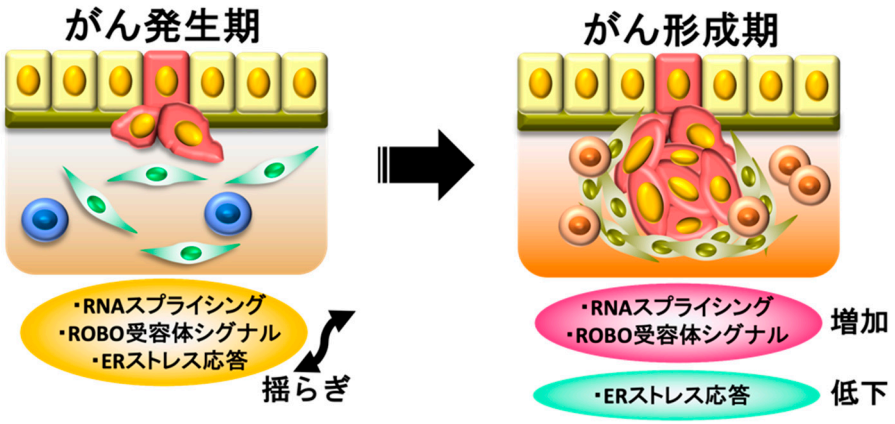
35　がん形成を規定する臨界特異点の研究	昆　俊亮

【目的】長い間、がんは本邦における死因の第一位であることから、その発症機序と病態の解明、そしてこれらの科学的知見に基づいた革新的な治療法の開発が現在も希求されている。これまでのがんの基礎研究の大半は、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されてきた。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」と判断できるのかを具体的に定義されたことはなく、何をもって「がん」とするのか曖昧のままである。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」の分子実体を同定することを目的とする。

【方法】研究代表者らが作出した *de novo* 型発がんマウスを用いて、正常期、少数のがん細胞で構成されるがん発生期、さらには多数のがん細胞で包巣が形成されたがん形成期のトランスクリプトーム情報を空間的オミクス解析法である Visium により取得した。この情報を基に、がん形成過程における遺伝子発現変化の遷移を網羅的に解析した。さらには、Gene Ontology（GO）解析を行い、がん発生期ではその発現に揺らぎが生じるが、がん形成期には安定的に発現が増加もしくは低下する GO 遺伝子群を同定した。また、腫瘍部で特徴的に遺伝子発現変化する分子を解析し、がん細胞のリンパ管侵襲に関連し得る遺伝子を探索した。

【結果】正常期、がん発生期、がん形成期における Visium による空間的遺伝子発現解析の結果、がんの発生期で RNA スプライシング制御や ROBO 受容体シグナルなどの GO 遺伝子群の発現に揺らぎが生じるが、がんが形成されると安定的にその発現が増加することが分かった。一方、ER ストレス応答もまた同様にがん発生期においては、細胞集団によってその発現にばらつきが認められるものの、がん形成期では安定的に発現が低下することを見出した（下図）。また、Visium 解析の結果、腫瘍部ではリンパ管内皮細胞が内皮-間葉転換（Endothelial-Mesenchymal Transition：EndMT）する際に発現が変動することが知られているマーカー分子の変容が認められた。そこで、実際に腸管 whole mount 染色により EndMT マーカーを免疫染色した結果、がん細胞に近接したリンパ管内皮細胞で EndMT マーカーの発現が観察された。

本研究成果



35. がん形成を規定する臨界特異点の研究

昆　俊亮

東京理科大学 生命医科学研究所 がん生物学部門

Key words：がん臨界点，*de novo* 発がんマウス，空間的オミクス解析，同期性揺らぎ遺伝子

緒　言

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。このような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研究に重点的に取り組まれてきた成果として、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が登場し、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。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、何をもって「がん」とするのか曖昧のままである。

研究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在したとき、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内において、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ている。研究代表者は、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[1]。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 *Ras* 変異を少数誘導すると、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。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、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。

方法および結果

1. がん発生期に発現が揺らぐ遺伝子群の探索

まず初めに *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-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製し、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について、空間情報を維持したまま解析することが可能な Visium 解析を行なった。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 1）。解析の結果、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。

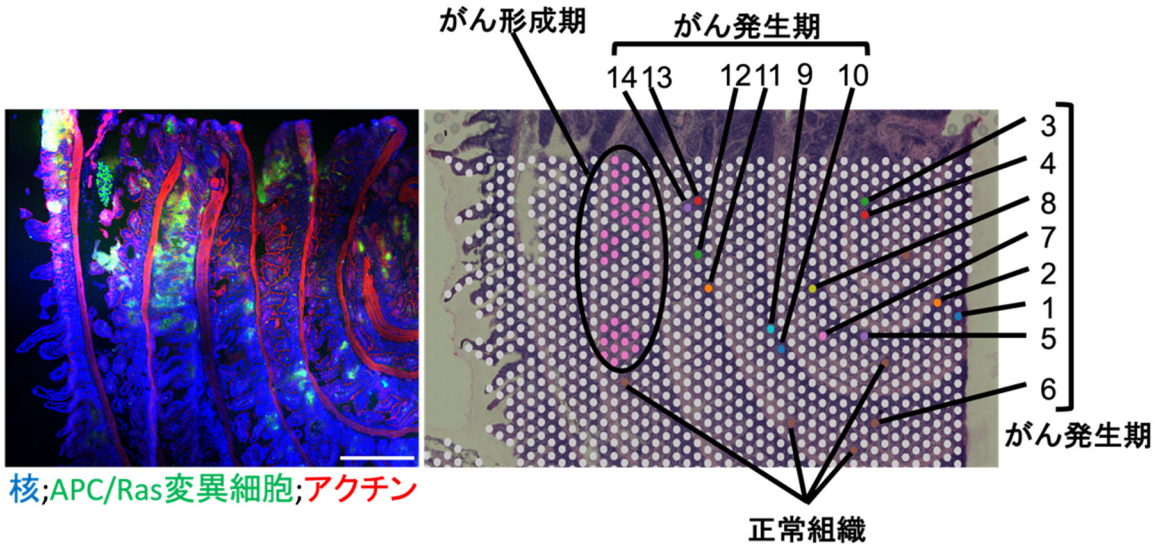


図 1. Visium 解析の実際

de novo 発がんマウスに *Ras* 変異誘導 28 日後の腸管の様子の免疫染色像（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。

スケールバー：1 mm。

2. がん細胞のリンパ管侵襲機構の解明

研究代表者のこれまでの研究成果より、*de novo* 型に発がんする APCmin/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウスでは、リンパ行性特異的に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嚢が退行することが分かった。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、腫瘍部に存在するリンパ管内皮細胞にて Transgelin の発現が著増していることが分かった（図 2）。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。

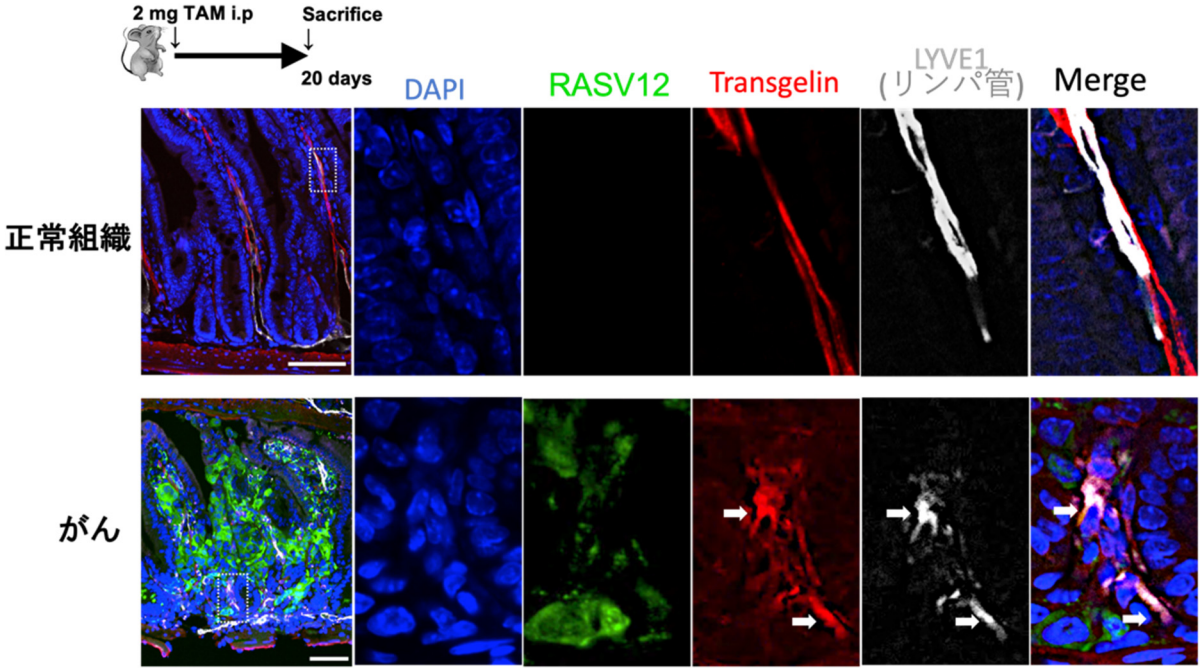


図 2. *de novo* 発がんマウスで観察されるリンパ管内皮細胞の EndMT

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 LYVE1 陽性のリンパ管の免疫染色像（左図）を示す。リンパ管内皮細胞で Transgelin の発現が認められる（矢印）。スケールバー：100 μm。

考　察

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発生期での揺らぎを経て、がん形成期では安定的に発現低下することを見出した。Visium 解析を行ううえで十分に考慮すべき点は、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で EndMT が誘導されていることを明らかにした。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管侵襲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、リンパ行性転移を標的とした新規がん治療法の確立へと昇華していきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、富山大学和漢医薬学総合研究所生体防御学領域の早川芳弘教授である。

文　献

1） Kon S, Ishibashi K, et al. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. Nat. Cell Biol. 2017 May 19;19(5):530-41. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28414314 DOI: 10.1038/ncb3509