



プレス通知資料（研究成果）

本件配布先：文部科学記者会、科学記者会、本町記者会

2023年12月20日

国立大学法人東京医科歯科大学

「がんの進展に伴う血管内皮細胞の変容(内皮間葉移行)を検出できるマーカーを発見」 — がん微小環境を標的とした新規がん治療法の開発に期待 —



【ポイント】

- がん微小環境に豊富に存在するトランスフォーミング増殖因子(TGF- β)^{*1}が誘導する内皮間葉移行(EndoMT)^{*2}の中間段階(Partial EndoMT)を検出できる実験系を開発し、CD40^{*3}が Partial EndoMT の特異的マーカーであることを見出しました。
- 226 名のがん患者の腫瘍組織を用いたシングルセル RNA シークエンシング解析により、がん微小環境において Partial EndoMT 段階にある細胞集団を検出し、CD40 がこの細胞集団において高発現していることをつきとめました。
- EndoMT はがんなど様々な疾患の進展に重要な役割を果たすため、本研究成果により EndoMT が関与する疾患の新たな治療法の開発への応用が期待できます。

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 病態生化学分野の渡部 徹郎教授、高橋 和樹連携研究員、小林美穂助教等の研究グループは、東京大学、新潟大学、東京薬科大学、慶應義塾大学、光州科学技術院(GIST、韓国)、ソニー株式会社との共同研究で、がんの進展に関与する内皮間葉移行の中間段階を検出できる実験系を開発しました。この研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)次世代がん医療加速化研究事業(P-PROMOTE)「口腔がん微小環境ネットワークシグナルの制御による多角的がん治療法の開発」(研究開発代表者:渡部徹郎)、文部科学省科学研究費補助金、東京医科歯科大学・ソニー株式会社・ソニーグループ株式会社の包括連携プログラム等の支援のもとでおこなわれたもので、その研究成果は国際科学誌 Cancer Science 誌に、2023年12月18日にオンライン版で発表されました。

【研究の背景】

腫瘍組織には、がん細胞のみならず腫瘍血管やがん関連線維芽細胞(CAF)など様々な種類の細胞が存在し、がん微小環境が構成されています。がん微小環境に多く存在するトランスフォーミング増殖因子(TGF- β)は、がん細胞の上皮間葉移行(EMT)^{*2}や腫瘍血管新生^{*4}を誘導することで、がんの悪性を亢進します。また、研究グループは TGF- β が腫瘍血管内皮細胞から CAF を形成させ、その CAF から産生される TGF- β 2 が口腔がん細胞の EMT を誘導することでがんの悪性を亢進することを報告しました(Yoshimatsu et al., 2020,

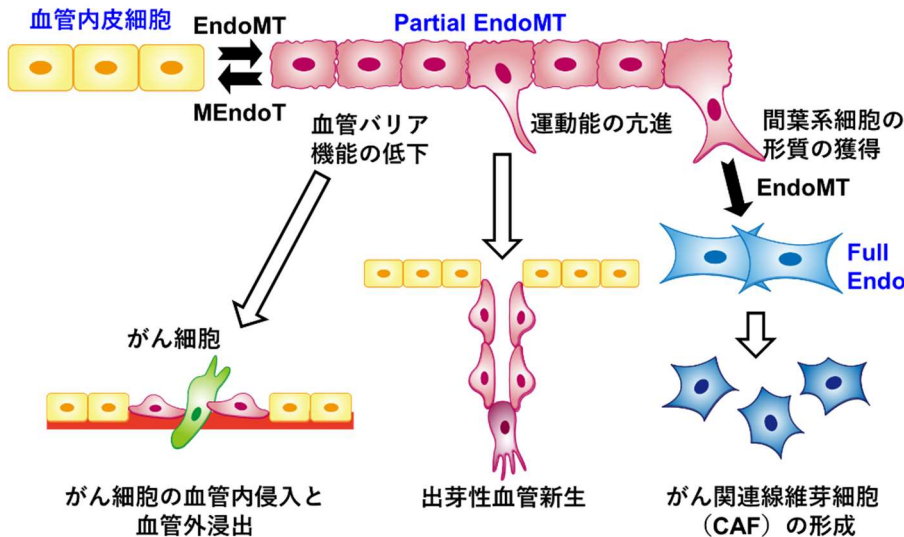


図1 Partial EndoMT はがんの進展・転移に重要な役割を果たし、治療の標的となる

EndoMT の中間段階 (Partial EndoMT) において内皮細胞はバリア機能を失うことで、がん細胞の血管内侵入と血管外浸出が亢進し、血管新生が誘導される。Partial EndoMT は間葉系細胞の形質を獲得した Full EndoMT の手前の段階であるため特異的に発現する因子は EndoMT を制御している可能性があり、治療の標的となるが、これまで Partial EndoMT を識別する方法がなかった。

Cancer Science)。この腫瘍血管内皮細胞が、間葉系細胞の形質を獲得する現象は「内皮間葉移行 (EndoMT)」と呼ばれ、がんの進展・転移に重要な役割を果たすことが明らかになっていますが、その詳細な分子機序については未解明な部分が多く残されています。近年では、EndoMT の中間段階 (Partial EndoMT) が、がん転移や腫瘍血管新生において重要な役割を果たすことが明らかになりつつありますが (図 1)、EndoMT を段階的に検出する実験系がないことが、解析を進めるための障壁となっていました。

【研究成果の概要】

そこで研究グループは、EndoMT を生体においてリアルタイムに観察し、どのような分子的イベントが起こっているかを検討するために、世界に先駆けて EndoMT レポーターマウスを作りました (図 2A)。このマウスにおいては血管内皮細胞が赤色蛍光タンパク質で遺伝学的に標識され、間葉系細胞の性質を獲得すると緑色

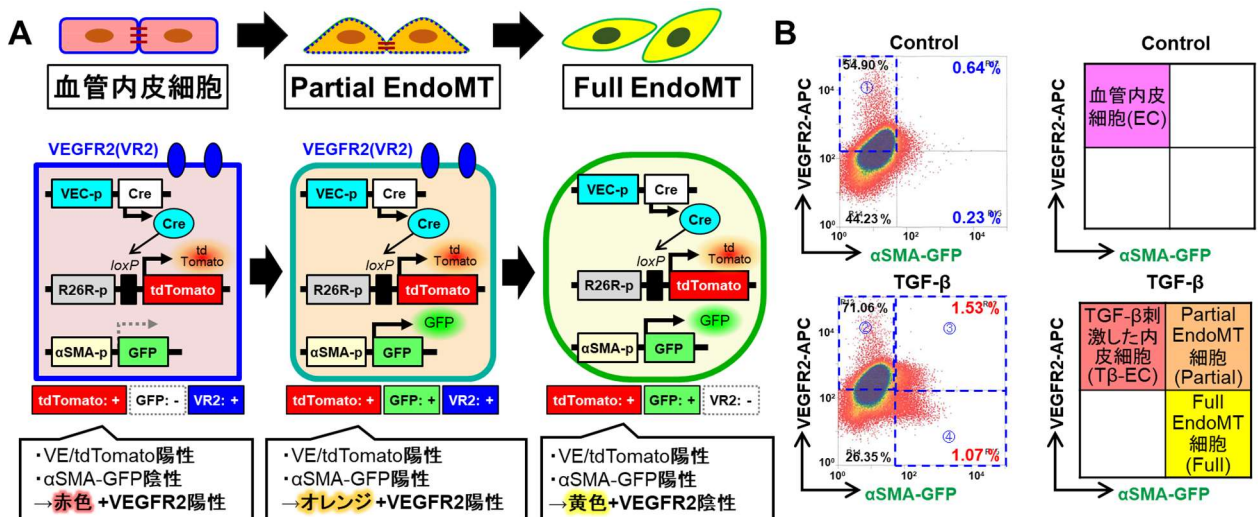


図 2 EndoMT 移行段階を識別する実験系を用いて Partial EndoMT の性質を有する細胞群を同定した

(A) EndoMT の移行状態を識別する EndoMT レポーターマウスから EndoMT レポーター細胞を樹立した。(B) TGF-β で刺激した EndoMT レポーター細胞を VEGFR2 (内皮細胞マーカー) と SMA-GFP (間葉系細胞マーカー) の発現を指標に FACS 分画することで解析した。TGF-β 無処理の細胞における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「内皮細胞 (EC)」とし、TGF-β 処理の細胞における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「TGF-β 刺激した内皮細胞 (Tβ-EC)」、VEGFR2+:SMA-GFP+ の細胞画分を「Partial EndoMT (Partial)」、VEGFR2-:SMA-GFP+ の細胞画分を「Full EndoMT (Full)」として遺伝子発現解析を施行した。

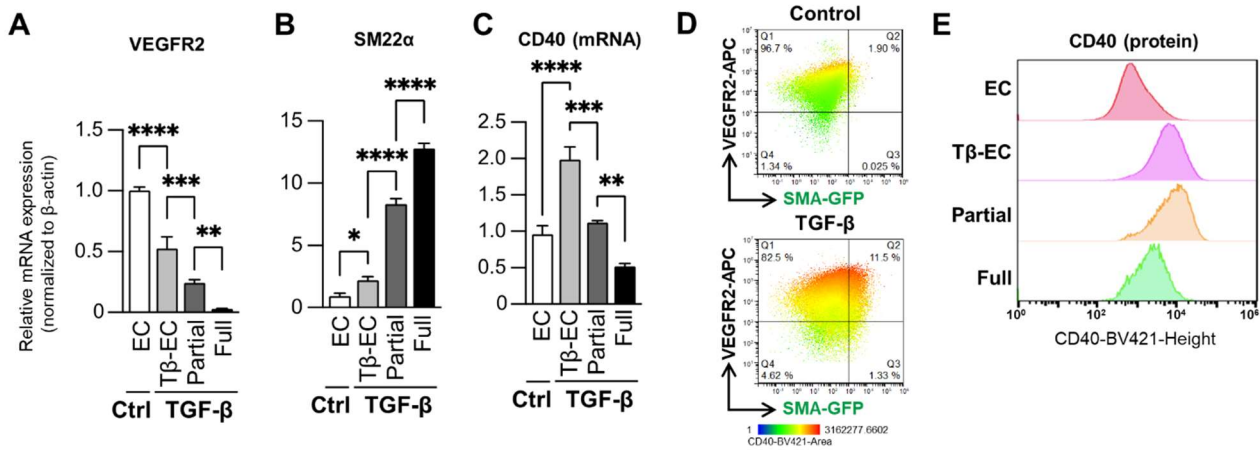


図 3 Partial EndoMT 特異的マーカーとして CD40 を同定した

(A, B) EndoMT の移行とともに段階的に VEGFR2 の発現が減少し (A)、 α SMA の発現が上昇する (B) ことが見出された。(C-E) Partial EndoMT の特異的マーカーとして同定された CD40 の発現が T β -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが mRNA (C) とタンパク質 (FACS 解析の定量化 : D, E) レベルで明らかとなった。

蛍光タンパク質を発現するため、EndoMT により形成された間葉系細胞が血管内皮細胞由来であることが識別されるとともに、現在 EndoMT 移行中の細胞をリアルタイムで検出することが可能となっています。そこで、この EndoMT レポーターマウスから血管内皮細胞を分取して不死化した EndoMT レポーター内皮細胞を用いて、TGF- β による EndoMT 移行の各段階における細胞集団をフローサイトメーター (FACS) で分取しました (図 2B)。

FACS で分取した細胞集団における EndoMT マーカーの発現変化を検討した結果、内皮細胞 (EC: TGF- β 無刺激の細胞における VEGFR2 陽性 (+): SMA-GFP 陰性 (-) の細胞画分) と完全に EndoMT が誘導された Full EndoMT 細胞 (Full: TGF- β 無刺激の細胞における VEGFR2 陰性 (-): SMA-GFP 陽性 (+) の細胞画分) に加えて、2つの Partial EndoMT 細胞集団 (T β -EC と Partial) を見出して、EndoMT の移行 (EC \Rightarrow T β -EC \Rightarrow Partial \Rightarrow Full) とともに段階的に VEGFR2 の発現が減少し、 α SMA の発現が上昇することを見出しました (図 3A, B)。さらに、Partial EndoMT を誘導する分子機構を解明するために、EC と比較して、T β -EC と Partial において発現が上昇して Full で低下する候補因子を RNA シークエンシング結果を解析して探索し、CD40 (TNF 受容体ファミリーに属して炎症を惹起する作用を持つ細胞膜タンパク質) などを同定しました。CD40 の発現は T β -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することから、Partial EndoMT の特異的マーカーとなることが明らかとなりました (図 3C, D, E)。

これらの結果の臨床的な意義を検討するために、研究グループは、公共データベースに公開された 10 種類 226 人の固形がん患者の腫瘍組織を用いたシングルセル RNA シークエンシングのデータを再解析しました。その結果、腫瘍組織においては血管内皮細胞と CAF の集団に加えて、Partial EndoMT の性質を有する細胞集団が存在することを明らかにしました (図 4A, B)。また、腫瘍組織において血管内皮細胞は Partial EndoMT を経て CAF へと変容することも示されて (図 4C)、EndoMT ががんの進展において役割を果たしていることが明らかになりました。さらに、Partial EndoMT の特異的マーカーとして同定した CD40 が Partial EndoMT の細胞集団において発現していたことから (図 4B)、CD40 が腫瘍組織においても Partial EndoMT の特異的マーカーとなることが明らかとなりました。

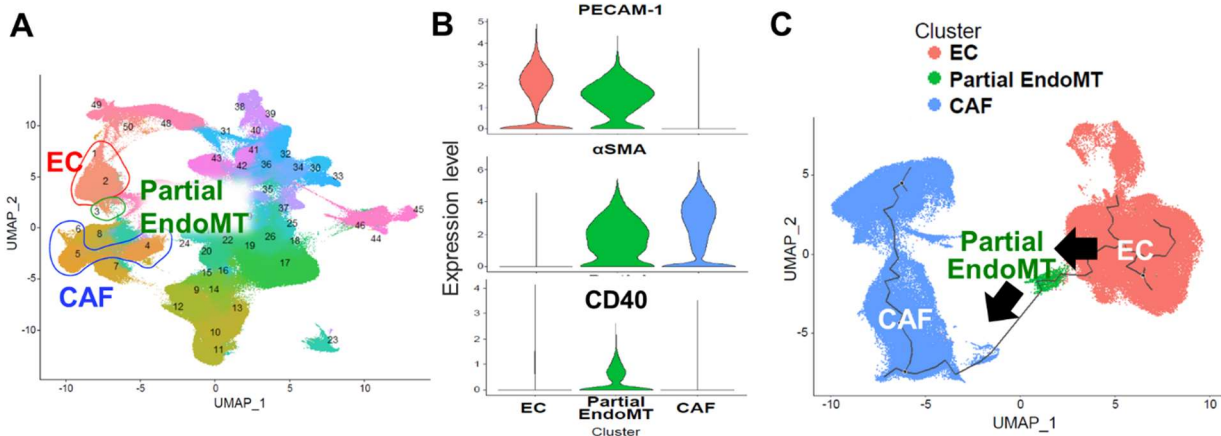


図4 ヒト腫瘍組織においても Partial EndoMT の性質を持つ細胞集団が同定された

(A) 10 種類・226 名の固形がん患者の腫瘍組織のシングルセル RNA シークエンシングデータを再解析して得られた UMAP。855,271 個の細胞を遺伝子発現の類似性をもとに 49 個のクラスターに分類したところ、内皮細胞のクラスター群と間葉系細胞 (CAF) のクラスター群とともに、Partial EndoMT のクラスターが同定された。(B) 血管内皮細胞のマーカーである PECAM-1 の発現と間葉系細胞のマーカーである α SMA の発現を Violin plot により検討したところ、それぞれ内皮細胞のクラスター群と間葉系細胞 (CAF) のクラスター群に加えて、Partial EndoMT のクラスターにおいても発現していた。また、今回 Partial EndoMT 特異的のマーカーとして同定した CD40 の発現は Partial EndoMT のクラスターにおいてのみ観察された。(C) 疑時系列解析により、腫瘍組織において、血管内皮細胞が Partial EndoMT の性質を持つ細胞を経由して、CAF へと変容していることが観察された。

【研究成果の意義】

今回の研究成果から、血管内皮細胞が、がん微小環境に豊富に存在する TGF- β によって段階的に間葉系細胞の性質を獲得して、完全な EndoMT を起こして CAF へと分化転換することが明らかになりました(図 5)。近年、がん治療の標的として、がん悪性化を制御する CAF に注目が集まっています。CAF の起源としては腫瘍組織に存在する線維芽細胞が知られていますが、血管内皮細胞から分化転換する CAF が、CAF における 3 割程度を占めるという報告もあり、TGF- β による血管内皮細胞から CAF への分化転換はがん治療の標的として注目を集めています。近年の研究成果から、CAF まで完全に分化転換してしまうと血管内皮細胞には戻れなくなることがわかりつつあるため、Partial EndoMT の状態の細胞の性質を理解することは CAF の形成を抑制するために重要な意義を持ちます。今回、Partial EndoMT の特異的マーカーとして同定された CD40 の機能を制御することで、がん微小環境ネットワークを標的とした新たながん治療法の開発へ応用されることが期待されます。

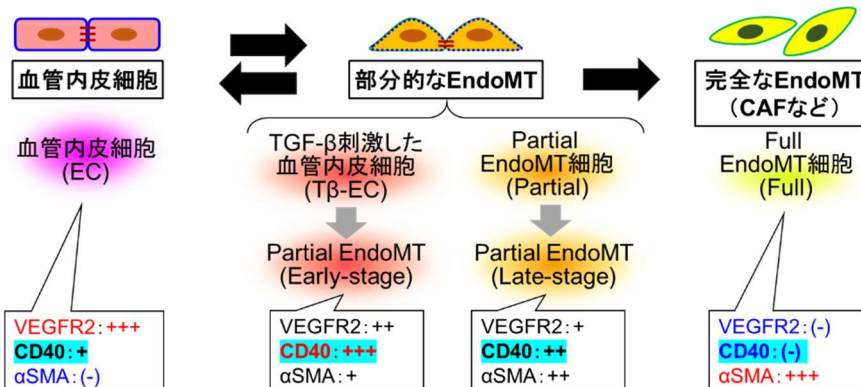


図5 本研究の成果

EndoMT レポーター細胞を用いた本実験系は、EndoMT 移行段階を検出・分取できる初の解析システムである。この実験系により、EndoMT は段階的に起こっていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして CD40 を同定した。

【用語の説明】

※¹トランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β : TGF- β) : 線維芽細胞の形質転換を促進する因子として同定されたが、現在では多くの種類の細胞に対して増殖抑制作用を有することが明らかになっている。さらに、細胞の分化・運動などにも関与し、個体発生やがんの浸潤・転移など様々な病態生理学的現象において重要な役割を果たすことがわかっている。TGF- β は TGF- β 1~3 の3つのアイソフォーム(構造が類似したタンパク質のメンバー)からなるファミリーを形成している。

※² 内皮間葉移行 (endothelial-mesenchymal transition : EndoMT) ・上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) : それぞれ、内皮細胞や上皮細胞の特性を保つための遺伝子の発現が低下して周囲細胞との細胞接着機能を失うと同時に、間葉系細胞に特徴的な遺伝子の発現が上昇することで遊走・浸潤能を獲得することにより、内皮細胞・上皮細胞が間葉系様細胞に分化転換すること。個体の発生においては弁形成 (EndoMT) や中胚葉形成・神経管形成 (EMT) などの重要な役割を果たしているが、疾患の発症にも強く関連している。

※³ CD40 (Cluster of differentiation 40) : B 細胞や樹状細胞、血管内皮細胞などに発現する腫瘍壊死因子受容体 (Tumor Necrosis Factor Receptor) ファミリーの1つ。CD40 は、T 細胞に発現する CD40 リガンド (CD40L) と相互作用することで、B 細胞の増殖や樹状細胞の成熟などを引き起こす。血管内皮細胞において発現する CD40 は血管新生やアテローム性動脈硬化症等の発症に重要な役割を果たす。

※⁴ 腫瘍血管新生 : 腫瘍が成長するためには栄養と酸素を供給して老廃物・代謝産物を運び出すことが必要であり、腫瘍内への新しい血管の侵入、すなわち血管新生が必要となる。血管新生は血管内皮増殖因子 (VEGF) などにより制御され、腫瘍内に侵入した新生血管はがん細胞の遠隔臓器への転移の主要経路となる。

【論文情報】

掲載誌: Cancer Science

論文タイトル: CD40 is expressed in the subsets of endothelial cells undergoing partial EndoMT in tumor microenvironment

【研究者プロフィール】

高橋 和樹 (タカハシ カズキ) Takahashi Kazuki

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

病態生化学分野 連携研究員

東京大学生産技術研究所

機械・生体系部門 日本学術振興会特別研究員

・研究領域

がん生物学、生化学、血管生物学



小林 美穂 (コバヤシ ミホ) Kobayashi, Miho
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
病態生化学分野 助教

・研究領域

血管生物学、細胞生物学、生化学



渡部 徹郎 (ワタベ テツロウ) Watabe Tetsuro
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
病態生化学分野 教授

・研究領域

がん生物学、血管生物学、生化学



【問い合わせ先】

＜研究に関すること＞

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
病態生化学分野 渡部 徹郎 (ワタベ テツロウ)
TEL:03-5803-5449 FAX:03-5803-0187
E-mail: t-watabe.bch@tmd.ac.jp

＜報道に関すること＞

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係
〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45
TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272
E-mail:kouhou.adm@tmd.ac.jp