

## 論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍微小環境における EndMT 制御機構の解明

氏名 永井直

### 【序論】

腫瘍内では血管内皮細胞・線維芽細胞といった間質細胞ががん細胞を取り巻いており、がん細胞と密接に相互作用することによって腫瘍の進展に重要な役割を果たす。例えば、間葉系細胞である線維芽細胞は腫瘍内で異常に活性化し、液性因子や細胞外マトリックスの産生を介して腫瘍の進展をサポートすることがよく研究されている。こうした線維芽細胞は腫瘍関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast; CAF) と呼ばれる。

内皮間葉転換 (Endothelial-to-mesenchymal transition; EndMT) は、内皮細胞が間葉系細胞へと分化転換する現象である。生理的条件下においては胚発生期の心臓形成過程で見られる現象であるが、がんや線維症などの病的環境下においても誘導されることが近年報告されている。2007年、Zeisbergらのグループは、腫瘍内に見られるCAFの一部が血管内皮細胞のEndMTに由来することを報告した。すなわち、腫瘍内の血管内皮細胞がEndMTを経て間葉系細胞様に変化することによって、腫瘍の進展を促進する可能性を提唱した。しかしながら、腫瘍内におけるEndMTの制御原理、ならびに腫瘍内EndMTによる腫瘍進展への寄与の実際は明らかとなっていない。

本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞において、血管内皮細胞に高発現する2つのETSファミリー転写因子ERGおよびFLI1をダブルノックダウンすることによりEndMTを誘導できることを見出した。そこで、この知見を基に上記の不明点を解決することを目的としている。

### 【方法と結果】

#### 1. ヒト臍帯静脈内皮細胞において、ERGおよびFLI1の発現低下がEndMTを誘導する

一般にEndMTは、血管内皮細胞に特徴的な分子(血管内皮マーカー)の発現低下および間葉系細胞に特徴的な分子(間葉マーカー)の発現上昇によって定義付けられる。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、siRNAを用いてERGあるいはFLI1をノックダウンし、血管内皮マーカーおよび間葉マーカーの発現レベルの変化を解析した。その結果、mRNAレベル(qPCR、遺伝子発現マイクロアレイ)、蛋白質レベル(FACS、免疫染色)の双方で、ERGおよびFLI1をダブルノックダウンすることによりEndMTが誘導されることを見出した(図1)。

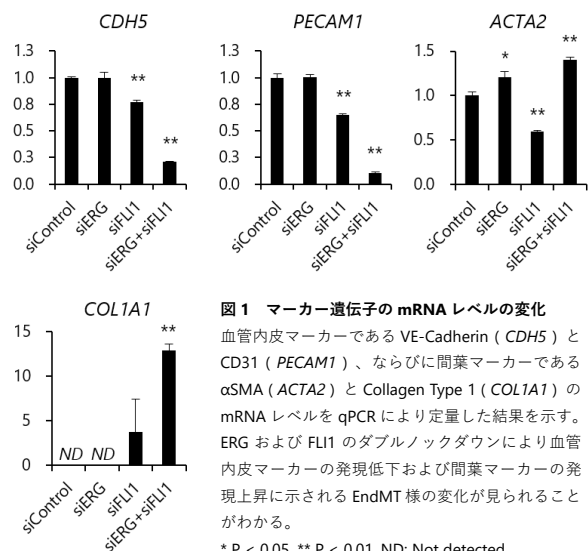


図1 マーカー遺伝子の mRNA レベルの変化  
血管内皮マーカーである VE-Cadherin (CDH5) と CD31 (PECAM1)、ならびに間葉マーカーである  $\alpha$ SMA (ACTA2) と Collagen Type 1 (COL1A1) の mRNA レベルを qPCR により定量した結果を示す。ERG および FLI1 のダブルノックダウンにより血管内皮マーカーの発現低下および間葉マーカーの発現上昇に示される EndMT 様の変化が見られることがわかる。  
\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, ND: Not detected

## 2. ERG/FLI1 が転写を活性化する血管内皮細胞特異的遺伝子群および microRNA-126 の発現低下が、EndMT の誘導に重要である

次に、ERG および FLI1 をダブルノックダウンすることによって EndMT が誘導される機序を明らかにするため、血管内皮細胞における両転写因子の機能解析を試みた。そこで、1) ERG/FLI1 のゲノム上の結合部位の探索 (ChIP-seq)、ERG/FLI1 のダブルノックダウン前後における 2) 主要なヒストン修飾の変化 (ChIP-seq) および 3) 遺伝子発現プロファイルの変化 (マイクロアレイ)、の 3 つのゲノムワイドデータを統合的に解析した。その結果、ERG および FLI1 は広範な血管内皮細胞特異的遺伝子群の転写を活性化していることを見出した。このことは、両転写因子の発現低下によって血管内皮細胞に特異的な形質が失われる理由を示しており、EndMT 誘導機序の一端を説明するものである。

さらに、両転写因子が、過去に EndMT を抑制するとの報告がある microRNA-126 (miR-126) の発現を促進していることを見出した。実際に、ERG および FLI1 のダブルノックダウンによって miR-126 の発現が低下する一方で、miR-126 をトランスフェクションすることにより EndMT の誘導を部分的にキャンセルすることができた (図 2)。したがって、ERG および FLI1 の発現低下によって EndMT が誘導される機序のひとつに、miR-126 の発現低下があることが示された。

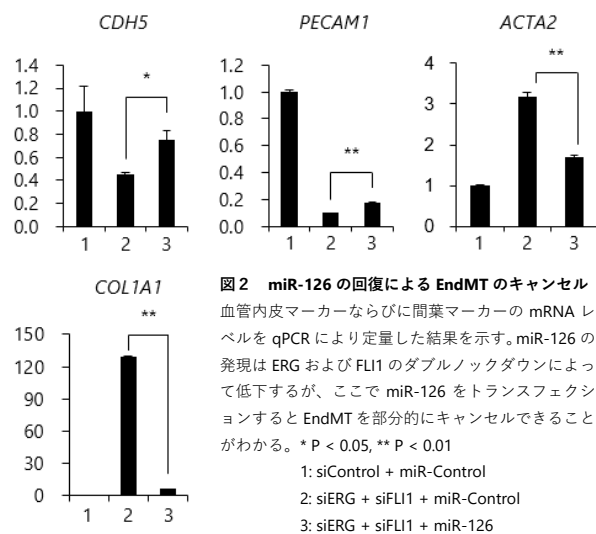


図2 miR-126 の回復による EndMT のキャンセル  
血管内皮マーカーならびに間葉マーカーの mRNA レベルを qPCR により定量した結果を示す。miR-126 の発現は ERG および FLI1 のダブルノックダウンによって低下するが、ここで miR-126 をトランスフェクションすると EndMT を部分的にキャンセルできることがわかる。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01  
1: siControl + miR-Control  
2: siERG + siFLI1 + miR-Control  
3: siERG + siFLI1 + miR-126

## 3. 腫瘍内の血管内皮細胞において、実際に ERG および FLI1 の発現が低下している

これまで *in vitro* で解析してきた EndMT が実際に *in vivo* の腫瘍においても見られるかを解析するため、血管内皮細胞における ERG および FLI1 の発現を免疫染色により解析した。まず、動脈・皮膚における正常な血管内皮細胞を解析した結果、ERG・FLI1 とともに均一かつ強い発現が見られた。一方で、マウスにがん細胞株を移植することによって形成された腫瘍において、一部の血管内皮細胞が ERG および FLI1 の発現を低下していることが観察された (図 3)。

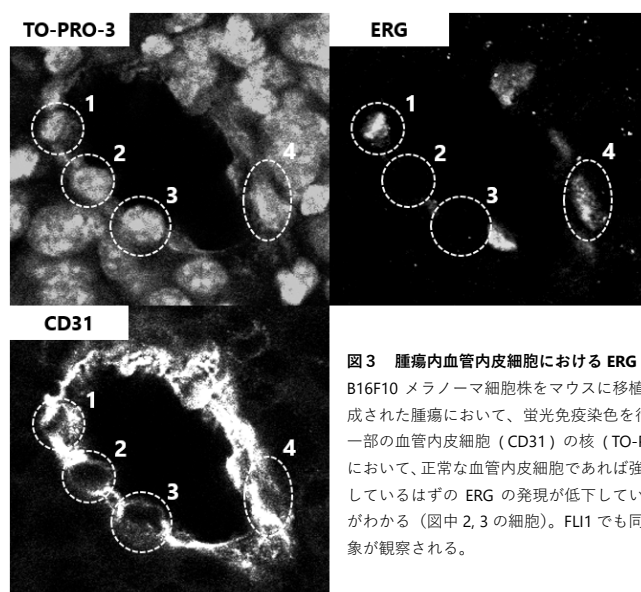


図3 腫瘍内血管内皮細胞における ERG の発現  
B16F10 メラノーマ細胞株をマウスに移植して形成された腫瘍において、蛍光免疫染色を行った。一部の血管内皮細胞 (CD31) の核 (TO-PRO-3) において、正常な血管内皮細胞であれば強く発現しているはずの ERG の発現が低下していることがわかる (図中 2, 3 の細胞)。FLI1 でも同様の現象が観察される。

次に、腫瘍内で ERG および FLI1 の発現が低下する原因を探索した。腫瘍組織をコラゲナ

一ゼ処理することによって得られた細胞群を培養し、そこから取得した培養上清で HUVEC を刺激した結果、ERG および FLI1 の発現が低下することを見出した。したがって、ERG および FLI1 の発現が低下するのは、腫瘍内の細胞が分泌する液性因子の作用に因るものであることが示された。

#### 4. 腫瘍内の EndMT は、がんの転移を促進する機序となり得る

EndMT が腫瘍の進展に寄与するかを解析するため、腫瘍内の細胞間コミュニケーションを想定した *in vitro* 解析を行った。EndMT を経た血管内皮細胞がケモカインを始めとする種々の細胞誘引物質を発現していることに注目した結果、EndMT を経た HUVEC ががん細胞を強く誘引できることをトランスウェルアッセイにより見出した(図4)。これは、EndMT を経た血管内皮細胞が、がん細胞を血管近傍へと誘導することを示している。さらに、EndMT を経た血管内皮細胞は、VE-Cadherin などの接着分子の発現低下により脆弱な血管壁を形成しているため、がん細胞の血管内への侵入を容易にしていることが推測される。以上のことから、腫瘍内の EndMT はがん細胞の血管近傍への誘導と血管内への侵入、そしてそれに続く遠隔臓器への転移を促進する可能性を示すものと考えられる。

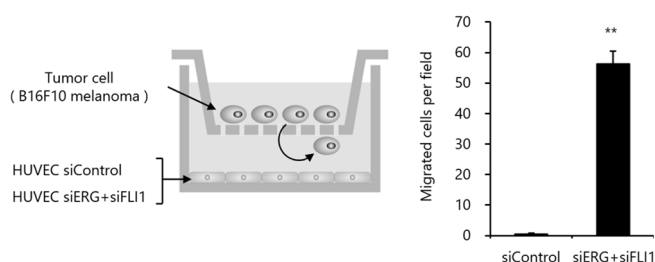


図4 EndMT を経た血管内皮細胞によるがん細胞の誘引

トランスウェルアッセイにより、siERG+siFLI1 処理した HUVEC による B16F10 メラノーマ細胞の誘引能を評価した。このアッセイでは、培養プレートのウェルにセットしたインサート内にがん細胞を播種する。インサートの底には細胞の通れる微小な孔が開いており、下地で培養している細胞に誘引されたがん細胞はインサートの下側へと移動する。この下側へと移動した細胞数を計測することで細胞の誘引を評価できる。EndMT を経た血管内皮細胞はがん細胞を強く誘引することがわかる。\*\*P < 0.01

#### 【まとめと考察】

本研究の要約を図5に示す。

本研究は、EndMT を標的として腫瘍の進展を抑制する新規がん治療戦略アプローチの開発につながるのみならず、線維症・動脈硬化といった EndMT が関与することで知られるがん以外の多くの疾患の治療にも応用できる可能性がある。さらに本研究は、血管内皮細胞における ERG および FLI1 の機能を詳細かつ網羅的に解析したことで、血管内皮細胞の発生・分化や形質維持機構にも知見を与えるものであり、腫瘍生物学・血管生物学にまたがる成果であると考える。

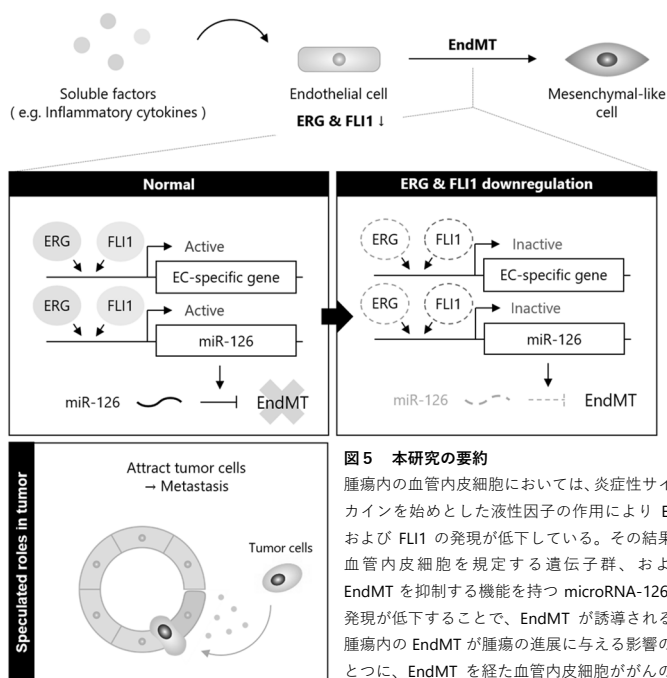


図5 本研究の要約

腫瘍内の血管内皮細胞においては、炎症性サイトカインを始めとした液性因子の作用により ERG および FLI1 の発現が低下している。その結果、血管内皮細胞を規定する遺伝子群、および EndMT を抑制する機能を持つ microRNA-126 の発現が低下することで、EndMT が誘導される。腫瘍内の EndMT が腫瘍の進展に与える影響のひとつに、EndMT を経た血管内皮細胞ががんの転移を促進する可能性を推測している。  
EC: Endothelial cell (血管内皮細胞)