

ハイスループットゼブラフィッシュスクリーニングにより、 カポジ型リンパ管腫症 (KLA) の新たな治療候補を特定

Ivan Bassi¹, Amani Jabali^{2,3}, Naama Farag³, Shany Egozi¹, Noga Moshe¹, Gil S. Leichner³, Polina Geva³, Lotan Levin³, Aviv Barzilai^{2,3}, Camila Avivi⁴, Jonathan Long¹, Jason J. Otterstrom⁵, Yael Paran⁵, Haim Barr⁶, Karina Yaniv^{1*}, Shoshana Greenberger^{2,3*}

1. Department of Immunology & Regenerative Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
2. Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel
3. Department of Dermatology, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Ramat Gan, Israel
4. Department of Pathology, Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Ramat Gan, Israel.
5. IDEA Bio-Medical Ltd., Rehovot 76705, Israel
6. The Maurice and Vivienne Wohl Institute for Drug Discovery, The Nancy and Stephen Grand Israel National Center for Personalized Medicine (INCPM), Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

* Equal contribution, corresponding author

梗概

カポジ型リンパ管腫症 (KLA) は、リンパ管内皮細胞 (LEC) の体細胞活性化 NRAS 変異 (p.Q61R)によって引き起こされる、まれで悪性度の高い不治の病です。KLAの臨床症状を忠実に再現する動物モデルがないため、新しい治療法の開発が妨げられています。今回、私たちは静脈およびリンパ管 EC でヒト NRAS 変異の条件付き発現を促進することで、KLAの新しいゼブラフィッシュモデルを確立しました。変異胚は、心膜浮腫や胸管拡張などのKLAの臨床的特徴を再現し、KLA治療に使用されるMEK阻害剤であるトラメチニブによって表現型が元に戻ることを発見しました。さらに、このモデルをAIベースのハイスループット薬物スクリーニングプラットフォームと組み合わせて活用し、変異表現型を選択的に元に戻す小さな化合物を検索し、FDA承認のチロシンキナーゼ阻害剤であるカボザニチブと、競合的pan-Akt ナーゼ阻害剤である GSK690693を主要なヒットとして特定しました。最後に、KLA 患者由来の培養細胞でこれらの薬剤をテストし、LEC発芽を正常化し、NRAS下流経路をブロックする能力を実証し、GSK690693とカボザニチブが潜在的なKLA治療薬として有望であることを強調しました。全体として、私たちの新しいゼブラフィッシュモデルは、KLAの病因の研究と新しい治療方法の特定に貴重なツールを提供します。

タイトル: カポジ型リンパ管腫症 (KLA) のハイスループットゼブラフィッシュスクリーニング

はじめに

カポジ型リンパ管腫症 (KLA) は、まれな浸潤性、多巣性、またはびまん性のリンパ管奇形であり、全身性リンパ管異常 (GLA) の新しいサブタイプに分類されています¹。診断のほとんどは小児で、平均年齢は8.2歳ですが²、KLAが成人で同様の症状を示すという報告もまれにあります³。KLAの臨床症状には、皮下および縦隔の腫瘍、出血、胸水などがあります。KLAによる死亡率は高く、心肺不全が患者の死亡原因の第1位となっています⁴。KLAに対する現在の薬物治療、たとえばラパマイシン (シロリムス)⁵ や MEK 阻害剤⁶は、臨床的な改善と生存率の潜在的上昇をもたらしています⁷。しかし、これらの治療に対する反応は患者によって異なり、KLAの全体的な生存率は依然として残念なほど低いまです。さらに、標準的な治療法⁴はまだ存在せず、KLAを管理するための効果的な医療介入が極めて重要であることが強調されています。

我々は以前の研究で、GLA/KLA患者の関与する組織から採取したリンパ管内皮細胞 (LEC) における体細胞活性化NRAS変異 (p.Q61R) を初めて特定しました⁸。Q61R変異は、位置61のアミノ酸置換 (グルタミン (Q) からアルギニン (R)) をもたらします。このホットスポット変異はNRASタンパク質のGTP結合領域内にあり、GTP結合NRASの増加をもたらします^{9,10}。これはその後、RAS-MAPKおよびPI3K-AKT-mTOR下流経路の恒常的活性化につながり¹¹、細胞の成長、生存、および浸潤を促進します。我々の当初の結果はin vitroでさらに再現され¹²、近年実施されたKLA患者のゲノム評価により、ほとんどの場合でRas経路、特にNRASが疾患の原因である可能性がさらに特定されました^{13,14}。

KLAの病因の根底にある分子メカニズムの理解の進歩と、それに続く新しい治療法の開発は、KLAで観察される多様な臨床症状を忠実に再現できる信頼性の高い動物モデルの欠如によって妨げられています。私たち以前の研究では、ヒトNRASの変異型が一過性に全内皮細胞で過剰発現した後、ゼブラフィッシュの血液とリンパ管の異常な発達を実証され、KLAを研究するための有利なモデルとしてのゼブラフィッシュの可能性が強調されました⁸。ゼブラフィッシュは、外部発達が速く、光学的に透明で、子孫の数が多く、遺伝子操作の戦略が簡単なため、ヒトの疾患をモデル化するための優れた手段となります。さらに、in vitroスクリーニングの規模とスループットを動物研究の生理学的複雑さと組み合わせることで、ゼブラフィッシュはすでにいくつかの表現型に基づく新薬発見に成功しています¹⁵。例えば最近では、ヒトの変異^{16,17}を持つゼブラフィッシュの胚で実施されたハイスループット薬物スクリーニングを通じて、リンパ系異常の命を救う治療法が特定され、ゼブラフィッシュに基づく研究が疾患の分子メカニズムを識別し、それを臨床に応用する可能性を浮き彫りにしました。

ゼブラフィッシュは、他の脊椎動物に見られるリンパ管と多くの特徴を共有するリンパ系を有しています¹⁸。これには、適切なリンパ管形成のためのProx1転写因子の必要性^{19,20}や、ヒトリンパ管のゴールドスタンダードマーカーである*Lyve1*のゼブラフィッシュ相同遺伝子である*lyve1b*の発現^{21,23}が含まれます。ゼブラフィッシュ胚のライブイメージング

により、受精後 2 日目に胚の正中線に沿って形成される傍脊索細胞 (PAC) がリンパ系の構成要素として機能することが確認されました^{18,19}。受精後 2.5 日で、PAC は腹側に移動し、主要なリンパ管である胸管 (TD) を生成します。胸管は、哺乳類の解剖学的位置に似ており、魚の胴体に沿って大動脈 (DA) と主静脈 (CV) の間を走ります。

ここでは、静脈およびリンパ EC でヒト NRAS の変異型 (p.Q61R) (*hNRASmut*) の条件付き発現を促進することにより、KLA の新しいゼブラフィッシュモデルの確立について説明します。2dpf のゼブラフィッシュ胚で *hNRASmut* 発現を誘導すると、心膜浮腫と顕著に拡張した TD が起こり、ヒト KLA の臨床症状の一部を再現することを示します。さらに、現在臨床で使用されている MEK 阻害剤トラメチニブによる治療により、変異に関連するすべての表現型が効果的に回復し、モデルの適合性が確認されることを実証します。さらに、このシステムを活用して、変異表現型を選択的に元に戻す小さな化合物をスクリーニングし、FDA 承認のチロシンキナーゼ阻害剤であるカボザンチニブと競合的汎 Akt キナーゼ阻害剤である GSK690693 を主要なヒットとして特定しました。最後に、これらの薬剤を KLA 患者由来の培養細胞でテストし、LEC の発芽を正常化し、NRAS 経路をブロックする能力を実証し、GSK690693 とカボザンチニブが KLA 治療の新たな治療手段としての可能性を強調しました。

結果

eKLA の条件付きゼブラフィッシュモデルを確立するために、まず UAS プロモーター下でヒト NRAS の wt および変異体を発現させました (図 S1A)。新しく生成された *Tg(UAS:hNRASp.Q61R)* フィッシュ (以下 *hNRASmut*) は、最初に *TgBAC(prox1a:KALTA4;4xUAS-E1B:TagRFP)*^{24,25} と交配され、LEC で *UAS:NRAS wt* および変異体コンストラクトの構成的発現を促進しました。5dpf で、*prox1a:KALTA4;hNRASmut* 幼生は、体の腫れや顕著な心膜浮腫などの重大な欠陥を示しました (S1B、C 赤矢印)。共焦点画像では、後主静脈 (PCV) が著しく拡張し、節間血管 (ISV) が虚脱または欠損しているなど、血管系が著しく奇形化していることも明らかになりました (図 S1D、E)。*prox1a* 遺伝子がニューロンや体節などの組織にも広く発現し、初期胚に見られること²⁶から、これらの表現型の一部は、異所性 NRAS 発現による全体的な毒性から生じているのではないかと考えました。これを克服するため、*Tg(UAS:hNRAS)wt* および変異体動物と、静脈および LEC 特異的プロモーター *lyve1b*^{22,24} の制御下で Gal4 転写活性化因子を発現する魚類を交配し、KLA の条件付き誘導モデルを作成しました。早期致死および/または毒性を回避するために、*Gal4* コンストラクトをエストロゲン受容体バリエーション (ERT2) (以下、*Tg(lyve1b:Gal4ERT2)*) と融合しました。4-ヒドロキシタモキシフェンを投与すると、ERT2 は急速に活性化され、UAS コンストラクト^{25,27} の発現を誘導します。図 1A-B' に示すように、受精後 24 時間 (hpf) の静脈およびリンパ EC での *hNRASwt* の標的発現は、5dpf で目立った欠陥を引き起こしませんでした。対照的に、同じ EC 集団に *hNRASmut* が存在すると、顕著な心膜浮腫を伴う重度の腫脹した胚が発生しました (図 1C、C'、赤い破線)。心膜面積の測定により、*hNRASmut* 胚は wt および *hNRASwt* を発現する対応する胚と比較して 4 倍の増加を示しました (図 1D)。興味深いことに、48hpf での *hNRASmut* の活性化は、胚の正常な発達に影響を与えず、24hpf での誘導後に観察されたように、全体的な体の形態の変化や心膜浮腫を引き起こさないことに気付きました (図 S1F)。

次に、リンパ管 (*Tg(lyve1b:dsRed)*) と血液 (*Tg(kdrl:TagBFP)*) の血管を強調する二重蛍光レポーターを用いて、*Tg(lyve1b:Gal4^{ERT2};UAS:hNRAS^{wt})*と *Tg(lyve1b:Gal4^{ERT2};UAS:hNRAS^{mut})*の魚を交配させ、発達中の血管系に対する *hNRAS^{mut}* 発現の影響を調査しました。共焦点画像により、静脈およびリンパECにおける *hNRAS^{mut}* の発現は5dpfで異常な拡張TDを引き起こしましたが、*hNRAS^{wt}* の発現は引き起こしませんでした(図1E-H、TDは黄色でマーク)。対照的に、DAおよびPCVの口径および形態に欠陥は見られませんでした(図S1G、H)。これは、変異NRASの発現がリンパ内皮に特異的に影響を与えることを裏付けています。注目すべきことに、突然変異を発現するすべての胚が両方の症状を示したことから、心膜浮腫と拡張型TD表現型の間には完全な相関関係が観察されました。

ゼブラフィッシュでは、魚類のリンパ系の構成要素として機能する水平筋隔膜レベルに位置するリンパ前駆細胞 (PAC) からの芽の移動および合体後にTDが形成されます^{19,28}。変異によって影響を受けるTD形成段階についての洞察を得るため、まず3.5dpfにおけるPACの数を評価しました。図S1I-Kに示すように、wt幼生と*hNRAS^{mut}*幼生を比較しても有意差は検出されず、変異がLEC前駆細胞がCVから芽生えてHMに到達する能力に影響を与えないことを示唆しています。次に、24hpfでの誘導後、60-120hpfの間のタイムラプスで*Tg(lyve1b:DsRed);hNRAS^{mut}/wt*を画像化しました(ビデオS1)。約 60hpf から、PACの芽はHMの位置から背側および腹側に移動し始め、ISVに沿って背側縦走リンパ管(DLLV)²⁹とDA¹⁹のすぐ腹側にTDを形成します。タイムラプスシリーズから抽出したスナップショットに見られるように、約75hpf でwt幼生に形成中のTDを検出できました (図S1L)。ただし、この段階では、*hNRAS^{mut}*幼生のTDはすでにわずかに拡大しているように見え(図S1M')、出現中のPACの芽も同様に拡大しています(図S1M'、青矢印)。この表現型は、発達が進むにつれてより顕著になります(図S1 L'、M')。興味深いことに、約90hpfで、*hNRAS^{mut}*幼生は完全なDLLVを確立できないことにも気付きました (図S1M"、白いアスタリスク)。これは、wt兄弟ではこの段階で完全に確立されているように見えます (図S1L"、白い矢印)。総合すると、これらの結果は、24hpfでのCV-ECでの*hNRAS^{p.Q61R}*変異の誘導は、LEC前駆細胞の仕様や分化には影響せず、むしろその後の増殖、移動、および/または細胞形態に影響を与えることを示唆しています。

最近の研究では、MEK阻害剤がヒトおよびゼブラフィッシュの複雑リンパ管異常(CLA)に良い影響を与えることが報告されています^{17,30}。そこで、トラメチニブ治療が*hNRAS^{mut}*変異体幼生のリンパ系表現型を効果的に回復させるかどうかを検討しました。24 hpfで *hNRAS^{mut}/wt*発現を誘導した後、24時間後にトラメチニブを胚水に加え、5dpfで形態学的分析を行いました(図2A)。図2B-Fに示すように、トラメチニブ治療により、wt胚の正常な発達に影響を与えることなく、*hNRAS^{mut}*幼生の腫脹した体と心膜浮腫の表現型が完全に回復しました(図2C、C'、F)。さらに、*Tg(lyve1b:dsRed;kdrl:TagBFP)*幼生の共焦点画像では、トラメチニブ治療によりTD拡張が大幅に回復したことが示されています(図2G-J'、TDは黄色でマークされ、Kで定量化されています)。

全体的に、拡張したリンパ管や心膜浮腫などのゼブラフィッシュ *hNRAS^{mut}*幼生で観察される表現型特性は、トラメチニブ治療に対する肯定的な反応と並んで、ヒト患者で見られるKLAの特性を反映しており、KLA研究に対する当モデルの妥当性を強く裏付けています。

CLA全般、特にKLAに対する特異的な治療法がない重要な要因は、潜在的な治療薬を効率的にテストできる適切な動物モデルがないことです。そこで私たちは、新しく作成した*hNRASmut*ゼブラフィッシュモデルの容易に区別できる表現型を利用して、KLAの安全で効果的な治療法を特定しようとしてしました。この目的のために、私たちは、ハイコンテンツイメージングと、ゼブラフィッシュ幼生全体の明視野画像を分析するように設計されたディープラーニングベースのAIアルゴリズムを組み合わせた、ハイスループット薬物スクリーニングプラットフォームを考案しました (WiSoft® Athena ソフトウェア、詳細については「材料と方法」および³¹を参照)。最初に、5 dpf *hNRASwt* および *hNRASmut* 幼生 (トラメチニブの有無にかかわらず) を使用してシステムをセットアップし、以前にトレーニングしたAIアルゴリズム³¹を調整しました。トラメチニブで処理した幼生は「レスキュー」の陽性ベンチマークと見なされ、未処理またはDMSOで処理した幼生は陰性対照として使用されました (図3A-D)。自動画像分析には、眼数と尾数が1である魚として定義される、横向きの魚のみを使用しました。画像は最初にAIベースのセグメンテーションを使用して分析され、幼生の外側の輪郭と3つの体区画 (頭、胴体、尾) の推定マスクが定義されました。その後、マスクはアンカーポイントを調整するか、描画ツールを使用して拡張することにより手動で編集されました。魚の輪郭を区切る手動で注釈が付けられたマスク (図3A-D、赤い輪郭) を使用して、AIアルゴリズムを再トレーニングし、表現型を定量化する改良された検出モデルを作成しました。パイロット実験のデータにより、「幼生の総面積」 (図3E) が、表現型が野生型と突然変異型の動物を区別するための最も効果的な尺度として重要であることが明らかになりました。そのため、このパラメーターをその後のすべての実験の分析に適用しました。スクリーニングの第1ラウンドでは、既知のNRASターゲットとの関連性に基づいて選択された126の化合物のライブラリ (表1、図S2A) を作成し、1 μ M の濃度で追加しました。このコホートから、アルゴリズムは35の化合物を、総幼生面積をwtグループと同等のレベルまで減らすのに著しく効果的であると自動的に特定しました (表2)。これらのヒットは2回目の検証ラウンド (図S2B-E) にかけて、その終わりまでに、「総胚面積」を平均寸法に戻すのに最も効果的な4つの化合物を特定しました。GSK690693、ベラパミル、カボザンチニブ、コビメチニブです (図3F-L)。

次のスクリーニングフェーズでは、3つの異なる用量への曝露後のTD形成を分析することにより、主要なヒットの有効性と特異性を判断することに重点を置きました。共焦点画像では、用量依存性にわずかな違いはあるものの、*hNRASmut*幼生の拡張TD表現型の回復に特に効果的である3つの化合物、GSK690693、ベラパミル、カボザンチニブが強調表示されました (図4)。競合的pan-Akt阻害剤³²であるGSK690693は、0.5および1 μ Mの濃度ではTD拡張表現型を回復しませんでした (図4C-E、G)。一方、2 μ M処理ではTD正常化が見られました (図4F、G)。

ベラパミルは高血圧の治療に使用されるカルシウムチャネル遮断薬です³³。この化合物に曝露された胚は、低用量では比較的穏やかな効果を示し (図4K、N)、最高用量ではTD口径の完全な回復を示しました (図4L-N)。また、MET、VEGFR2、FLT3、c-KITなど、幅広い標的を持つ受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるカボザンチニブも評価しました。カボザンチニブは現在、甲状腺髄様癌、腎細胞癌、肝細胞癌の治療薬としてFDAの承認を受けています³⁴。GSK690693と同様に、0.5 μ Mの用量では効果がなく、胚は未処理の*hNRASmut*サンプルと同等のTD直径を示しました (図4Q、R、U)。一方、1 μ Mと2 μ Mの両方で表現型の完全な回復が見られました (図4S-U)。最後に、共焦点イメージング解析に基づくと、コビメチニブはリンパ表現型の回復に失敗しました (図S2F-L)。

選択した化合物がKLAの治療薬として有効であることを確認するために、KLA患者の罹患組織から分離したNRAS p.Q61R変異LECにおけるLECの芽生えを阻害する能力を試験しました。私たちは、生体内での芽生えリンパ管新生の重要な特徴を再現する

スフェロイドベースの芽生えアッセイを使用しました³⁵。以前の研究では、培養された KLA LEC8と変異NRASp.Q61Rを発現するように形質転換されたヒト真皮 LEC(HDLEC)³⁶で芽の数が増加したことが実証されています。図5に示すように、スクリーニングヒットのカボザンチニブとGSK690693は、芽の数を減らすのにトラメチニブと同等に効果的であることがわかりました(図5A-C、F)。さらに、どちらも pERK(図5I) レベルに影響を与えることなく、p-S6 (図 5G、H) の大幅な減少を引き起こしました。興味深いことに、ベラパミルはゼブラフィッシュの表現型を逆転させるのに効果的でしたが、KLA細胞の発芽 (図 5E) や p-S6 およびp-ERKレベル(図 5G-I)には影響を及ぼしませんでした。

次に、GSK690693とカボザンチニブのプラス効果がこれらの化合物に特有のものか、それとも同じファミリーに属し同じ経路を阻害する他の薬剤に広く共通するものなのかを検討しました。実際、他のRTK³⁷の中でも血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) 1、2、3を標的とするTKIであるニンテダニブは、LECの発芽 (図 5B) と p-S6レベル (図 5G、H、カボザンチニブと同様) に対して顕著な阻害効果を示しました。GSK690693がPI3K-AKT-mTORに対して示したプラス効果を検証し、さらに拡大するために、アルペリシブ(PI3K 阻害剤)、コパンリシブ (PI3K 阻害剤)、トリシリビン (AKT 阻害剤) を試験しました。これらはすべて、LECの発芽とp-S6を同等のレベルで阻害しました。興味深いことに、2つのMEK阻害剤 (コビメチニブとレファメチニブ) は、ERKリン酸化を抑制するものの、発芽を阻害しませんでした。

最後に、KLA 患者の組織を pAKT および pERK 抗体で染色し、これらの経路の*in situ*での活性化について洞察を得ました。虫垂はポドプラニンの陽性対照として、結腸癌は pAKT³⁸およびpERK³⁹染色の陽性対照として機能しました。図S3A-Bに示すように、pAKT とpERKの両方がKLA異常リンパ管で検出されています。ただし、pAKTレベルはより特異的であり、ポドプラニン+リンパ管に限定されています。

総合すると、私たちの結果は、KLA の病態生理学を研究し、新しい治療法を特定する上で、私たちの新しいゼブラフィッシュ モデルが適していることを示しています。さらに、ゼブラフィッシュとヒトのアッセイを組み合わせることで、チロシンキナーゼ阻害と PI3K-AKT 阻害が、KLA を治療するための潜在的な薬理的治療法として注目されています。

検討

ゼブラフィッシュで KLA をモデル化するために、prox1a プロモーターの制御下でヒトNRASの変異体または野生型を恒常的に発現するprox1a:KALTA4;hNRASmut/wtと、lyve1bプロモーター下でhNRASmut/wt発現の時空間制御を可能にし、エストロゲン受容体ERT2によって制御されるGAL4-UASシステムに基づく2つのトランスジェニックラインを確立しました。prox1aプロモーターによって駆動される発現は、主にprox1a遺伝子の早期かつ広範な発現による一般的な毒性と非特異的な効果をもたらしましたが、両方のラインが心膜浮腫やTD拡張などのKLAの臨床的特徴を再現することがわかりました。さらに、現在KLA治療の臨床で使用されているMEK阻害剤であるトラメチニブは、変異表現型の反転に非常に効果的であることもわかりました。最後に、126個の化合物をAIベースでスクリーニングした結果、ゼブラフィッシュのリンパ表現型を元に戻し、患者のLEC機能を正常化し、NRAS下流ターゲットのリン酸化を阻害する能力に基づいて、汎AKT阻害剤であるGSK690693とチロシンキナーゼ阻害剤であるカボザンチニブがKLAの治療のための新薬候補として特定されました。

興味深いことに、ベラパミルは用量依存的にゼブラフィッシュの表現型を改善しましたが、患者の異常なLEC発芽や、pAKT、pERK、pS6を介した下流のシグナル伝達を妨げませんでした。カルシウムシグナル伝達は、さまざまなメカニズムによってRas活性(NRAS、HRAS、KRAS)を制御できます⁴⁰。さらに、RASの発癌性変異は、細胞質Ca²⁺シグナルに影響を及ぼすことが示されています^{41,42}。ただし、これらの相互効果は細胞と状況に依存します⁴⁰。したがって、ベラパミルの効果は、ゼブラフィッシュ変異体に存在するリンパ系前駆細胞のサブポピュレーションに限定される可能性があり、これはシト細胞アッセイには存在しません。あるいは、NRAS変異LECにおけるカルシウム調節は、ERK/MAPKカスケード以外のRal/GDSやPLC ϵ ⁴⁰などのさまざまなRasエフェクターと結合し、発芽アッセイでは再現されない機能に影響を与える可能性があります。ベラパミルが単独療法として、またはトラメチニブなどの他の薬剤との併用でKLA表現型を改善できるかどうかを確認するには、今後の臨床研究が必要です。

GSK690693 は、ATP競合性汎Aktキナーゼ阻害剤です。現在までに、いくつかのアロステリックおよびATP競合性AKT阻害剤が合成され、さまざまな癌の臨床試験でテストされています^{43,44}。多数の体細胞変異を示すことが多い腫瘍とは異なり、KLAなどの血管異常は、体細胞単一遺伝子疾患であることが実証されています。したがって、それらの発生と進行には、ドライバー腫瘍タンパク質の存在に依存する可能性が高くなります。実際、ミランセルチブによるAKT阻害は、AKT1の接合後活性化変異体によって引き起こされる過成長疾患であるプロテウス症候群⁴⁵の表現型と、PIK3CA関連過成長スペクトラム(PROSP)の小児2名の表現型を改善し、良好な安全性プロファイルを示しました⁴⁶。

GSK690693 が KLA 表現型を逆転させる効率は、リンパ発達中のRASエフェクターとしてのPI3K/AKT経路の重要な役割を再確認するものであり、マウスモデルフィールドでのRAS/PI3K相互作用の役割に関する以前の研究結果と一致しています⁴⁷。Pik3ca遺伝子のRBDドメインに2つの点変異を導入してRASがPI3Kのp110 α サブユニットに結合できないようにしたマウスを生成すると、ホモ接合変異マウスはリンパ発達不全による乳び腹水のために生後まもなく死亡することが示されました。カボザンチニブはチロシンキナーゼ阻害剤で、小児患者を含むいくつかの悪性腫瘍の治療薬としてFDAの承認を受けています^{34,48}。その標的にはVEGF受容体1、2、3⁴⁹が含まれており、リンパ管新生に対するその効果をさらに裏付けています。副作用は一般的ですが、用量に関連しており、治療中止に至る患者はわずか9～20%です。

興味深いことに、mTOR阻害剤は、私たちのゼブラフィッシュモデルにおける異常なリ

ンパ表現型に対して部分的な効果しか示しませんでした。これらの結果は臨床データと一致しており、患者では完全な反応は得られず、KLA患者の半数のみが部分的な反応を達成しました³⁶。

我々の研究結果は、リンパ管内皮におけるQ61R NRAS変異がKLAの病因に果たす役割が以前から特定されていたことを再確認するものです。実際、この変異はほとんどのKLA患者の罹患組織および体液で特定されています⁵⁰。しかし、変異の出現時期は依然としてほとんどわかっていません。ほとんどの患者の発症年齢が若いことと、この疾患が多巣性であることから、この変異は胚発生の初期段階で発生する可能性があります。変異が表現型を発揮するために必要な特定の「時間枠」に関する我々の研究結果は、この仮説を裏付けるものかもしれません。

ゼブラフィッシュモデルの使用にはいくつかの制限があります。まず、成体ゼブラフィッシュの顕微鏡画像化は依然として非常に難しいため、初期の胚/幼生段階に焦点を当てています。したがって、成体動物で同様の薬効が見られるかどうかを判断するには、

他の動物モデルでテストする必要があります。さらに、ゼブラフィッシュへの薬物投与は胚水への添加によって優先的に行われるため、このモデルでは不溶性薬物の薬物スクリーニングが依然として困難です。最後に、ゼブラフィッシュの生理機能は、薬物の吸収と分布に影響を与える可能性のある最適温度や呼吸システムなど、哺乳類と比較して進化の相違点を示しており、哺乳類システムでの薬物動態をさらに特徴付けることが重要になります。それでも、ゼブラフィッシュベースのスクリーニングで特定されたリード候補のうち2つがKLA細胞の発芽表現型をうまく逆転させたことを示す私たちの結果は、KLA治療の新規治療手段の前臨床薬物評価に対するこのモデルの関連性を強く強調しています。

謝辞

著者らは、技術的支援をいただいた H. Hasid および Y. Yogev (ワイツマン研究所、イスラエル)、魚の素晴らしい世話をしてくださった G. Almog、R. Hofi、A. Glozman、および R. Brihon (ワイツマン研究所、イスラエル)、免疫染色の支援をしてくださった A. Pavlovsky (シェバ医療センター病理学研究所)、化合物プレートの調製をしてくださった G. Cohen (Wohl 創薬研究所)、化学データベースの検索をしてくださった E. Ben Zeev (G-INCPM 医薬化学) に感謝の意を表します。この研究は、ケンタッキー州への ERC CoG (LymphMap 818858)、ペンシルバニア大学孤児疾患センターからケンタッキー州への Million Dollar Bike Ride Grant (MDBR-23-021-CLA)、ケンタッキー州への Weizmann SABRA – Yeda-Sela – WRC プログラム、エミール・ミムラン財団、モーリス・アンド・ヴィヴィアン・ウォール生物学基金、ケンタッキー州への Brenden-Mann Women's Innovation Impact Fund、SG への Lymphatic Malformation Institute 助成金、SG への Orphan Disease Center 2018 Million Dollar Bike Ride、および SG への Talpiot Medical Leadership 助成金、シェバ医療センターから SG への助成を受けて実施されました。K.Y. は、カンター・ジョン・Y・ジェイドを偲んでエニッド・バーデンおよびアーロン・J・ジェイド教授職に就いています。I.B.セルジオ・ロンブローゾ・プログラムのポスドク研究員およびワイツマン研究所の上級ポスドク研究員として支援を受けています。N.M. はオルガ・クライン・アストラチャン財団およびマディ・デクラー財団から研究助成金を受けています。

著者の貢献

I.B.は実験を設計および実施し、データを分析し、原稿を共同執筆しました。A.J.、S.E.、N.F.、J.L. は実験とデータ分析を実施しました。G.L は実験を設計および実施し、データを分析し、N.F.、P.G.、L.L.、A.B.、および K.A は実験とデータ分析を実施しました。J.J.O. および Y.P. は WiScan® Hermes 自動顕微鏡と WiSoft® Athena ソフトウェアを開発および調整し、薬物スクリーニングを支援しました。N.M. は魚の実験を支援しました。H.B. は薬物スクリーニングを考案および支援しました。K.Y. および S.G. は研究を指揮し、資金を確保し、実験を設計し、データを分析し、すべての著者からの意見を取り入れて論文を共同執筆しました。

Y.P and J.J.O. are employed by IDEA Bio-Medical. Other authors declare no competing interests.

材料と方法

ゼブラフィッシュの飼育、遺伝子組み換えおよび突然変異系統

ゼブラフィッシュは標準的な方法で飼育され、ワイツマン研究所動物実験委員会²³のガイドラインに従って取り扱われました。すべての画像化では、色素形成を阻害するために、受精後8日目から胚に0.003% フェニルチオ尿素 (PTU, Sigma-Aldrich) を処理しました。この研究で使用したゼブラフィッシュの系統は、*Tg(fli1:EGFP)^{yl51}*、*Tg(kdrl:TagBFP)^{mu293}*²⁵、*TgBAC(prox1a:KALTA4,4xUAS-E1B:TagRFP)^{nim5}*^{24c}です。

*Tg(lyve1b:Gal4^{ERT2})*コンストラクトは、*p5E-lyve1b*プロモーター⁵²とERT2配列を組み合わせ、次にGatewayシステムを使用して*pME-Gal4VP16*⁵³と組み合わせることによって生成されました。

*Tg(UAS:hNRAS^{wt})*および*Tg(UAS:hNRAS^{mut})*は、それぞれヒトwtおよびp.Q61R NRAS 変異体をToI2互換ベクターにクローニングすることによって生成されました。得られた構築物は1細胞期にABゼブラフィッシュに注入され、安定した系統⁵⁴が生成されました。

イメージングと画像処理

共焦点イメージングは、水浸型×20/1.0 NAまたは×10/0.5 NA対物レンズを装備したZeiss LSM780またはLSM880直立共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) を使用して実施しました。胚は1.5% (w/v) 低融点アガロースを使用してマウントされました。共焦点画像は、ImageJのFiji⁵⁵バージョン (NIH) またはImaris v.9.3 (Bitplane) を使用してオフラインで処理されました。この研究で示されている蛍光画像は、収集されたzシリーズスタックの単一ビュー、2D再構成です。

ゼブラフィッシュ胚の位相差画像は、Nikon DS-Fi3 を搭載した実体顕微鏡 LEICA M165 FC を使用して取得されました。

薬物スクリーニングのために、胚は透明なガラス底の96ウェルプレート (ZFプレート、三重県橋本市) で培養されました。透過光画像は、高開口数 (NA)³¹の4倍空気対物レンズを備えた高コンテンツ倒立スキャンシステムであるWiScan®Hermes (IDEA Bio-Medical、イスラエル、レホヴォト)を使用して取得されました。各ウェルの画像をつなぎ合わせて、幼生の全身の1つの画像を作成しました。

薬物スクリーニング画像分析は、WiSoft® Athena ソフトウェア ゼブラフィッシュ アプリケーション (IDEA Bio-Medical、イスラエル、レホヴォト)を使用して実施しました。Athenaは、新しいディープラーニングベースのAIアルゴリズムを使用してゼブラフィッシュ幼生全体の明視野画像を分析して、魚の輪郭と、心臓、目、尾、および3つの体区画 (頭、胴体、尾) などの特定の解剖学的構造を、前述のように識別します³¹。目と尾の解剖学的構造は、幼生全体の面積の比較を可能にするために、適切に方向付けられた魚のみを選択するために使用されました。アッセイ開発プロセスでは、WiSoft®Athena ソフトウェアに組み込まれた手動描画ツールを使用して、マスク定義を調整しました。

フモキシフェンの導入と薬物スクリーニング

Tg(lyve1b:Gal4^{ERT2};UAS:hNRAS^{wt}) および *Tg(lyve1b:Gal4^{ERT2}; UAS:hNRAS^{mut})* 幼生を 24 hpf まで飼育し、その時点で 5 μM のタモキシフェンを添加した。48 hpf でタモキシフェンを洗浄し、阻害剤を添加しました。焦点を絞った臨床関連スクリーニングを実行する

ために、まず最新の文献に基づいて126個の標準および非標準NRASターゲットを定義しました(図S3A、B)。Drug Bankデータベースを使用して、キーワードリストとしてNRASターゲットを持つ化合物をマイニングしました。次に、承認状態(臨床的に承認された化合物を優先) およびサプライヤーからのターゲット注釈に基づくNRASターゲットとの関連レベルに基づいて化合物に優先順位を付けました。既知の細胞毒性薬CPMは除外しました。ハイスループット薬物スクリーニングは、ゼブラフィッシュと光学的に透明な底部を効率的に位置合わせして画像化できるウェルスリット設計の96ウェルプレート(ZFプレート、三重県橋本市)で実施しました。スクリーニング用の化合物はソースプレートから採取し、Echo555アコースティックトランスファアーキッドハンドラー(Labcyte/Beckman)を使用してアッセイプレートに移しました。各薬物は、橋本プレートに直接添加された1 μ M の濃度でテストされ、その後、魚は28°Cインキュベーター内で暗条件で5日目まで保管され、その後、WiScan®Hermes (IDEA Bio-Medical、イスラエル、レホヴォト)を使用して画像化されました。

ウェスタンブロッティング

KLA 患者のリンパ管内皮細胞の分離と特徴付けについては、以前に記載されています⁸。この研究は、Sheba Medical Centerの機関研究委員会(#8333-10-SMC)によって承認されました。細胞は60X15 mmの皿に60%のコンフルエンスで播種されました。24時間後、細胞は未処理か、または以下のいずれかの薬剤の1 μ Mで処理されました: ベラパミル、カボザンチニブ、ニンテダニブ、アルペリシブ、コパンリシブ、トリシリビン、GSK-690693、コビメチニブ、レファメチニブ、トラメチニブ。24時間インキュベーション後、全細胞溶解物を生成しました。細胞をPBSで2回洗浄し、RIPA溶解バッファーシステム(カタログ番号sc-24948、Santa Cruz Biotechnology、カリフォルニア州、米国)で細胞スクレーパーでこすり落としました。細胞を氷上で緩衝液とともに30分間インキュベートし、その後4°Cで14,000x RPMで30分間遠心分離して細胞残骸を除去しました。タンパク質濃度は、製造元の指示に従ってMicro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific、MA、USA)で測定しました。各細胞ライセートの30 μ gのタンパク質を、Tris-MOPS-SDSランニング緩衝液(Cat. No: M00138、A2S technologies、イスラエル)中の4-20%勾配Bis-Tris-PAGE(SurePAGE™、Bis-Tris、Cat.No: M00657、A2S technologies、イスラエル)で分離し、その後ニトロセルロースシートに転写しました。次に、膜をIntercept Blocking Buffer(Cat.927-60001、LI-COR、NE、USA)で1時間

ブロックしました。次に、メンブレンを一次抗体とともに4°Cで一晩インキュベートしました。蒸留水で1:10に希釈したTBST(カタログ番号002089232300、Bio-Lab、イスラエル)で10分間3回洗浄した後、メンブレンを適切なヤギ抗マウスまたはヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼコンジュゲートとともに室温で1時間インキュベートしました。次に、記載どおりにメンブレンをTBSTで再度洗浄し、ECL基質(WESTAR ANTARES、カタログ番号XLS142,0250、Cyanagen、イタリア)にさらし、ChemIDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad、カリフォルニア州、米国)を使用してシグナルを検出しました。最後に、検出されたバンドの濃度測定分析をImage Labソフトウェア(Bio-Rad、カリフォルニア州、米国)を使用して行いました。使用した一次抗体:モノクローナルウサギ抗リン酸化p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (20G11)(カタログ番号4376S);モノクローナルウサギ抗S6リボソームタンパク質 (5G10) (カタログ番号2217);モノクローナルウサギ抗リン酸化S6リボソームタンパク質 (Ser235/236)(2F9) (カタログ番号4856);(すべてCell Signaling Technology Inc、MA、USAから購入){希釈度1:1000}。モノクローナルマウス抗 β アクチンAC-15(カタログ番号sc-69879);(すべてSanta Cruz Biotechnology、CA、USAから購入){希釈度1:1000}

LEC発芽アッセイ

KLA 患者由来 LECの分離と特性評価については、すでに説明しました⁸。6X10⁵個の細胞を24ウェルディッシュAggreWell400に播種し、EBM2培地でAggreWellRising溶液 (STEMCELL Technologies) を16時間前処理して、約500個の細胞を含むスフェロイドを形成させました。2日目に、スフェロイドを収集し、40µm pluriStrainer (pluriSelect) で濾過して、スフェロイドのサイズが均一になるようにしました。スフェロイドの収量は顕微鏡で定量化し、8~10個のスフェロイドをCultrex Basement Membrane Extract (Trevigen) と混合して、さまざまな処理を加えて最終的なタンパク質濃度が8mg/mlになるようにし、96ウェルプレートの1つのウェルに埋め込みました。翌日、各条件について、合計約50個のスフェロイドに相当する5つのウェルを、Nikon Eclipse TS-100顕微鏡 (10倍対物レンズ) とNikon DS-Fi1カメラを使用して手動で撮影し、芽の数を手動で数えました。

免疫染色

KLA浸潤組織⁸からの FFPEブロックを4で切片化し、スライドの右端に陽性コントロールを追加しました。Phospho-AKT (#9271, Cell Signaling, 米国)、phospho-ERK1/2 (#4376, Cell Signaling, 米国)、およびPodoplanin (M3619, Dako, 米国) 免疫染色プロトコルは、Benchmark Ultra 染色モジュール (Ventana Medical Systems Inc., 米国) で較正しました。スライドは60℃で1時間温めた後、完全に自動化されたプロトコルで処理しました。簡単に説明すると、脱蠟および再水和後、切片は pAKTおよび pERK1/2に対して64分間のCC1 HIER 前処理 (Ventana Medical Systems Inc., 米国) に曝露されました。切片は Podoplaninに対して36分間前処理されました。pAKT抗体 (1:25)、pERK1/2抗体 (1:50)、およびポドプラニン (1:80) をすべて37℃で44分間インキュベートしました。pAKTとpERK1/2は、OptiView検出キット (Ventana Medical Systems) で検出しました。pAKT染色は、OptiView増幅キット (Ventana Medical Systems Inc., 米国) で強化されました。ポドプラニンは、UltraView検出キット (Ventana Medical Systems) で検出しました。その後、すべての切片をヘマトキシリン (Ventana Medical Systems) で対比染色しました。自動実行の最後に、スライドを段階的エタノール (70%、96%、および100%) で脱水しました。カバーガラスをかぶせる前に、切片をキシレンで透明化し、Entellanでマウントしました。

統計分析

2つのサンプルの比較は、特に明記しない限り、少なくとも3つの独立した実験からの等分散を前提とした、対応のない両側Student t検定を使用して行われました。3つ以上のサンプルの統計的有意性は、特に明記しない限り、一元配置分散分析に続いてTukeyまたはDunnnettの多重比較検定によって計算されました。すべてのデータは平均値±SEMとして報告され、Prism6ソフトウェア (GraphPad Software, Incorporated, 米国カリフォルニア州ラホヤ) を使用して分析されました。

References

1. Croteau, S. E. *et al.* Kaposiform lymphangiomatosis: a distinct aggressive lymphatic anomaly. *The Journal of pediatrics* **164**, 383–388 (2014).
2. Perez-Atayde, A. R. *et al.* Kaposiform Lymphangiomatosis: Pathologic Aspects in 43 Patients. *Am J Surg Pathol* **46**, 963–976 (2022).
3. Safi, F. *et al.* Kaposiform Lymphangiomatosis, a Newly Characterized Vascular Anomaly Presenting with Hemoptysis in an Adult Woman. *Annals ATS* **11**, 92–95 (2014).
4. Croteau, S. E. *et al.* Kaposiform Lymphangiomatosis: A Distinct Aggressive Lymphatic Anomaly. *The Journal of Pediatrics* **164**, 383–388 (2014).
5. Zhou, J., Yang, K., Chen, S. & Ji, Y. Sirolimus in the treatment of kaposiform lymphangiomatosis. *Orphanet J Rare Dis* **16**, 260 (2021).
6. Foster, J. B. *et al.* Kaposiform lymphangiomatosis effectively treated with MEK inhibition. *EMBO molecular medicine* **12**, e12324 (2020).
7. McDaniel, C. G. *et al.* Kaposiform lymphangiomatosis: Diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Pediatric Blood & Cancer* **70**, e30219 (2023).
8. Manevitz-Mendelson, E. *et al.* Somatic NRAS mutation in patient with generalized lymphatic anomaly. *Angiogenesis* **21**, 287–298 (2018).
9. Mandalà, M., Merelli, B. & Massi, D. Nras in melanoma: Targeting the undruggable target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **92**, 107–122 (2014).
10. Mor, A. & Philips, M. R. COMPARTMENTALIZED RAS/MAPK SIGNALING. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 771–800 (2006).
11. Boscolo, E. *et al.* Signaling pathways and inhibitors of cells from patients with kaposiform lymphangiomatosis. *Pediatric blood & cancer* **66**, e27790 (2019).
12. Boscolo, E. *et al.* NRASQ61R mutation in human endothelial cells causes vascular malformations. *Angiogenesis* **25**, 331–342 (2022).
13. Barclay, S. F. *et al.* A somatic activating NRAS variant associated with kaposiform lymphangiomatosis. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **21**, 1517–1524 (2019).
14. Ozeki, M. *et al.* Detection of NRAS mutation in cell-free DNA biological fluids from patients with kaposiform lymphangiomatosis. *Orphanet journal of rare diseases* **14**, 215 (2019).
15. Patton, E. E., Zon, L. I. & Langenau, D. M. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 611–628 (2021).
16. Koltowska, K. A zebrafish genetic model enables an invaluable discovery: a lifesaving treatment for a lymphatic anomaly. *Lab Anim* **48**, 305–306 (2019).
17. Li, D. *et al.* ARAF recurrent mutation causes central conducting lymphatic anomaly treatable with a MEK inhibitor. *Nat Med* **25**, 1116–1122 (2019).
18. Semo, J., Nicenboim, J. & Yaniv, K. Development of the lymphatic system: new questions and paradigms. *Development* **143**, 924–35 (2016).
19. Yaniv, K. *et al.* Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nature medicine* **12**, 711–6 (2006).
20. Koltowska, K. *et al.* Vegfc Regulates Bipotential Precursor Division and Prox1 Expression to Promote Lymphatic Identity in Zebrafish. *Cell Rep* **13**, 1828–41 (2015).

21. Oliver, G., Kipnis, J., Randolph, G. J. & Harvey, N. L. The Lymphatic Vasculature in the 21st Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease. *Cell* **182**, 270–296 (2020).
22. Okuda, K. S. *et al.* *lyve1* expression reveals novel lymphatic vessels and new mechanisms for lymphatic vessel development in zebrafish. *Development* **139**, 2381–2391 (2012).
23. Jerafi-Vider, A. *et al.* VEGFC/FLT4-induced cell-cycle arrest mediates sprouting and differentiation of venous and lymphatic endothelial cells. *Cell Reports* **35**, 109255 (2021).
24. Nicenboim, J. *et al.* Lymphatic vessels arise from specialized angioblasts within a venous niche. *Nature* **522**, 56–61 (2015).
25. Das, R. N. *et al.* Generation of specialized blood vessels via lymphatic transdifferentiation. *Nature* **606**, 570–575 (2022).
26. Glasgow, E. & Tomarev, S. I. Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish. *Mechanisms of Development* **76**, 175–178 (1998).
27. Gerety, S. S. *et al.* An inducible transgene expression system for zebrafish and chick. *Development* **140**, 2235–2243 (2013).
28. Jung, H. M. *et al.* Development of the larval lymphatic system in zebrafish. *Development* **144**, 2070–2081 (2017).
29. Hogan, B. M. *et al.* *Ccbe1* is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting. *Nature genetics* **41**, 396–8 (2009).
30. Foster, J. B. *et al.* Kaposiform lymphangiomatosis effectively treated with MEK inhibition. *EMBO molecular medicine* **12**, e12324 (2020).
31. Lubin, A. *et al.* A versatile, automated and high-throughput drug screening platform for zebrafish embryos. *Biology Open* **10**, bio058513 (2021).
32. Levy, D. S., Kahana, J. A. & Kumar, R. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* **113**, 1723–1729 (2009).
33. Reynolds, N. A., Wagstaff, A. J. & Keam, S. J. Trandolapril/verapamil sustained release: a review of its use in the treatment of essential hypertension. *Drugs* **65**, 1893–1914 (2005).
34. Markowitz, J. N. & Fancher, K. M. Cabozantinib: A Multitargeted Oral Tyrosine Kinase Inhibitor. *Pharmacotherapy* **38**, 357–369 (2018).
35. Nowak-Sliwinska, P. *et al.* Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* **21**, 425–532 (2018).
36. Chowers, G. *et al.* Treatment of severe Kaposiform Lymphangiomatosis positive for NRAS mutation by MEK-inhibition. *Pediatr Res* 10.1038/s41390-022-01986-0 (2022) doi:10.1038/s41390-022-01986-0.
37. Wollin, L. *et al.* Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **45**, 1434–1445 (2015).
38. Zhang, Y., Liu, X., Zhang, J., Li, L. & Liu, C. The expression and clinical significance of PI3K, pAkt and VEGF in colon cancer. *Oncology Letters* **4**, 763–766 (2012).
39. Levidou, G. *et al.* ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World J Surg Oncol* **10**, 47 (2012).
40. Cullen, P. J. & Lockyer, P. J. Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 339–348 (2002).

41. Stopa, K. B. *et al.* Driver Mutations of Pancreatic Cancer Affect Ca²⁺ Signaling and ATP Production. *Function (Oxf)* **4**, zqad035 (2023).
42. Pierro, C. *et al.* Oncogenic KRAS suppresses store-operated Ca²⁺ entry and ICRAC through ERK pathway-dependent remodelling of STIM expression in colorectal cancer cell lines. *Cell Calcium* **72**, 70–80 (2018).
43. Coleman, N., Moyers, J. T., Harbery, A., Vivanco, I. & Yap, T. A. Clinical Development of AKT Inhibitors and Associated Predictive Biomarkers to Guide Patient Treatment in Cancer Medicine. *Pharmgenomics Pers Med* **14**, 1517–1535 (2021).
44. Martorana, F. *et al.* AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Frontiers in Pharmacology* **12**, (2021).
45. Keppler-Noreuil, K. M. *et al.* Pharmacodynamic Study of Miransertib in Individuals with Proteus Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **104**, 484–491 (2019).
46. Forde, K. *et al.* Clinical experience with the AKT1 inhibitor miransertib in two children with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **16**, 109 (2021).
47. Gupta, S. *et al.* Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110 α Is Required for Ras-Driven Tumorigenesis in Mice. *Cell* **129**, 957–968 (2007).
48. Maroto, P. *et al.* Cabozantinib for the treatment of solid tumors: a systematic review. *Ther Adv Med Oncol* **14**, 17588359221107112 (2022).
49. Xiang, Q. *et al.* Cabozantinib Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma by a Dual Blockade of VEGFR2 and MET. *Clinical Cancer Research* **20**, 2959–2970 (2014).
50. Ozeki, M. *et al.* Detection of NRAS mutation in cell-free DNA biological fluids from patients with kaposiform lymphangiomatosis. *Orphanet J Rare Dis* **14**, 215 (2019).
51. Gancz, D. *et al.* Distinct origins and molecular mechanisms contribute to lymphatic formation during cardiac growth and regeneration. *Elife* **8**, (2019).
52. Okuda, K. S. *et al.* lyve1 expression reveals novel lymphatic vessels and new mechanisms for lymphatic vessel development in zebrafish. *Development* **139**, 2381–91 (2012).
53. Villefranc, J. A., Amigo, J. & Lawson, N. D. Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish. *Developmental Dynamics* **236**, 3077–3087 (2007).
54. Suster, M. L., Abe, G., Schouw, A. & Kawakami, K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat Protoc* **6**, 1998–2021 (2011).
55. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).

図の説明

図 1. ゼブラフィッシュ KLA モデルの確立と特性。 A-C'. h-NRAS wt (hNRASwt, B, B') または hNRAS p.Q61R (hNRASmut) (C, C') 変異体を過剰発現している Tg(lyve1b:GalERT2) wt 魚 (A, A') の位相差画像。変異幼生のみ、腫れた体 (C) と心膜浮腫 (C', 赤い破線) が見られます。D. 心膜領域の定量化 (n=18、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。E-G'. hNRASmut の誘導後に拡大した胸部リンパ管 (TD) を示す体幹血管の共焦点画像 (G, G')。E'-G' の黄色の破線は TD を表し、E-G の破線の四角は E'-G' で拡大された領域を示します。H. wt, hNRASwt, hNRASmut 幼虫の TD 直径の定量化 (n=18、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。スケールバー: A, B, C = 100 μ m、A', B', C' = 50 μ m、E, F, G = 50 μ m、E', F', G = 50 μ m。エラーバーは平均 $\pm$ 標準誤差です。

図 2. MEK 阻害剤 Trametinib は hNRASmut 誘導表現型を回復します。 A. 薬物試験の実験設計を示す図。B-E'. wt (B-C') および hNRASmut 幼虫 (D-E'), 未処理 (C, C', E, E'), または水に Trametinib を追加した後 (C, C', D, D', D' の赤い破線は心膜領域の拡大を示す) の位相差画像。F. 心膜領域の測定は、Trametinib 処理後の hNRASmut 胚の完全な回復を示しています (n=11、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。G-K. hNRASmut 誘導 (I, I') 後の拡大した TD を示す体幹血管の共焦点画像 (G-J')。これは Trametinib 処理後に回復します (J, J')。トラメチニブの追加は、wt 胚の発達に影響を与えません (C, C')。G'-J' の黄色の線は TD を表し、G-J の破線の四角は G'-J' で拡大された領域を示します。wt, wt + トラメチニブ, hNRASmut, および hNRASmut + トラメチニブ幼虫の TD 平均直径の定量化 (K)。スケールバー: B, C, D, E = 100 μ m、B', C', D', E' = 50 μ m、G, H, I, J = 50 μ m、G', H', I', J' = 100 μ m、エラーバーは平均 $\pm$ s.e.m. です。

図 3. ゼブラフィッシュの NRAS 変異表現型を反転させる低分子化合物のハイスループットスクリーニング。 A-D. WiScan® Hermes で取得し、WiSoft® Athena ゼブラフィッシュアプリケーションでマスクボディセグメンテーションによって処理した、wt, wt + DMSO, hNRASmut, および hNRASmut + トラメチニブ 5 dpf 幼虫の明視野画像。E. 異なるサンプルにおける幼虫の総面積の定量化 (n=26、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。F-L. 5 dpf wt (F), hNRASmut (G), および Cabozantinib (H), GSK690693 (I), Cobimetinib (J), または Verapamil (K) で処理した hNRASmut の明視野画像。処理した幼虫 (L) の全面積が完全に回復していることを示しています (n=10 一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。スケールバー: A-D, F-J = 50 μ m。エラーバーは平均 $\pm$ s.e.m. です。

図 4. 選択された候補は、hNRASmut 幼虫の TD 拡張表現型を効率的に回復します。 A-G. Akt 阻害剤 GSK690693 (GSK) を 0.5 (D), 1 (E), 2 (F) μ M で処理した後の 5 dpf 幼虫の体幹血管の共焦点画像 (G で定量化)。H-N. カルシウムチャネル遮断薬ベラパミルを 0.5 (K), 1 (L), 2 (M) μ M で処理した後の 5 dpf 幼虫の体幹血管の共焦点画像 (N で定量化)。O-U. カボザンチニブを 0.5 (R), 1 (S), 2 (T) μ M で処理した後の 5 dpf 幼虫の体幹血管の共焦点画像 (U で定量化)。A-F, H-M, O-T の黄色の破線は TD を表します。グラフ G, N, U, n=6、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。スケールバー: A-F, H-M, O-T = 50 μ m。エラーバーは平均 $\pm$ 標準誤差です。

図 5. 患者由来細胞での検証。さまざまな薬剤 (2 μ M) で処理した KLA 患者由来 LEC の芽形成の代表的な画像: A. 未処理 (上パネル)、トラメチニブ 0.5 μ M (下パネル)。B. チロシンキナーゼ阻害剤。C. P13K/Akt/mTOR 阻害剤。D. RAS/RAF/MEK/ERK 阻害剤。E. ベラパミル。F. 4 つの独立した実験 (5 つのウェル、条件あたり約 200 個のスフェロイド) から計算された芽の数の定量化。プロットされているのは平均 $\pm$ s.e.m. で、* は $p < 0.05$ を示します。G-I. リン酸化 ERK (p-ERK) およびリン酸化 S6 (p-S6) に対する薬剤 (2 μ M) の効果の WB 分析。プロットは平均 $\pm$ 標準誤差、*は $p < 0.05$ を示す。n=4、一元配置分散分析。スケールバー: A-E= 100 μ m

Supplementary Figure Legends

図 S1. Tg(UAS:hNRAS) ゼブラフィッシュトランスジェニックラインの生成。 A. Tg(UAS:hNRASwt) および Tg(UAS:hNRASmut) トランスジェニックラインを確立するために使用された戦略を示す図。B-E. prox1a プロモーター下での hNRASmut の構成的発現は、心膜浮腫、体部の腫脹 (C)、体幹血管の重度の奇形、および全身毒性 (E) を引き起こします。B-C の破線四角は、D、E で拡大された領域を示します。F. lyve1b:GAL4ERT2 胚における hNRASmut 発現誘導後の形態学的欠陥の定量化 (24 および 48 hpf, N=3, n=20)。G、H. lyve1b:GAL4ERT2 胚における hNRASwt および hNRASmut の誘導後の DA および PCV 口径の定量化 (n=10、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。I-K. 3.5 dpf での wt (I) および hNRASmut (J) 胚の胴体の共焦点画像。PAC の数に有意差は見られず、定量化されています (K, n=4、両側 Student t 検定、 $P=0.83$)。L-M'。Tg(fli1:EGFP; lyve1b:DsRed; lyve1b:GAL4ERT2) wt (L-L') または hNRASmut 発現誘導後 (M-M') の共焦点タイムラプスシリーズから選択された画像。膨張した PAC 芽 (M', 青い矢印)、肥大した TD (M', 黄色の破線)、および DLLV の欠損 (M', アスタリスク) を示しています。L' の白い矢印は正常な DLLV を示しています。スケールバー: B、C = 100 μ m、D、E = 100 μ m、J、K = 50 μ m、L-M' = 100 μ m。エラーバーは平均 $\pm$ s.e.m. です。

図 S2. ゼブラフィッシュの幼生におけるハイスループット薬物スクリーニング。 A. スクリーニング用に選択された NRAS 下流ターゲットを示す図。B-E. WiSoft® Athena ゼブラフィッシュ アプリケーションによるセグメンテーションと分析後の魚の総面積の定量化。各ターゲットグループの代表的な化合物が表示されます (nwt=40、nhNRASmut=40、nwt+単一化合物=6、nhNRASmut+単一化合物=6、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。F-L. コビメチニブ投与後の体幹血管の共焦点画像では、TD 拡張表現型の回復は示されていません (TD は黄色で強調表示されています (n=6、一元配置分散分析、Tukey 事後検定による多重比較)。エラーバーは平均 $\pm$ s.e.m. です。スケールバー: F-L = 50 μ m

図 S3. pAKT および pERK レベルは KLA リンパ管で増加しています。 A. ポドプラニン、pERK、pAKT 染色の陽性対照。B. ポドプラニン、pERK、pAKT 染色のための患者の KLA 関与組織の染色; H = 100 μ m

ビデオ S1: 体幹リンパ管の発達を示す Tg(lyve1b:GAL4ERT2; lyve1b:DsRed) wt (左) および hNRASmut (右) 胚のタイムラプス シリーズ。白い矢印は欠陥のある PAC を示しています。

表1. 試験した化合物のリスト

薬品名	製薬メーカー
SP600125	SIGMA
PHA-767491	selleck
10058-F4	SIGMA
Abemaciclib	SIGMA
Afuresertib	selleck
AICAR (Acadesine)	SIGMA
Alpelisib	selleck
Alvespimycin	SIGMA
Aminosalicylic acid	SIGMA
Apitolisib	selleck
AS-252424	SIGMA
Atorvastatin calcium salt trihydrate	MicroSource
Autophinib	SIGMA
Avermectin B1a	SIGMA
Azathioprine	SIGMA
Baricitinib	SIGMA
BAY 11-7082 (BAY 11-7821)	selleck
Binimetinib	selleck
BIX 02188	selleck
Brigatinib	selleck
Cabozantinib	selleck
Capmatinib	selleck
Celecoxib	selleck
Cobimetinib	selleck
Copanlisib	selleck
Crizotinib	selleck
Dabrafenib	selleck
Danuseritib (PHA-739358)	selleck
Dinaciclib	selleck
Duvelisib	Prestwick
Elesclomol	selleck
Encorafenib	Analyticon
Enzastaurin	selleck
Everolimus	MicroSource
Fasudil HCl (HA-1077)	selleck
Fedratinib	Selleck Chemicals
Fenoprofen calcium	MicroSource
Fingolimod	Selleck
Foretinib (GSK1363089, XL880)	Selleck Chemicals

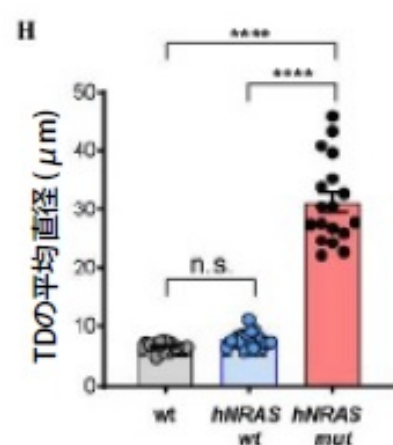
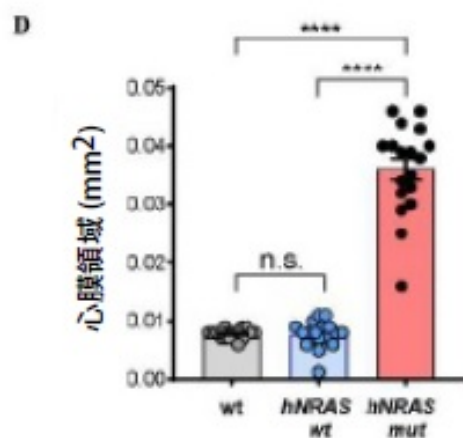
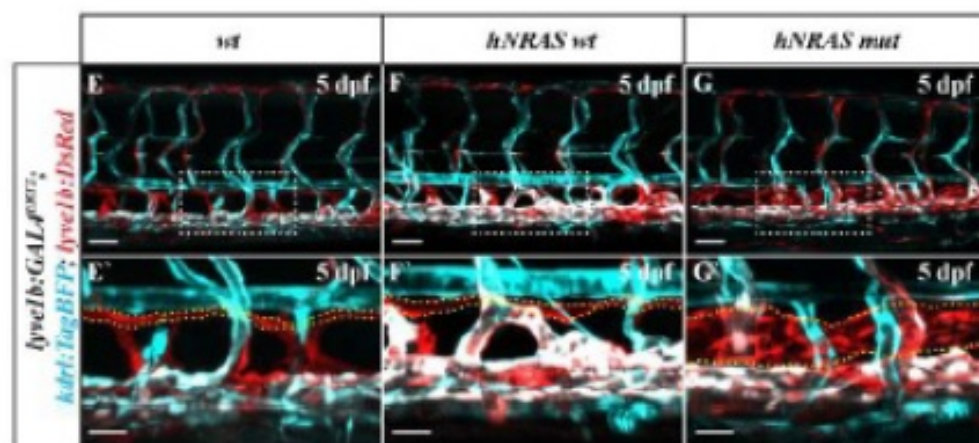
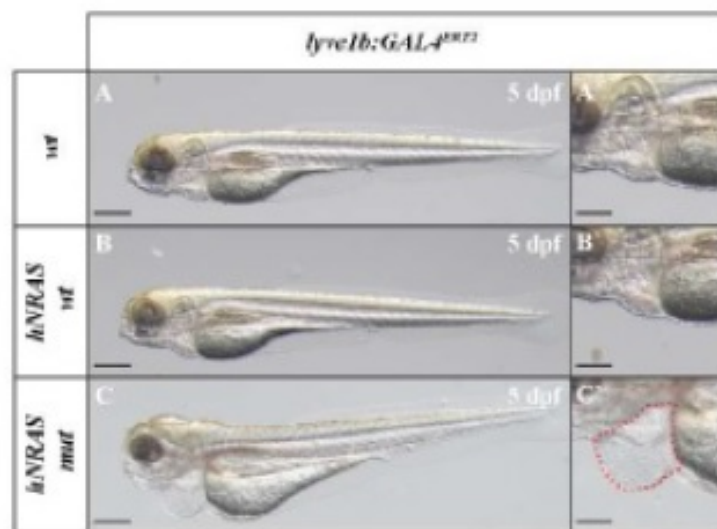
Fostamatinib	selleck
Galunisertib	selleck
GDC-0879	selleck
Gedatolisib	selleck
Glasdegib	selleck
Golvatinib	selleck
GSK429286A	Selleck Chemicals
GSK690693	selleck
Idasanutlin	selleck
Idelalisib	selleck
Indirubin	selleck
Indole-3-carbinol	selleck
IPA-3	Selleck Chemicals
JNJ-38877605	selleck
KEPPRA	selleck
K-Ras(G12C) inhibitor 6	selleck
LB42708	selleck
Leflunomide	selleck
LIPITOR	Selleck Chemicals
Lonafarnib	Selleck Chemicals
Lonafarnib (SCH66336)	selleck
LY294002	Selleck
Mesalamine (Lialda)	selleck
Miltefosine	selleck
MLN0128	selleck
Myricetin (Cannabiscetin)	Selleck
Myricitrin	selleck
Neratinib	Selleck
NF 023	selleck
Nifedipine	selleck
Nintedanib	selleck
NVP-BHG712	selleck
Omipalisib	selleck
OSI-027	selleck
OSI-930	selleck
OSU-03012 (AR-12)	selleck
Palbociclib	selleck
Palomid 529	Selleck
Parecoxib Sodium	selleck
PD98059	TargetMol
PF-3758309	selleck

PF-4708671	Selleck Chemicals
Phenformin hydrochloride	selleck
Pictilisib (GDC-0941)	selleck
Pirfenidone	selleck
PLX-4720	selleck
Quercetin (Sophoretin)	selleck
Ranolazine	Selleck
Refametinib	Selleck Chemicals
Regorafenib	selleck
RepSox	selleck
Ribociclib	selleck
Romidepsin	selleck
RSL3	selleck
SB 216763	selleck
SB 415286	selleck
SB 525334	selleck
Selumetinib	selleck
Sepanisertib	selleck
SGX-523	selleck
Sildenafil	TargetMol
Sirolimus	selleck
Sodium 4-Aminosalicylate	selleck
Sonidegib	selleck
Sorafenib	selleck
TAK 715	selleck
Taladegib	selleck
Taselisib	selleck
Temsirolimus	selleck
TG 100713	selleck
Thalidomide	selleck
Tideglusib	selleck
Tipifarnib (Zarnestra)	selleck
Tivozanib (AV-951)	selleck
Tozasertib	selleck
Trametinib	selleck
Triciribine	selleck
Tucatinib	selleck
U0126-EtOH	selleck
Valdecoxib	selleck
Vemurafenib	selleck
Verapamil	selleck

Verbenalin	selleck
Vismodegib	selleck
Wnt-C59	selleck
XL147 analogue	selleck
ZM-447439	selleck

表2: ハイスループットスクリーニング後の選択された化合物

PI3K/akt/mTOR group	RAS/RAF/MEK/ER K	Tyrosine kinase (TKI)	Miscellaneous
Alpelisib	Cobimetinib	Crizotinib	Vismodegib
Copanlisib	Vemurafenib	Cabozantinib	Palbociclib
Taselisib	Pictilisib	Leflunomide	Abemaciclib
Afuresertib	Refametinib	Nintedanib	Aminosalicylic acid
Triciribine		Fostamatinib	Thalidomide
GSK690693		Tucatinib	Baricitinib
Gedatolisib		Brigatinib	Fingolimod
Temsirolimus			Ranolazine
OSI-027			Verapamil
Sepanisertib			Sildenafil
Palomid 529			Fedratinib
			Valdecoxib
			Celecoxib



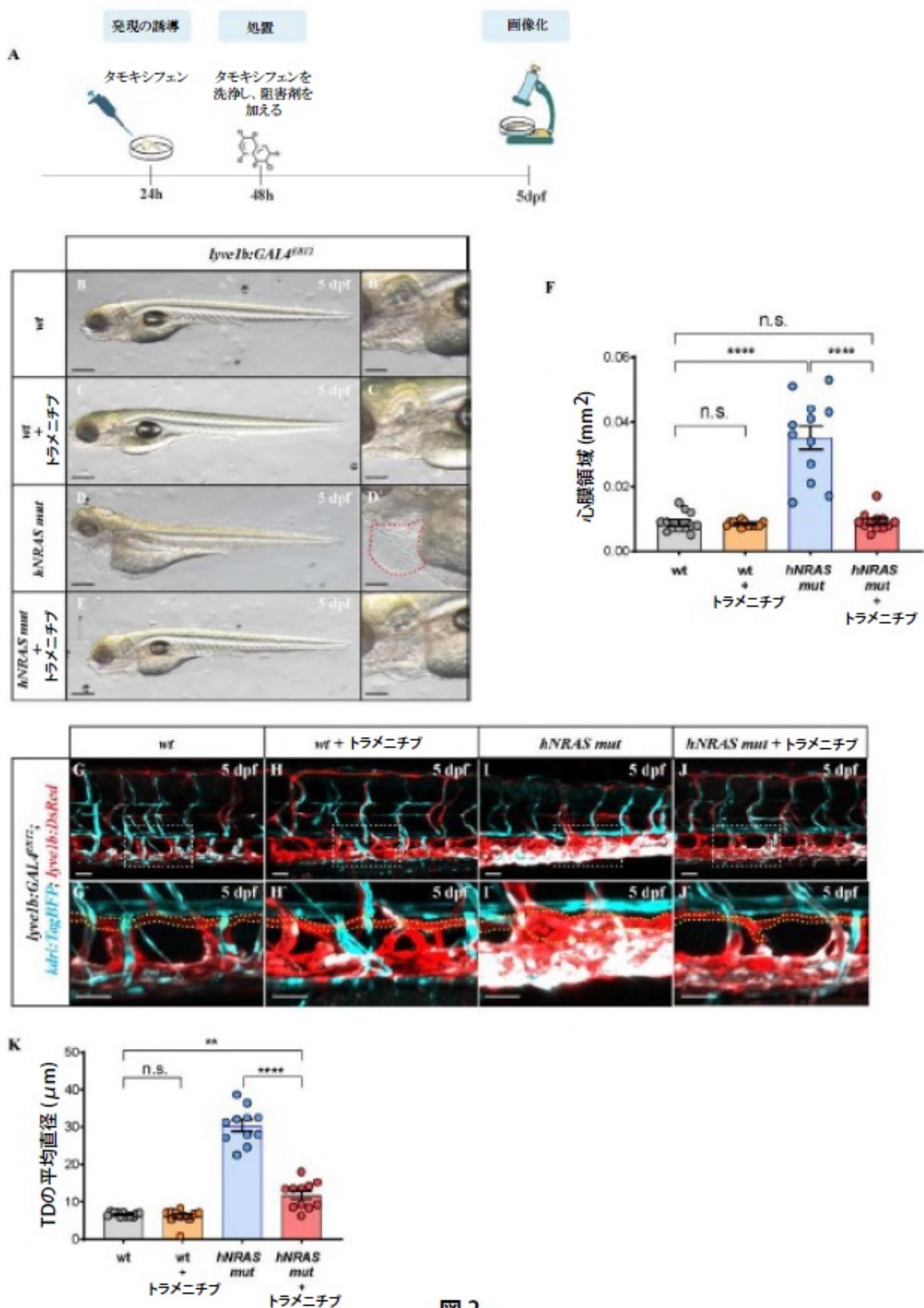
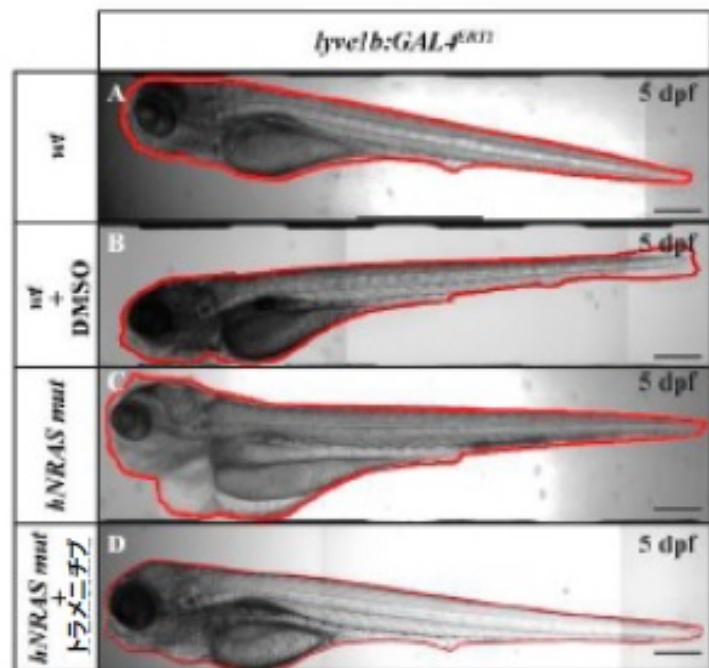
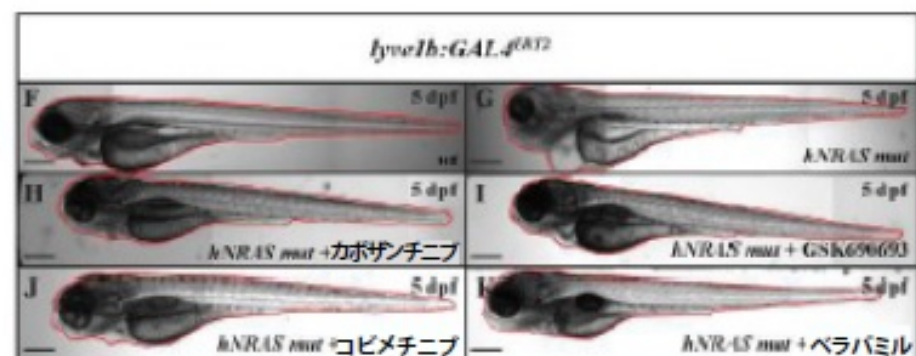
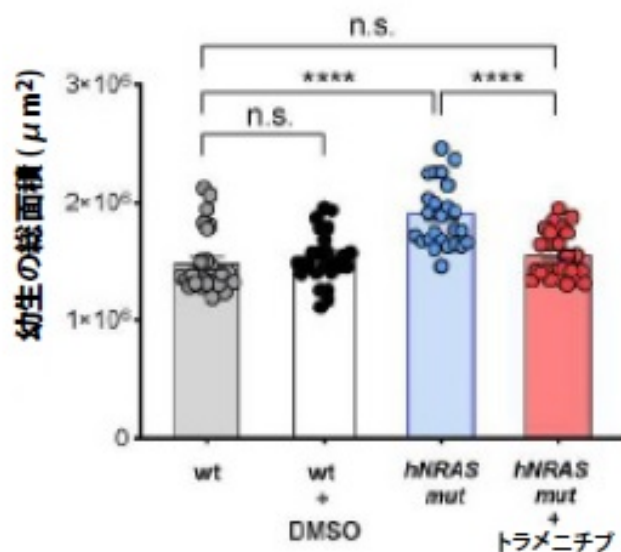


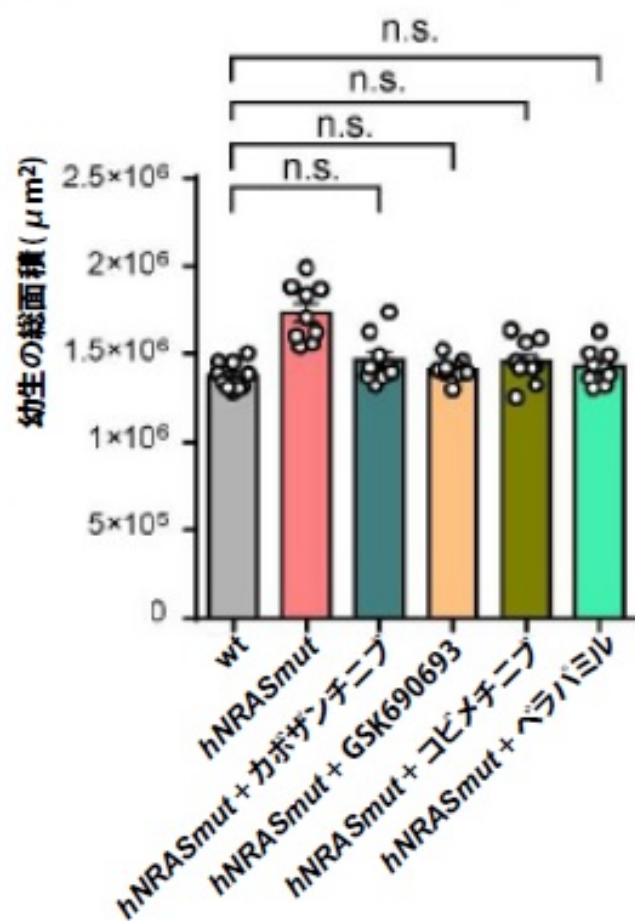
図 2

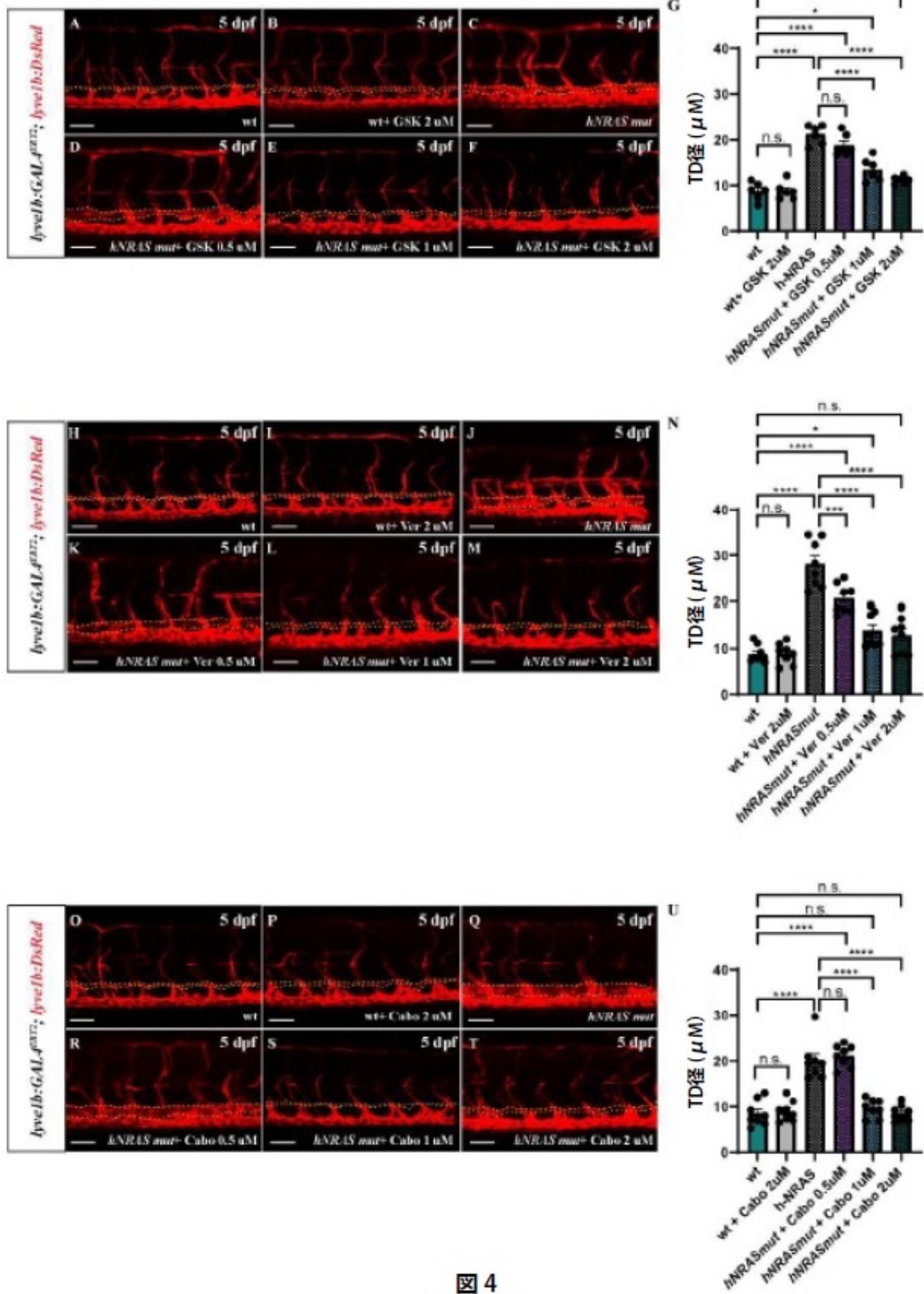


E



L





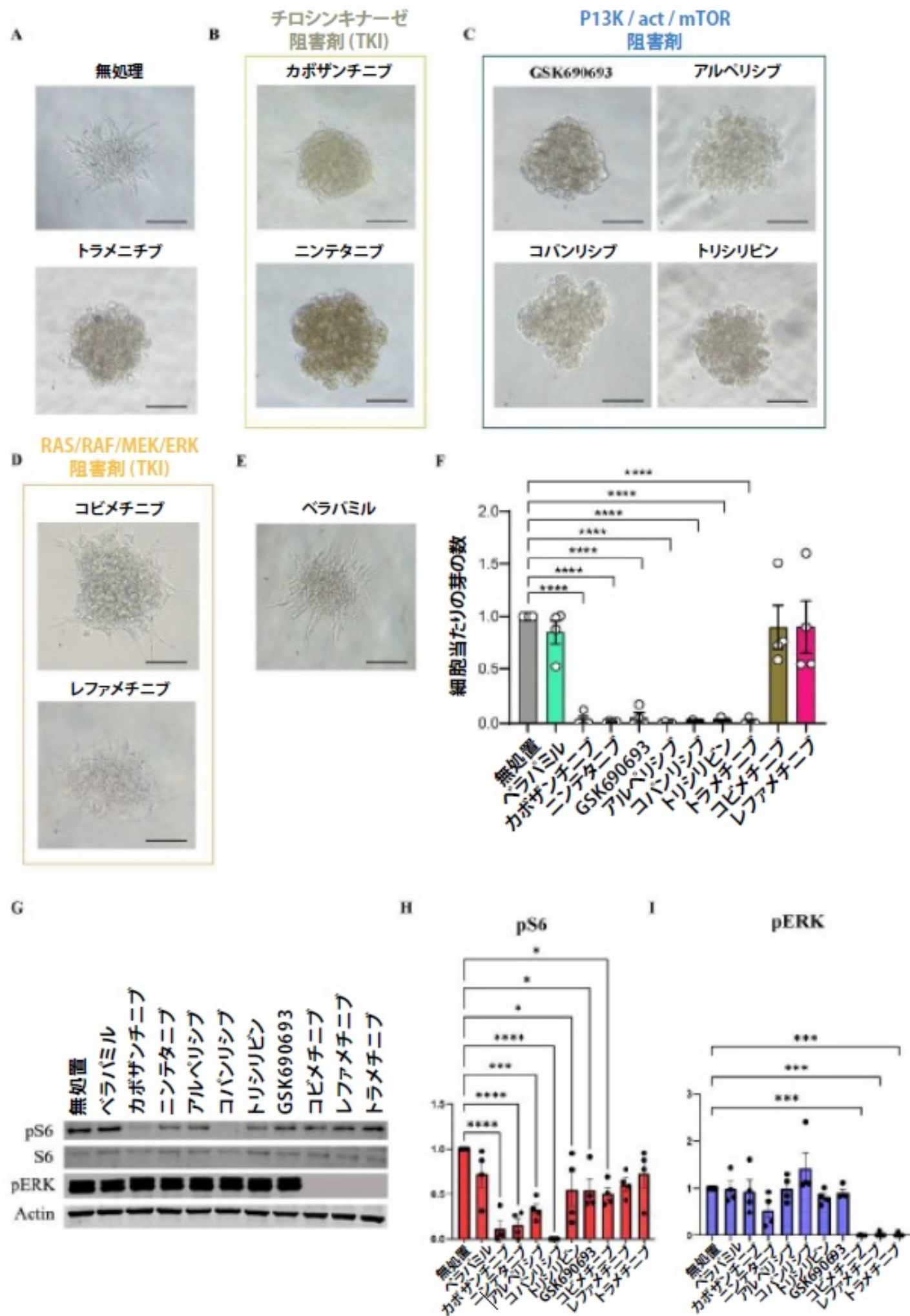


図 5

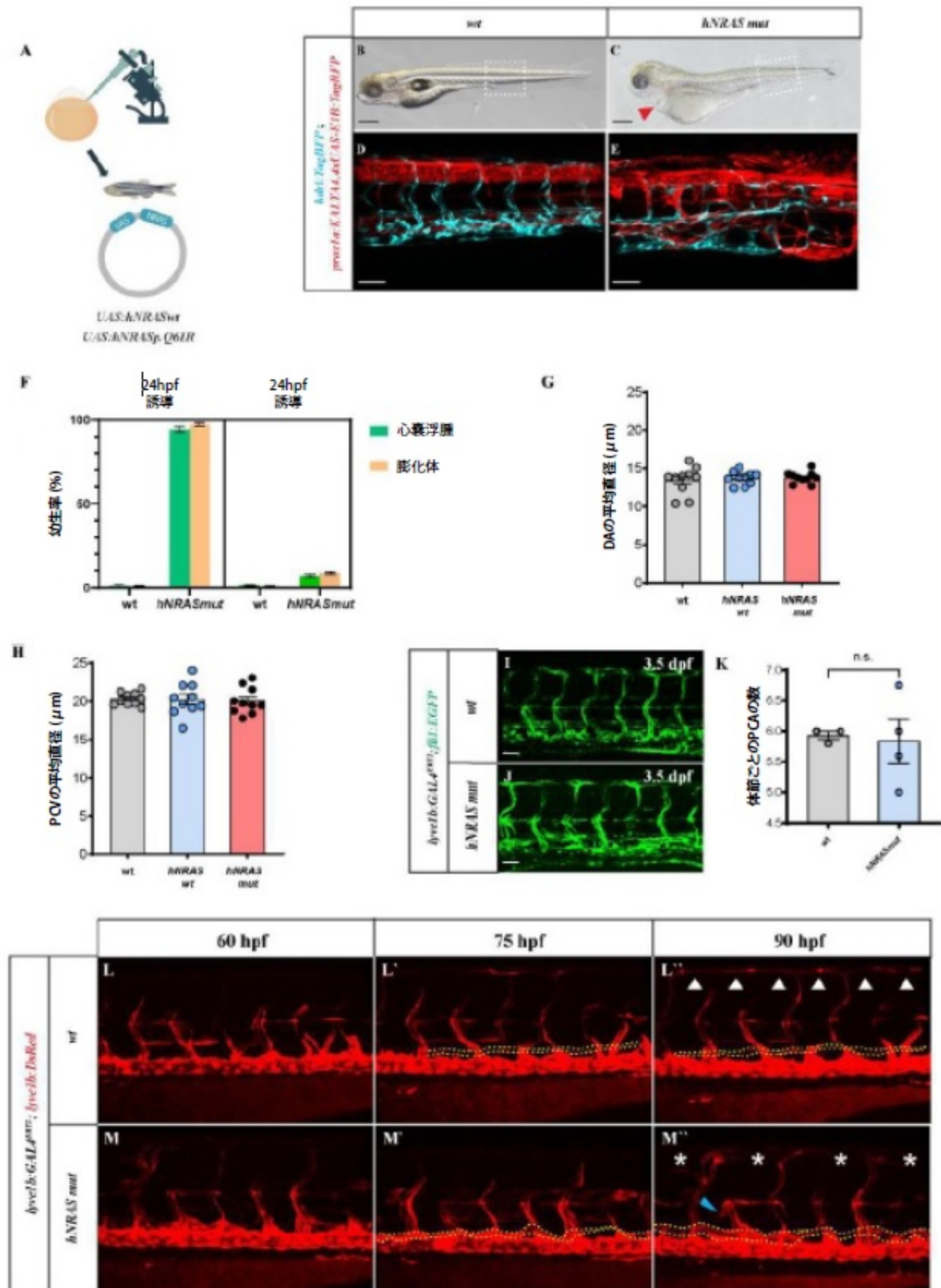


図 S1

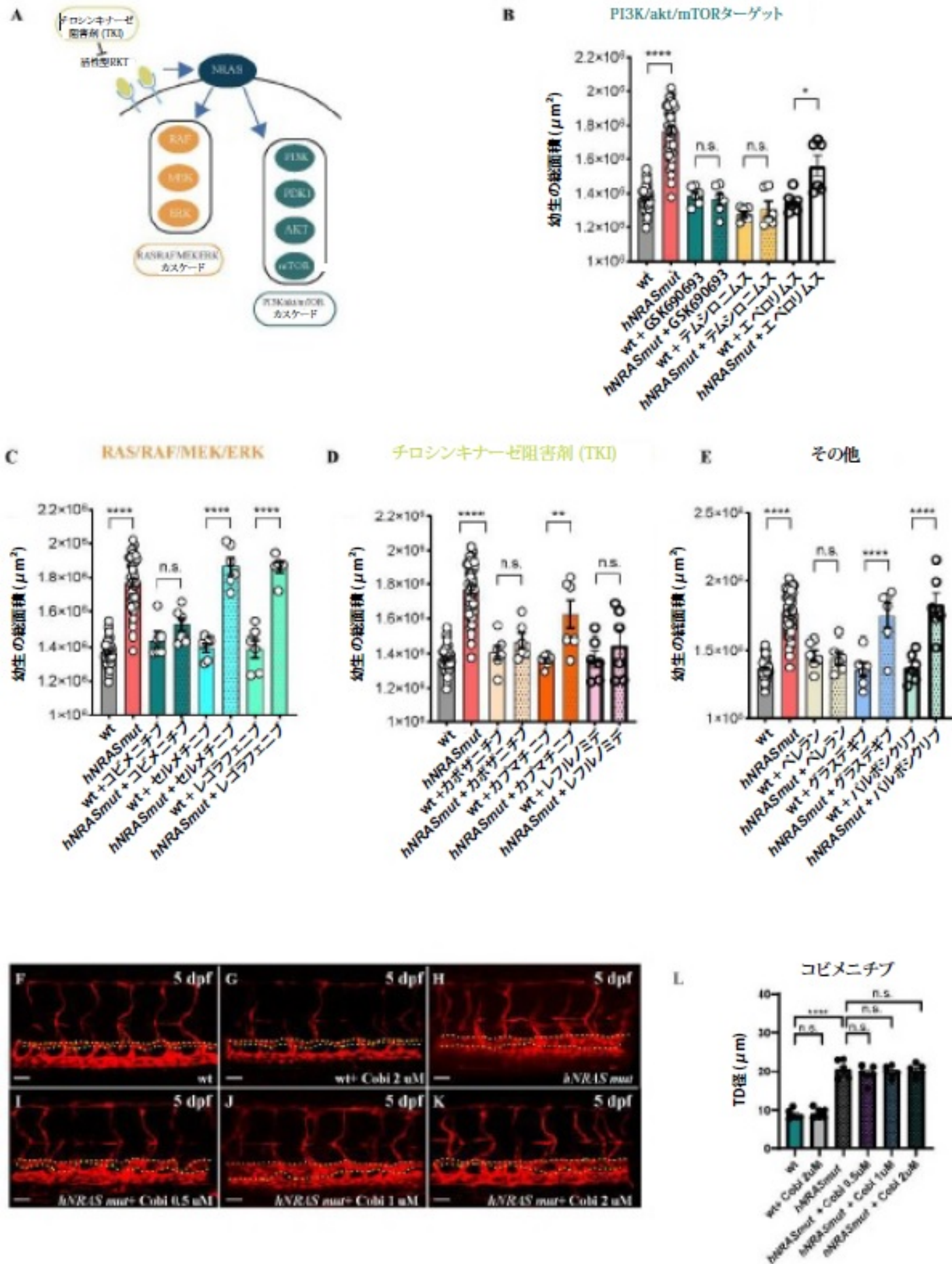
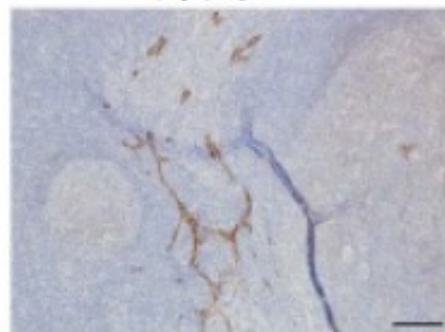


図 S2

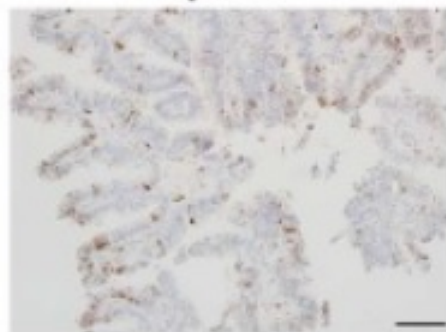
A

ポドプラニン



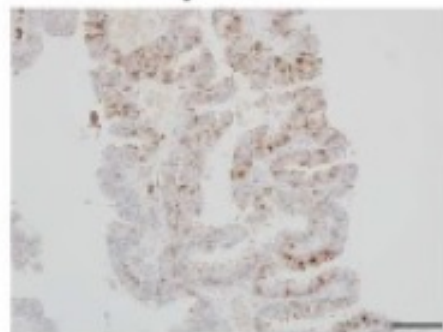
虫垂

pERK



結腸癌

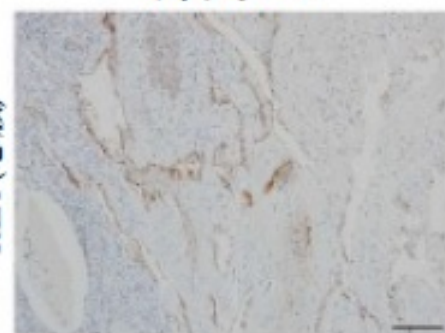
pAKT



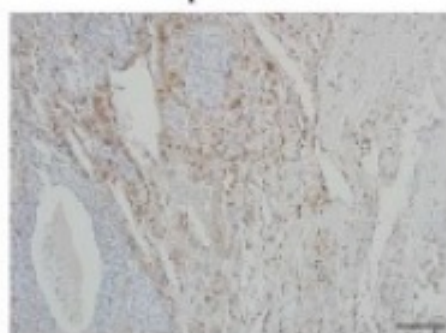
結腸癌

B

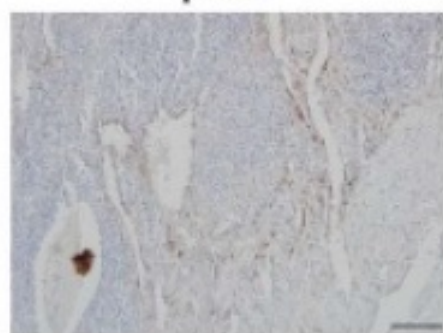
ポドプラニン



pERK



pAKT



KLA (心膜)