

令和元年6月17日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08459

研究課題名(和文) 三次元ヒト生体組織による階層性リンパ管網の形成ダイナミズムと分子機構の解明

研究課題名(英文) Cellular dynamics and molecular mechanism on lymphatic network formation in artificial three-dimensional human tissue

研究代表者

下田 浩 (Shimoda, Hiroshi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：20274748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した細胞集積法を用いてリンパ管網を自発的に形成する3次元ヒト生体組織(3Dヒト組織)を構築し、リンパ管のネットワーク形成における形態形成と分子機構についてセルダイナミズムの面より解析した。リンパ管内皮細胞は3Dヒト組織内で管腔形成・伸長・接合・分離を特徴とする細胞動態を呈し、3次元的なネットワークを形成した。さらに、リンパ管内皮細胞はそのダイナミズムに同調して特異的な分子発現を示し、時間軸に沿ったその発現はリンパ管の形態形成を密接に制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自の技術によりヒト細胞を用いた三次元組織を構築し、これまで生体では解析困難であった組織内リンパ管のネットワーク形成における細胞動態とそれを制御する分子機構の一端を明らかにした。本研究システムは実験動物を用いずにヒト生体組織における細胞動態や分子機構を解析できる新しい実験動物代替研究ツールであると同時に再生医療材料開発や創薬応用モデルとして高い有用性を発揮する。

研究成果の概要(英文)：The present study established in vitro 3D-human tissue model involving lymphatic vascular network by our developed cell-accumulation method, and investigated morphogenesis and molecular mechanism in lymphatic network formation. The lymphatic endothelial cells showed cellular dynamics featuring cell extensions, connections and separations in the 3D-human tissue, and eventually constructed three-dimensional network. The cells further displayed a specific expression of various functional molecules in phase with their dynamics, and the intimate control of the lymphatic morphogenesis by the molecular expressions in accordance with the time line were demonstrated.

研究分野：医歯薬学

キーワード：三次元ヒト生体組織 リンパ管ネットワーク セルダイナミズム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年、リンパ管の発達や病態に関わる様々な制御分子が発見・同定されている。しかし、それらの知見は未だ断片的でリンパ管の発生・新生においてリンパ管を構成する細胞がどのような変化と動きを経て組織内でリンパ管としての形態形成を行っていくのか、といった細胞・組織の時空間的ダイナミズムとそれを制御する分子機構については不明の点が多い。

これまで我々は、独自の細胞外マトリクス・ナノコーティング技術による細胞集積法を用いて立体的なヒト組織構造体（3D ヒト組織）を構築し、その内部にリンパ管のネットワークを自発的に形成させる手法を確立している。この 3D ヒト組織内のリンパ管は生体内のリンパ管と同等の解剖学的特性を有していることから、本組織構造体はリンパ管網の階層的な形態形成とこれを裏打ちする分子機構を 4 次元的なセルダイナミズムの面から解析することにおいてきわめて有用な研究ツールと考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでヒトを初め哺乳類の生体組織では解析困難であったリンパ管形成とネットワーク構築におけるセルダイナミズムと分子機構についてライブイメージングと分子形態学・生物学的手法を用いて明らかにする。

### 3. 研究の方法

1) ヒトリンパ管内皮細胞とヒト新生児皮膚線維芽細胞を用いて細胞集積法により 1 cm 径の 3D ヒト組織を構築した。

2) ライブイメージング解析に用いる 3D ヒト組織の構築にはレンチウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入したリンパ管内皮細胞を用いた。

対照としてヒトリンパ管内皮細胞の代わりにヒト胎児血管内皮細胞を用いて同様の手法により 1 cm 径の 3D ヒト組織を構築した。

3) 3D ヒト組織構築開始後より 0~4 日にかけてリンパ管・血管網形成のライブイメージングをタイムラプス撮影装置により取得した。

4) 3D ヒト組織構築開始後 1~4 日にかけて経時的に培養上清を採取し、脈管新生因子のプロテオームアレイを行った。

5) 3D ヒト組織構築開始後 1~4 日にかけて経時的に組織検体を採取し、リンパ管・血管内皮細胞特異分子、脈管新生因子、細胞接着因子等に対する分子形態学的解析を行った。

6) 3) および 4) の解析で抽出された、3D ヒト組織内リンパ管網形成に密接に関連すると考えられる因子に対して RNAi または阻害剤による発現・作用抑制を行い、1) ~ 5) と同様のライブイメージングと分子形態学による解析を行い、抽出因子の機能について検討した。

### 4. 研究成果

1) 3D ヒト組織内リンパ管内皮細胞のセルダイナミズムとネットワーク形成

細胞集積法により 3D ヒト組織におけるリンパ管網形成のライブイメージング解析システムを確立した（図 1）。

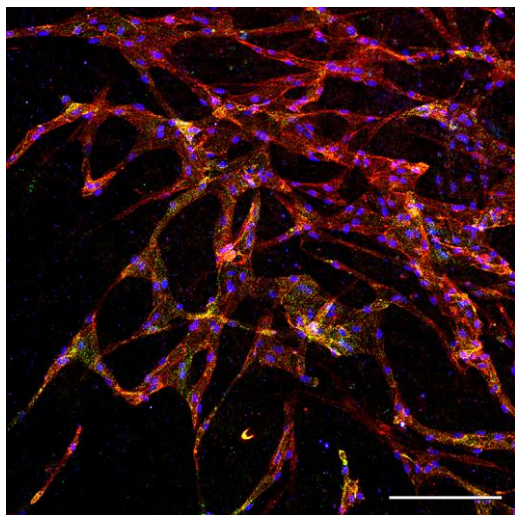


図 1. 細胞集積 4 日後に構築された 3D ヒト組織内リンパ管網. podoplanin (緑)、細胞間接着因子 (赤)、Prox1 (青) に対する免疫染色. Bar 200  $\mu$ m

細胞集積後間もなく 3D ヒト組織浅～中層で、紡錘形のリンパ管内皮細胞が連結しながら小さな索状または小管状の構造を疎らに形成する部とシート状に連結した内皮細胞群の隆起部より複数の管腔構造が直接出芽する部が混在して見られた (図 2、3)。これらの管腔構造では静的な内皮細胞と激しく動く動的な内皮細胞がモザイク状に出現した (図 2)。動的な内皮細胞は様々な方向に向かって探触子のように細長い細胞質突起を管壁外に伸長し、マッチングできる細胞群と接触するとドッキングし、新たなリンパ路を形成した (図 2)。マッチングしない動的細胞は細胞質突起を退縮させて静的細胞に形質転換し、他の静的細胞群から新たな動的細胞が出現し、複数の糸状仮足をもつ細胞質突起を伸長していた (図 2)。これら動的細胞を中心としたリモデリングにより、主に静的細胞で形成されたやや太い管腔構造を成す 2 次元的な初期ネットワーク (primary lymphatic network) が 3D ヒト組織の中層に構築された (図 2)。

その後、この primary lymphatic network 上に組織深層に向かって新たな細胞質突起を伸ばす内皮細胞が散在性に出現し、突起先端はしばしば糸状仮足を形成していた (図 2)。この細胞質突起を伸ばす内皮細胞 (tip cell) を先頭に隣接する内皮細胞 (stalk cell) がこれに追随するように primary network より組織深層に管腔を伸長し、これらの管腔が枝分かれしながら接合と分離を繰り返す、組織の深層にやや細い管腔構造から成る新たなネットワーク (secondary network) を形成した (図 2)。

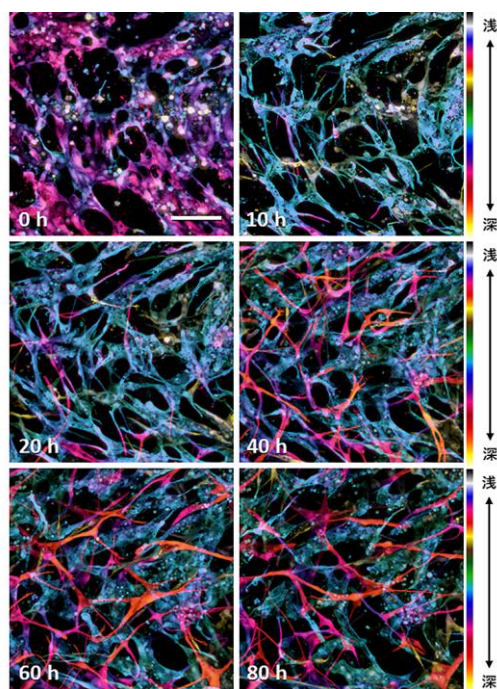


図 2. 細胞集積後のリンパ管内皮細胞のライブイメージング. 内皮細胞の色は右のカラーバーで示される 3D ヒト組織における Z 軸での位置 (深度) を示す. Bar 100  $\mu$ m

細胞集積 4 日後では、血管内皮細胞が 3D ヒト組織中層に 2 次元的なネットワークを形成するのに対し、リンパ管内皮細胞は組織中層と深層にまたがる 3 次元的なネットワークを形成した (図 3)。

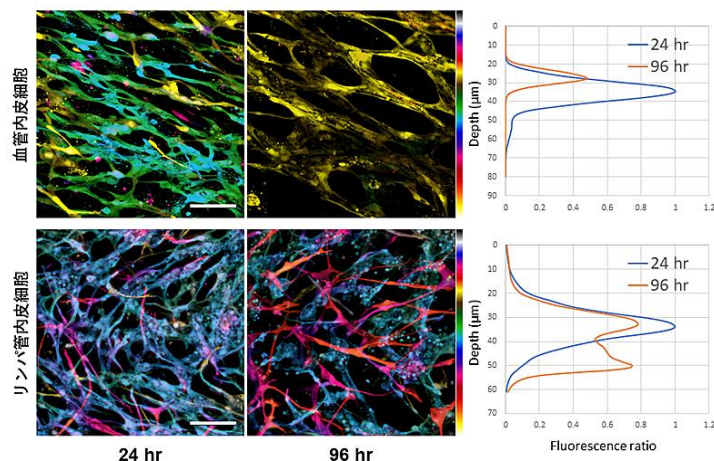


図 3. 細胞集積 4 日後の血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞によるネットワーク形成.

これらの結果はヒト組織内のリンパ管ネットワーク形成におけるリンパ管発生とリンパ管新生のセルダイナミズムを初めて明らかにしたものであり、3 次元組織ではリンパ管内皮細胞が血管のネットワーク形成とは異なるダイナミズムをもつことを示している。

## 2) 3D ヒト組織内リンパ管ネットワーク形成における機能分子発現

3D ヒト組織内リンパ管ネットワーク形成に対する時系列でのプロテオームアレイにより、特異的な発現を示す VEGF-A, MCP-1, Angiopoietins など数種の分泌型脈管新生因子が抽出された (図4)。また、時系列での分子形態学的解析によりリンパ管内皮細胞のセルダイナミズムに呼応するようにリンパ管成長因子受容体など多数の機能分子の特異的な時空間的発現が見られた (図5)。

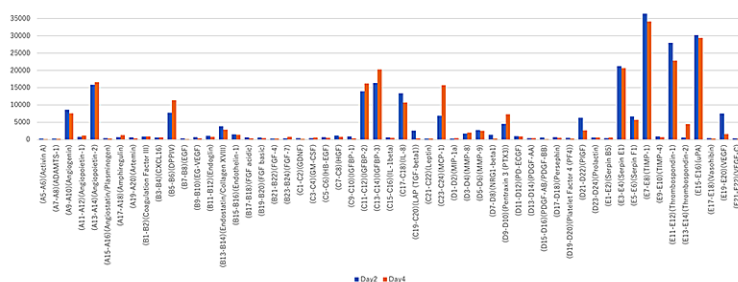


図4. 3D ヒト組織内リンパ管ネットワーク形成におけるプロテオームアレイ.

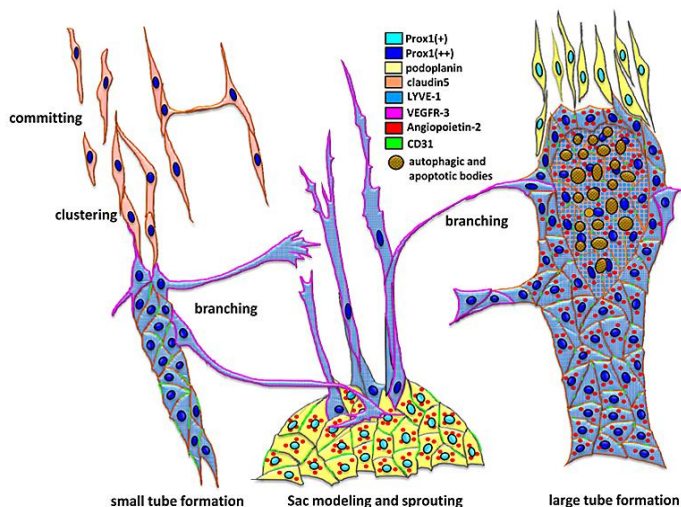


図5. 3D ヒト組織内リンパ管ネットワーク形成における時空間的機能分子発現.

本研究結果は、3次元生体組織内におけるリンパ管発生・新生に基づくネットワーク形成ではリンパ管内皮細胞特異分子や脈管形成因子を含む分子シグナルがリンパ管内皮細胞のセルダイナミズムと形態形成に同調して発現・作用する高い時空間的特異性を有することを示唆している。

## 3) 3D ヒト組織内リンパ管ネットワーク形成における特異的機発現因子の機能

プロテオームアレイおよび分子形態学的解析により抽出された特異的発現因子の RNAi または特異的阻害剤による機能解析を行っている。その一例として siRNA により Angiopoietin-2 (Ang-2) の発現抑制を行った結果を図6に示す。Ang-2 の発現が抑制されたリンパ管内皮細胞は数個の細胞から成る集団を形成し、盛んに細胞質突起を伸長するが、細胞同士の連結が進行せず、管腔形成とメッシュワーク形成が著しく阻害された。そのため、ネットワークの3次元化に必要な primary network の形成にさえ至らなかった。このことは、Ang-2 はリンパ管内皮細胞の細胞活動には影響しないが、管腔形成と管腔の出芽、連結を伴うリンパ管発生に必要なことを示唆している。MCP-1、TGF- $\beta$ 、ALK-1 等その他の抽出因子を含めて現在網羅的に解析を進めている。

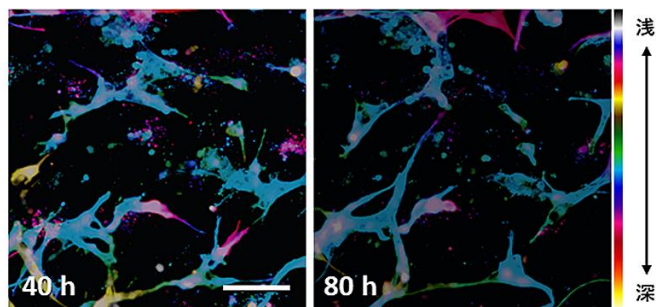


図6. Ang-2 発現抑制を行ったリンパ管内皮細胞の細胞集積後のライブイメージング. リンパ管内皮細胞によるネットワーク形成. 内皮細胞の色は図2と同様. Bar 100  $\mu$ m

## 4) 研究成果の位置づけとインパクト

本研究は独自に開発した3D ヒト組織構造体を用いて生体組織では解析が困難であったパ管

を構成する細胞・組織の時空間的ダイナミズムとそれを制御する分子メカニズムについて検討を行い、世界で初めてヒト組織内でのリンパ管の発生・新生、ネットワーク形成のセルダイナミズムを明らかにするとともにそれを裏打ちする分子発現と作用機序について解析を進めている。本研究で用いた3Dヒト組織は血管・リンパ管内皮細胞が自発的に管腔およびネットワーク形成を行い、階層性の成熟化を再現していくものであり、これまで生体では解析困難であった課題を克服し、実験動物ではないヒトの組織での解析を可能とする、再現性に優れた新たな医学研究モデルとして期待できるものである。さらには、血管・リンパ管網が立体組織内に形成される利点を生かして再生医療材料開発や創薬応用モデルとしての面を兼ね備えており、動物実験の軽減とヒトへの応用性を推進する、実験動物代替モデルとして国際標準化を図ることができると思われる。

さらに本研究は、リンパ管が血管のネットワーク形成と異なり、3次元的なネットワーク形成を行う特性を持ち、それを制御する機能分子が4次元的にオンアンドオフで発現することを初めて証明したものであり、ライブイメージング技術を用いてその作用機序に踏み込むことでリンパ管の発生・新生および病態形成を考える上で重要な新知見を提供するものと考えられる。

## 5) 今後の展望

本研究は現在も進行中であるが、今後本3Dヒト組織モデルにおいてリンパ管のネットワーク形成を制御する分子メカニズムの解析を網羅的に進めることにより、リンパ管の発生・新生機構を明らかにするだけでなく、種々のがん細胞によるがん浸潤・転移モデルに昇華させることでがんのリンパ行性転移の動的メカニズムの解明と新たな治療戦略の開発に貢献できるものと考えられる。さらに、この3Dヒト組織・リンパ管網・がん転移モデルは抗がん剤を初めとする薬剤効果や毒性の評価ツールとしても有用と思われることから創薬への応用も期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

下田 浩：三次元生体組織が描く血管・リンパ管研究. リンパ学 41 (2) : 64-66 (査読なし)

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 下田 浩：免疫系と組織再生を提供する微小循環系. (シンポジウム) 第 124 回日本解剖学会総会・学術集会 2019.3.27-3.29, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)
- ② 岡野大輔、浅野義哉、松崎典弥、明石 満、下田 浩：リンパ管形成における Angiopoietin-2 の機能解析. 第 124 回日本解剖学会総会・学術集会 2019.3.27-3.29, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)
- ③ 渡邊誠二、成田大一、高橋一人、下田 浩、松崎典弥、明石 満：細胞集積法で立体造形された血管網への周皮細胞接着に及ぼす細胞外マトリクス添加の効果. 第 124 回日本解剖学会総会・学術集会 2019.3.27-3.29, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)
- ④ 高橋一人、渡邊誠二、成田大一、松崎典弥、下田 浩：細胞外マトリクスおよび微小循環系を内含する三次元人工ヒト皮膚モデルの開発. 第 124 回日本解剖学会総会・学術集会 2019.3.27-3.29, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)
- ⑤ 下田 浩：三次元ヒト生体組織が描く血管・リンパ管研究. 第 42 回日本リンパ学会総会 2018.6.22-6.23, アートホテル弘前シティ (青森県弘前市)
- ⑥ 下田 浩、渡邊誠二、成田大一、岡野大輔、浅野義哉、松崎典弥、明石 満：血管・リンパ管網の生体移植におけるネットワーク形成ダイナミズム. (シンポジウム) 第 123 回日本解剖学会総会・学術集会 2018.3.28-3.30, 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市)
- ⑦ 岡野大輔、浅野義哉、松崎典弥、明石 満、下田 浩：リンパ管ネットワーク構築における CD73 の役割. 第 123 回日本解剖学会総会・学術集会 2018.3.28-3.30, 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市)
- ⑧ 岡野大輔、吉松康裕、松崎典弥、浅野義哉、渡邊誠二、成田大一、明石 満、渡部徹郎、下田 浩：三次元培養組織を用いたリンパ管ネットワーク形成のライブイメージング. 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会 2017.3.28-3.30, 長崎大学坂本キャンパス (長崎県・長崎市)
- ⑨ 浅野義哉、下田 浩、岡野大輔、松崎典弥、明石 満：人工ヒトリンパ管網組織の移植と脈管リモデリング. 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会 2017.3.28-3.30, 長崎大学坂本キャンパス (長崎県・長崎市)
- ⑩ 渡邊誠二、成田大一、下田 浩、松崎典弥、明石 満：細胞集積法で立体造形された血管網の構造形成に及ぼす平滑筋細胞および周皮細胞添加の効果. 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会 2017.3.28-3.30, 長崎大学坂本キャンパス (長崎県・長崎市)
- ⑪ 下田 浩、渡邊誠二、成田大一、浅野義哉、岡野大輔、齋藤絵里奈、松崎典弥、明石 満：立体血管網組織の生体移植における血行路形成メカニズム. 122 回日本解剖学会総会・学術集会 2017.3.28-3.30, 長崎大学坂本キャンパス (長崎県・長崎市)

- ⑫ 岡野大輔、吉松康裕、松崎典弥、浅野義哉、渡邊誠二、成田大一、明石 満、渡部徹郎、下田 浩：三次元培養組織を用いたリンパ管ネットワーク形成のライブイメージング。第 24 回日本血管生物医学学会 2016.12.10-12.12, 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：渡邊誠二

ローマ字氏名：(WATANABE, SEIJI)

研究協力者氏名：成田大一

ローマ字氏名：(NARITA, HIROKAZU)

研究協力者氏名：岡野大輔

ローマ字氏名：(OKANO, DAISUKE)

研究協力者氏名：松崎典弥

ローマ字氏名：(MATSUSAKI, MICHIIYA)

研究協力者氏名：明石 満

ローマ字氏名：(AKASHI, MITSURU)

研究協力者氏名：吉松康裕

ローマ字氏名：(YOSHIMATSU, YASUHIRO)

研究協力者氏名：渡部徹郎

ローマ字氏名：(WATABE, TETSUROU)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。