

令和元年6月12日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15370

研究課題名(和文)三次元マウス肺がんモデルを用いたがん・血管内皮連関機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of interactions between cancer and vascular endothelial cell using 3D mouse lung cancer model

研究代表者

臼井 達哉 (Usui, Tatsuya)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：80727652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肺がんオルガノイドとHUVECsを共培養すると、HUVECsのマトリゲル上への管腔形成が誘導され、その後、マトリゲル内のオルガノイドへの血管内皮細胞の遊走と接着が観察されること、マトリゲルを介した共培養によってオルガノイドへの血管内皮細胞の遊走および接着が引き起こされることが示唆された。肺がんオルガノイド培養上清処置はHUVECsの遊走を亢進し、ERK、Aktシグナルを時間依存的に活性化することが分かった。また、培養上清による遊走亢進はERKおよびAkt阻害剤の処置によって抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立した肺がんオルガノイド・血管内皮細胞共培養システムを用いて、様々な相互作用メカニズムが明らかになれば、将来的にがん細胞・血管内皮細胞連関を標的とした大規模ハイスループットスクリーニングモデル開発につなげることができる。

研究成果の概要(英文)：Cocultivation of mouse lung cancer organoids and HUVECs induces tube formation of HUVECs on Matrigel, after which migration and adhesion of vascular endothelial cells to organoid in Matrigel are observed, Matrigel-mediated co-culture It was suggested that the culture causes migration and adhesion of vascular endothelial cells to the organoid. It was found that lung cancer organoid culture supernatant treatment promotes migration of HUVECs and activates ERK and Akt signals in a time-dependent manner. In addition, enhanced migration by the culture supernatant was suppressed by treatment with ERK and Akt inhibitors.

研究分野：獣医学

キーワード：肺がん オルガノイド 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

肺がんは日本において男女ともに部位別がん死亡率の一位であり、罹患率も増加傾向にあるアンメットメディカルニーズの高い深刻な疾患である。肺がんによる死亡率が多い原因として早期発見が困難であることや、約 70% が手術不可能な進行期肺がんであり、有効な治療法が確立していないことが挙げられる。

我々はこれまでの研究において、カルモジュリン関連蛋白質 Death-associated protein kinase (DAPK)3 が血管系において高血圧症の発症および進展を制御することを報告するとともに、DAPK3 が非小細胞肺がん細胞株 A549 の増殖、遊走、浸潤および足場非依存性のコロニー形成能を ERK/c-Myc シグナルを介して促進することを明らかにしてきた。また、in vivo においても DAPK3 遺伝子ノックダウンによって A549 細胞のがん形成を抑制することを明らかにし、DAPK3 が進行期肺がんの治療標的の 1 つになる可能性を初めて示した。

最近、肺がんの臨床現場では、分子標的治療法に加えて、免疫治療法などのがん細胞周囲をとりまく細胞(がん微小環境)をターゲットとした治療法が注目を集めている。これまでの肺がん研究は、がん細胞株やがんモデルマウスを用いて行われてきたが、がん悪性化に至る過程の違いや生体内のがん微小環境との乖離がネックとなっている。したがって、より生体の肺がんに近いモデルの構築が、がん微小環境を標的とした新たな治療法の開発に必要とされている。

そこで、研究代表者は肺組織のがん微小環境を培養ディッシュ上で再現できる新たなシステムとして、中・長期的に上皮組織の構造を維持できる三次元細胞培養法(オルガノイド培養法)に着目した。

Hans Clevers 研究室によって開発されたマトリゲル三次元培養法は、マウスから単離した小腸上皮細胞をゲルと混合し、Wnt, Noggin, R-spondin などの幹細胞性を高める特殊な培地で培養することで三次元の上皮組織構造を培養ディッシュ上で再現できる。Calvin Kuo 研究室では組織をコラーゲンに混合し、空気に暴露させることでオルガノイドの発育をより促進することができる培養法である Air liquid interface (ALI) 培養法を用いてマウスの胃、大腸、膵臓のがんオルガノイドモデルを世界で初めて作製し、300 日以上培養が可能であることを示した。

肺組織は、気管支上皮、血管内皮、肺胞上皮、線維芽細胞などから構成され、感染などで上皮細胞がダメージを受けた際には、肺胞マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞による防御機構が働く。これらの複雑な細胞間相互作用を検討するために、iPS 細胞由来の肺胞スフェロイドや、マウスの気管支や肺胞由来の幹細胞の培養など様々な三次元培養の方法が近年開発されている。

研究代表者は、2015 年 4 月に Calvin Kuo 研究室に客員教員として留学し、ALI 培養法を用いて、がんモデルマウス(KRas G12D 変異トランスジェニックかつ p53 ノックアウト)の肺組織由来オルガノイドの作製に携わった。

我々が樹立した三次元肺がんモデルは、肺腺がん組織と類似する組織像を示すことや(N/C 比の増大、核の異形成)、上皮細胞マーカーE-cadherin、肺腺がん細胞マーカーTTF1 および細胞増殖マーカーPCNA 陽性細胞を多数含むことから、肺腺がんの病態を三次元培養環境下で再現する新たなツールといえる。さらに、免疫不全マウスへの移植によって腫瘍形成能および強力な肺への転移能を示すことから、進行期肺がんの転移機序を解析するモデルに応用できる可能性もある。

血管新生阻害療法は肺がん組織の新生血管を標的として、がんの成長と転移を阻害する

治療法であり、現在 VEGF の中和抗体や受容体阻害剤が主に投与されている。しかしながら、VEGF をターゲットとする薬剤の単独投与では抗がん効果が期待ほど認められていないことから、がん血管新生を標的とする新薬の開発が困難となっている。

近年、がん組織内血管は、がんへの酸素や栄養供給の役割に加えて、近接するがん細胞に影響を与えることが明らかになってきた。Lu らは血管内皮細胞が Jagged-1 分泌を介して、大腸がん細胞の幹細胞性を亢進し、抗がん剤への抵抗性を促進させることや、転移のトリガーとなり得ることを報告しており、がん細胞・血管内皮細胞間の相互作用の重要性が示唆されている。

ALI オルガノイド培養では、上皮細胞、上皮幹細胞および筋線維芽細胞などを共培養することによってがん微小環境を一部再現することが可能となるが、培養液や、継代時のコラゲナーゼ処置の影響によって肺組織を構成する血管内皮細胞をオルガノイド培養のみで再現することは困難であった。

## 2. 研究の目的

そこで、肺がん上皮と血管内皮の相互作用をオルガノイド培養において再現するために、我々はマトリゲルに播種したマウス肺がんオルガノイド上にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を播種し、マトリゲルを介した共培養システムを考案し、その有用性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス肺がんオルガノイドと HUVECs を共培養し、血管内皮細胞の局在を経時的に検討した。さらに、オルガノイドと血管内皮細胞との相互作用について分子生物学的手法を用いて様々な観点から検討を行った。

## 4. 研究成果

マウス肺がんオルガノイドと HUVECs を共培養すると、2-3 時間後に HUVECs のマトリゲル上への管腔形成が誘導され、1 日後まで持続的に観察された。共培養後 2-3 日が経過すると、HUVECs の管腔構造が崩れ、マトリゲル内のオルガノイドへの血管内皮細胞の遊走と接着が見られた。血管内皮細胞のオルガノイドへの接着を確認するために、HUVECs に蛍光タンパク質 ZsGreen を標識し、タイムラプス撮影を行い観察したところ、共培養 4 日目にオルガノイドに誘引され接着する HUVECs が認められた。

また、上皮細胞マーカー E-cadherin、血管内皮細胞マーカー CD31 の二重染色によってもオルガノイド内に、CD31 陽性の細胞が認められたことから、マトリゲルを介した共培養によってオルガノイドへの血管内皮細胞の遊走および接着が引き起こされることが示唆された。

肺がんオルガノイドへの HUVECs 遊走メカニズムを検討するために、マウス肺がんオルガノイドの培養上清の ELISA を行い、増殖因子分泌を検討したところ、オルガノイド培養によって血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の分泌が亢進し、血管内皮細胞との共培養によって減少することが分かった。また、肺がんオルガノイドの培養上清をオルガノイドに処置し、ポイデンチャンバーアッセイによって HUVECs の遊走能に与える影響を検討したところ、肺がんオルガノイドの培養上清は ERK シグナルの活性化を介して HUVECs の遊走を促進することが明らかになった。

HUVECs と共培養することによって、肺がんオルガノイドの形成数に与える影響を検討したところ、共培養自体は、オルガノイド形成率に影響を与えなかった。しかし、共培養したオルガノイドに VEGF を添加することによってオルガノイド形成率は上昇した。さらに、VEGF 添加は共培養オルガノイドにおける CD31 陽性細胞数を有意に増加したことが

ら、共培養オルガノイドにおいて VEGF は血管新生を介して上皮細胞の増殖を制御する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 臼井達哉. 三次元マウス肺がんと血管内皮細胞の共培養システムの樹立 第 45 回日本毒性学会学術年会. 2018 年 7 月 16 日. 大阪府大阪市 大阪国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

(1) 臼井達哉, 佐々木一昭. 2018. 肺がんオルガノイド・血管内皮細胞共培養システムを用いた細胞間相互作用メカニズムの解明. BIO Clinica. 34: 45-49.

(2) 臼井達哉, 佐々木一昭. 2018. 三次元マウス肺がんモデルの確立とがん・血管内皮関連機構の解明. メディカル・サイエンス・ダイジェスト 44: 189-192.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

研究分担者氏名：

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：

ローマ字氏名：

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。