

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15538

研究課題名（和文）三次元リンパ管組織モデルの形態形成運動と細胞間接着におけるCD73の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of lymphatic vascular morphogenesis and functional analysis of CD73 in 3D tissue model

研究代表者

岡野 大輔 (Okano, Daisuke)

弘前大学・医学研究科・助手

研究者番号：00719023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：三次元リンパ管組織モデルでは平面的に1次管腔ネットワークを形成し、そこからリンパ管新生が起こり、出芽・伸長・移動・吻合を繰り返して三次元的な2次管腔ネットワークを形成することが明らかになった。また、リンパ管新生中にリンパ管内皮細胞の細胞内小胞がリンパ管内腔へ変化した。三次元リンパ管組織モデルの線維芽細胞のCD73発現およびアデノシンセプター発現がリンパ管ネットワーク形成能に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ管新生はがんのリンパ行性転移だけでなく免疫、むくみやアンチエイジングなど様々な場面での関与があるにもかかわらず不明な点が多い。本研究ではタイムラプス・ライブイメージングでリンパ管形態形成を明らかにし、線維芽細胞のCD73がリンパ管ネットワーク形成に関与していることが示唆された。がんの病態解明や、ひいては新たな治療戦略の確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We showed that a primary lymphatic vessels network is formed on a plane in a three-dimensional lymphatic vessel tissue model. And then lymphangiogenesis occurs from there, and budding, elongation, migration, and anastomosis are repeated to form a secondary lymphatic vessels network. Intracellular vesicles of lymphatic endothelial cells changed into lymphatic lumen during lymphangiogenesis. It was suggested that CD73 expression and adenosine receptor expression of fibroblasts in a three-dimensional lymphatic vessel model are involved in the lymphatic network formation ability.

研究分野：組織学

キーワード：リンパ管 三次元培養 CD73 ライブイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん病巣におけるリンパ管新生やリンパ管構造の不安定化はがんのリンパ行性転移を促進することが知られている。そのため、リンパ管の形成メカニズムを解明することはがん進展の病態解明と治療戦略の確立に必須であるが、多くのことが未だ不明である。CD73 は細胞外 AMP をアデノシンに変換する酵素でありリンパ管で強く発現している。リンパ管形態形成制御に関与していることが予想されるが、リンパ管での役割はほとんどわかっていない。

リンパ管形態形成の観察にはタイムラプス・ライブイメージングが有効であり、ゼブラフィッシュを用いた観察手法が確立されている。しかし、医学研究への応用のためにはヒト細胞を用いた実験系が望ましく、三次元積層培養法を用いたヒトリンパ管形成モデルは結合組織中に管腔構造を伴うリンパ管ネットワークを構築するためタイムラプス・ライブイメージングに応用できると考えた。改良を加えた結果、タイムラプス・ライブイメージングが可能となった。

2. 研究の目的

CD73 のリンパ管形態形成を制御する現象とメカニズムを解明し、リンパ管における CD73 の病態生理学的な意義を明らかにすることを目的とする。そのため、リンパ管ネットワークの形態形成運動をライブイメージングにより明らかにし、それをもとにリンパ管形態形成における CD73 の機能を解析する。がんのリンパ行性転移の全容解明につながり、ひいては新たな治療戦略の確立に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) リンパ管形態形成のタイムラプス・ライブイメージング

ヒト線維芽細胞(NHDF)と GFP 遺伝子を導入したヒトリンパ管内皮細胞(LEC)を用いて三次元積層培養を行いヒトリンパ管形成モデル組織を作成した。共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス像を撮影し解析を行った。

(2) CD73 によるリンパ管網形成能への亢進/阻害効果の検討

ヒトリンパ管形成モデルにおける CD73 の局在と酵素活性染色

ヒトリンパ管形成モデルにおいて CD73 の免疫染色を行い、さらに単層培養の LEC と NHDF、ヒトリンパ管形成モデルにおいて CD73 酵素活性染色 (5'-Nase 染色) を行った。

ヒトリンパ管形成モデルにおける CD73 のリンパ管網形成能の亢進/阻害効果の検討

ヒトリンパ管形成モデルで CD73 のノックダウン(KD)試験とアデノシンレセプター(ADOR)阻害剤投与試験を行った。KD 試験では LEC と NHDF に siRNA なし(mock)、CD73 siRNA をトランスフェクションした 24 時間後に積層培養を開始した。さらに 96 時間後に固定し評価を行った。ADOR 阻害剤投与試験では積層培養開始直前、LEC にそれぞれ阻害剤なし(mock)、NECA(アデノシンレセプターアゴニスト)、AMPCP(CD73 阻害剤)を投与し、三次元積層培養を行った。さらに 96 時間後に固定し評価を行った。

Matrigel チューブ形成アッセイによる CD73 のリンパ管網形成能の亢進/阻害効果の検討

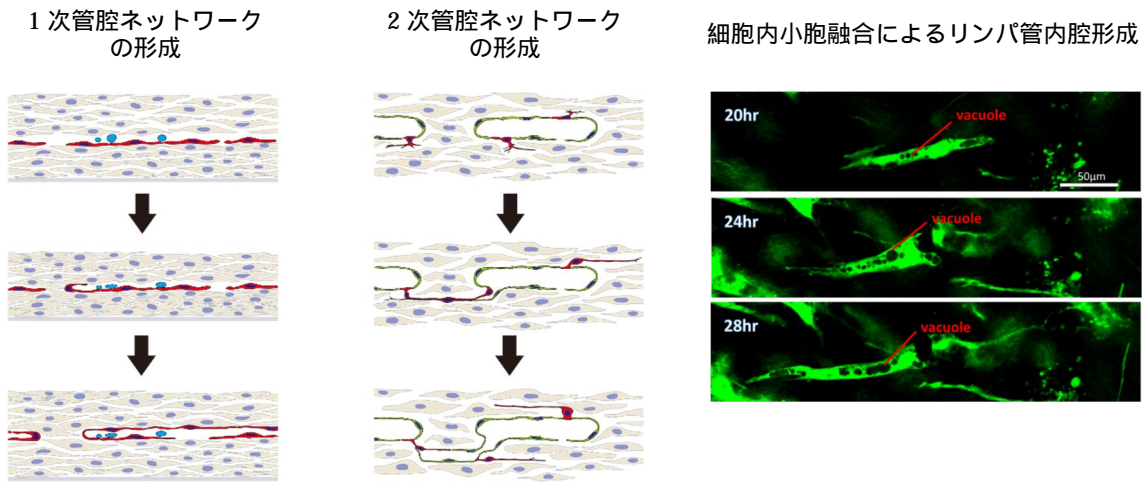
Matrigel を用いたリンパ管内皮細胞チューブ形成アッセイによる KD 試験と阻害剤投与試験を行った。LEC にそれぞれ siRNA なし(mock)、negative control siRNA (siNC)、NT5E siRNA をトランスフェクションし、24 時間後にマトリゲル上で培養を開始した。培養開始から 48 時間後に固定し評価を行った。阻害剤投与試験では LEC にそれぞれ阻害剤なし(mock)、AMP、AMPCP を投与し、マトリゲル上で培養を行った。培養開始から 48 時間後に固定し評価を行った。

4. 研究成果

(1) リンパ管形態形成のタイムラプス・ライブイメージング

積層培養開始直後には一層であった LEC が、約 12 時間後にチューブ形成して平面的に 1 次管腔ネットワークを形成した。約 24 時間経過後、下層に向けてのリンパ管新生が起こり、出芽・伸長・移動・吻合を繰り返して三次元的な 2 次管腔ネットワークを形成することが明らかになった。

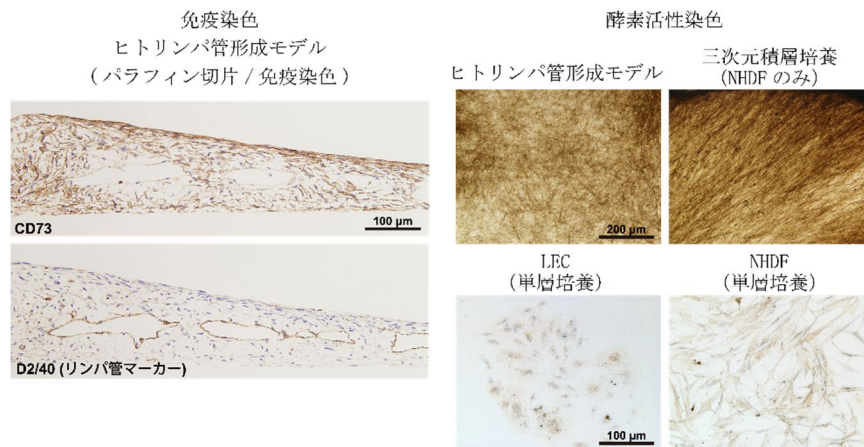
また、1 次管腔ネットワークでは平板状に展開していた LEC 群が形態変化して扁平なリンパ管網を構築するのに対し、2 次管腔ネットワークでは突出した LEC 中の細胞内小胞がリンパ管内腔へ変化した。細胞内小胞融合による管腔形成はリンパ管新生では報告されておらず、今後のさらなる研究において有用なモデルが得られた。



(2) CD73 によるリンパ管網形成能への亢進/阻害効果の検討

ヒトリンパ管形成モデルにおける CD73 の局在と酵素活性染色

ヒトリンパ管形成モデルでは NHDF の酵素活性が比較的強かった。単層培養 NHDF での酵素活性染色は細胞全体に及ぶが、単層培養 LEC の酵素活性染色は核周囲の細胞質に集中しており細胞膜上の染色は薄かった。CD73 は膜タンパク質であり、免疫染色結果において LEC の核が強く染色されていないことから、ヒトリンパ管形成モデルにおいて LEC の CD73 の発現量および酵素活性は NHDF と比べて弱いと考えられる。



ヒトリンパ管形成モデルにおける CD73 のリンパ管網形成能の亢進/阻害効果の検討

ヒトリンパ管形成モデルでの CD73 KD によるリンパ管網形成の亢進/阻害効果は認められなかった。ロックダウン効率は 50~70%程度であったため、ロックダウンが不十分であった場合を考慮し AMPCP (CD73 阻害剤) と NECA (アデノシンレセプターアゴニスト) の投与試験を行った。細胞外基質中のアデノシンが枯渇すると想定して AMPCP を投与しており、NECA と反する作用がある考えていたが、AMPCP と NECA を投与した場合いずれも mock と比べてリンパ管網形成を亢進した。

Matrigel チューブ形成アッセイによる CD73 のリンパ管網形成能の亢進/阻害効果の検討

Matrigel を用いた LEC チューブ形成アッセイによる CD73 KD 試験の結果、リンパ管網形成の亢進/阻害効果は認められなかった。また、AMP、AMPCP 投与試験の結果も同様にリンパ管網形成の亢進/阻害効果は認められなかった。で観察した AMPCP と NECA 投与時のリンパ管網形成亢進作用は NHDF に由来するものであると考えられる。

以上の結果から CD73 の発現および細胞外基質中のアデノシン濃度がリンパ管網形成能に関与していると示唆された。ヒト腸間膜のように CD73 が特にリンパ管で強く発現している場合もあるが、での観察結果のようにそうでない場合もある。組織毎にリンパ管形態形成に対する効果が異なるかもしれないと考えており、今後検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Matsusaki Michiya, Kano Mitsunobu R., Nishihara Hiroshi, Okano Daisuke, Asano Yoshiya, Shimoda Hiroshi, Kishimoto Satoko, Iwai Soichi, Akashi Mitsuru	4. 巻 179
2. 論文標題 In?vitro 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 144 ~ 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2018.06.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野大輔, 浅野義哉, 松崎典弥, 明石満, 下田浩
2. 発表標題 リンパ管形態形成におけるAngiopoietin-2の機能解析
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野大輔
2. 発表標題 三次元積層培養組織におけるリンパ管の形態形成
3. 学会等名 第5回リンパ学に関する松本カンファランス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡野大輔, 浅野義哉, 松崎典弥, 明石満, 下田浩
2. 発表標題 リンパ管ネットワーク構築におけるCD73の役割
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	下田 浩 (Shimoda Hiroshi)		
研究協力者	松崎 典弥 (Matsusaki Michiya)		