

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19908

研究課題名（和文）がん転移と脈管新生の革新的理論：組織内集光性を高めた次世代光学顕微鏡による医工学

研究課題名（英文）A noble strategy for better understanding cancer metastasis and tumor-associated angiogenesis

研究代表者

平川 聡史（Hirakawa, Satoshi）

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任研究員

研究者番号：50419511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの身体には血管とリンパ管が存在し、ふだん血管には血液が、リンパ管にはリンパ（液）が流れている。がんや炎症などの病気が生じると、多くの組織では血管が拡張し、血管を増やす因子が発現する。この因子は血管新生因子と呼ばれ、病的な状態ではリンパ管の拡張や増殖を促す場合もある。今回の研究では、強制的に血管新生因子を舌に発現させたマウスを用いて、野生型マウスの舌と比較しながら血管とリンパ管の変化をレーザー顕微鏡で観察した。この結果、血管・リンパ管が拡張・増殖するだけに止まらず、強制的に発現した血管新生因子に晒された舌では、所々で血管とリンパ管が吻合し、血液がリンパ管を流れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、血管とリンパ管は末梢組織において独立して存在し、血流とリンパ流は互いに交わることはないと考えられている。しかし、今回の研究結果では、ある病的な環境では血管とリンパ管が吻合する場合があります。血流がリンパ管へ流れ込む可能性があることが示唆された。一般に、複数の癌腫では病期分類が行われ、この因子には癌組織における脈管侵襲やリンパ節転移あるいは遠隔転移が挙げられる。今後、本研究成果に基づいて、もしヒトの癌組織において血管及びリンパ管が交通することが示唆される場合には、病期分類の因子について、その独立性や関連性がさらに検討され、議論される必要があるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Human organs, in general, consist of blood vascular and lymphatic vessels. Blood streams normally flow in the blood vessels, whereas lymph drains lymphatic vessels. In pathologic conditions such as cancer and/or inflammation, blood vessels are enlarged, and flow increases. Importantly, this condition induces several growth factors that promote blood vessel formation including vascular endothelial growth factor (VEGF). Our previous findings suggest that VEGF might promote lymphatic vessel growth as well as blood vessel formation. Furthermore, a particular disorder by lymphatic malformation may cause an abnormal connection by lymphatic vessels to blood vessels. Therefore, we wondered if the targeted overexpression of VEGF in the mouse tongue may induce the pathologic blood and lymphatic vessel connection, and found that those vessels are potentially fused by scanning image analysis using a laser microscopy.

研究分野：血管・リンパ管新生

キーワード：血管新生 リンパ管新生 がん微小環境 循環系 遺伝子改変動物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究に携わる研究者は、以前スイス連邦工科大学の研究者と共同研究を行い、マウス皮膚発癌モデルを用いて血管・リンパ管新生の研究を行ってきた。がん組織では、VEGF が豊富に分泌され、血管・リンパ管新生が起きる。そして、転移先であるリンパ節でもリンパ管新生が起き、リンパ節では転移が促進するとともに、リンパ行性転移が拡大する。かつて共同研究チームは、この概念を報告し、リンパ行性転移における新たな理論として世界で広く認識された(Hirakawa S et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 他)。この研究は、血管新生の代表的な因子の一つである vascular endothelial growth factor (VEGF)-A を皮膚に強制発現させるトランスジェニック (TG) マウス (K14-VEGF-A TG マウス) を用いて実施した。

今後、がん転移の診断方法を新たな観察手法を用いてさらに検討し、既存の概念にとらわれることなく、実際に観測された結果に基づいて、新たな理論を構築していくことが肝要に思われる。本学では、空間光変調器を応用した次世代2光子レーザー顕微鏡を始め、新たな観測技術に基づいた光学機器の医学応用が研究されている。そこで、本研究では、この新しいレーザー顕微鏡を既存のモデルマウスに応用し、新たな生物像を発見するとともに、本邦で研究開発した光学機器を応用すべく研究を実施したいと考えた。この着想と観測方法は、新しい研究成果を生み出し、がんに関わる医学の体系を変え、診断・治療の方向を大きく転換する潜在的可能性があり、共同研究者とともに研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代2光子レーザー顕微鏡を用いて、今まで捉えることが出来なかった脈管の正常発生を観測し、病的変化を検出することにより、マウスの脈管系を捉え直し、がん組織における新たな転移経路を考察すべく取り組むことである。本研究に至る過程で、研究者は VEGF-A に関する医学・生物学的研究に取り組み、K14-VEGF-A TG マウスを用いて血管・リンパ管新生に関する研究成果を報告して来た(Nishida-Fukuad H et al. *J Biol Chem.* 2016)。本研究では、このトランスジェニック・マウスを観察する新たな手法として次世代2光子レーザー顕微鏡を選択し、従来観測することが不可能であった血管・リンパ管の三次元構築及び病的変化を観測することにより、VEGF-A に関する新たな生物像を解明することにより、既存の概念には存在しなかった学問体系を構築することを目指し、本研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

空間光変調器を装備した2光子レーザー顕微鏡は、蛍光波長が異なる複数の蛍光物質を時空間的に検出することが出来る。本研究で、血管とリンパ管を異なる蛍光物質で標識し、血管-リンパ管の交通を明らかにするためには、異なる蛍光物質の局在が同一であることを示す必要がある。そこで蛍光物質の特性評価を行い、各蛍光物質に特異的なフィルターを顕微鏡に装着することを目的として、蛍光色素の特性を評価した。

本研究では、リンパ管特異的に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現するトランスジェニック・マウス Prox1-EGFP TG マウスを用いて、実験的にマウスリンパ管を観測した。さらに、このマウスに K14-VEGF-A TG マウスを交配することにより、皮膚や舌に VEGF を過剰発現し、リンパ管を可視化できる Prox1-EGFP/K14-VEGF-A TG マウスを作成した。舌を観測する研究では、蛍光色素で標識された Isolectin B4 を静脈内投与し、血管内皮細胞を細胞レベルで標識した。この組織を観測することにより、血管から Isolectin B4 が流入し、リンパ管内皮細胞の細胞膜が蛍光標識され、血管とリンパ管に交通があるかどうか、三次元画像を分析して検討した。対照群には、Prox1-EGFP TG マウスを用いて血管及びリンパ管を観測し、脈管系の正常発生

を基準に Prox1-EGFP/K14-VEGF-A TG マウスの脈管系を比較検討した。この観測方法は、過剰な VEGF によって血管・リンパ管の変化を立体的に捉えることを実現するとともに、1 細胞における蛍光シグナルを部位特異的に検出することを目指すものである。観測組織は、パラホルムアルデヒド固定後、組織構築の変化を最小限に留めた透明化技術により処理し、次世代 2 光子レーザー顕微鏡で観測した。この画像を編集することにより、組織の立体構築を再現し、Prox1-EGFP/K14-VEGF-A TG マウスの血管及びリンパ管の三次元構築を明らかにした。本研究に着手することにより、生体試料の観測技術が飛躍的に向上することが期待された。

4. 研究成果

(1) マウス血管及びリンパ管の三次元構築：過剰な VEGF-A の作用に関する考察

K14-VEGF TG マウスは、皮膚とともに舌に VEGF を過剰発現するモデルである。舌は、皮膚と比較すると血管・リンパ管密度が高い。そこで、本研究では Prox1-EGFP/K14-VEGF-A TG マウス及び Prox1-EGFP マウスの舌を透明化し、次世代 2 光子レーザー顕微鏡で観測した。この結果、蛍光色素の波長に基づいて毛細血管まで可視化するとともに、組織の深部に分布する血管の蛍光波長も検出することが出来た。次に、EGFP の検出感度に基づいて、表皮直下に分布する毛細リンパ管から比較的深部に分布する集合リンパ管まで観測することが出来た。さらに、Prox1-EGFP/K14-VEGF-A TG マウスの組織に着目すると、血管内に注入した Isolectin-B4 がリンパ管内皮細胞を標識し、検出し得ることが明らかになり、今まで観測できなかった血管-リンパ管吻合を初めて見出した。この知見に基づいて、がん組織における血管・リンパ管網を考察すると、VEGF の存在下では血管とリンパ管が交通し、がん細胞の転移経路は単に血管、リンパ管だけではなく、血管-リンパ管吻合を介した複雑な経路が示唆された。

(2) 世界に先行する光学システムの応用

収差補正を用いた 2 光子レーザー顕微鏡は、極めて高い分解能を有し、微小血管及びリンパ管の構築を正確に観測する上で、極めて有用である。本研究において、もし空間光変調器が搭載されていなければ、血管-リンパ管吻合を見出すことは出来なかった。この次世代機器は、浜松医科大学と浜松ホトニクスで開発された光学機器である。従って、本機器の特性を最大限に活用し、マウス組織における脈管の構築を明らかにすることにより、今まで全く知り得なかった生物像を新たな技術で解明することを実現した。すなわち、本研究は医工学の学術基盤の一端を創出し、医学への応用を実現した研究課題であり、医用工学と生物学に貢献するものである。

(3) 血管生物学と疾病のさらなる理解

個体発生における血管・リンパ管形成は、内皮細胞の増殖に始まり、成熟とリモデリング（分化）を伴い完成する。この血管発生の初期を司るのが VEGF ファミリーである。VEGF-A は、従来血管新生に関わる代表的な因子として認識されている。しかし、研究者の成果は、VEGF-A が血管のみならずリンパ管にも作用することを示唆するものである。個体発生後、がん組織を始めとする微小環境において VEGF-A が過剰に産生されると、血管及びリンパ管が拡張したり、内皮細胞が増殖して発芽したり血管・リンパ管新生が促されることが示唆される。そして、本研究の結果、この新生血管及びリンパ管は互いに作用し、吻合する場合もあることが新たに示された。ある病的環境において、時空間的に VEGF が制御されなければ脈管の分化が損なわれ、血管-リンパ管吻合を含む複雑な脈管網が形成されることを本研究は示唆している。本研究は、血管生物学

の本質に迫ったものであり、学術的にも意義がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 Sano Masaki, Hirakawa Satoshi, Yamanaka Yuta, Naruse Ena, Inuzuka Kazunori, Saito Takaaki, Katahashi Kazuto, Yata Tatsuro, Kayama Takafumi, Tsuyuki Hajime, Yamamoto Naoto, Takeuchi Hiroya, Unno Naoki	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of a Noninvasive Skin Evaluation Method for Lower Limb Lymphedema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 7~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2018.0089	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 -

1. 著者名 Ozeki M, Asada R, Saito A, Hashimoto H, Fujimura T, Kuroda T, Ueno S, Watanabe S, Nosaka S, Miyasaka M, Umezawa A, Matsuoka K, Maekawa T, Yamada Y, Fujino A, Hirakawa S, Furukawa T, Tajiri T, Kinoshita Y, Souzaki R, Fukao T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficacy and safety of sirolimus treatment for intractable lymphatic anomalies: A study protocol for an open-label, single-arm, multicenter, prospective study (SILA)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 84~91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.12.001	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 -

1. 著者名 Ozeki Michio, Nozawa Akifumi, Kawamoto Norio, Fujino Akihiro, Hirakawa Satoshi, Fukao Toshiyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Potential biomarkers of kaposiform lymphangiomatosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e27878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.27878	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 -

1. 著者名 平川聡史, 山崎直也	4. 巻 68
2. 論文標題 がん薬物療法においける皮膚障害とその対策：いま・これから	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 新薬と臨床	6. 最初と最後の頁 113, 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 平川聡史, 妹尾千代, 針山孝彦, 中野紀穂	4. 巻 46
2. 論文標題 がん薬物療法に伴う皮膚障害対策とアピアランスケア	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 クリニックマガジン	6. 最初と最後の頁 9, 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平川聡史, 松本直也, 紺野 在, 河崎秀陽, 針山孝彦, 妹尾千代, 太田 勲, 松岡健太郎, 藤野昭浩, 岡崎茂俊
2. 発表標題 リンパ管腫/嚢胞性リンパ管奇形の考察: マウス血管・リンパ管の形成におけるVEGF-Aの作用
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川聡史
2. 発表標題 リンパ管発生の基礎
3. 学会等名 第3回小児リンパ管疾患シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川聡史, 針山孝彦, 中野紀穂.
2. 発表標題 An essential role of supportive and appearance care for cancer patients.
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 平川聡史、松井礼子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 67
3. 書名 月刊薬事 がん治療の皮膚・粘膜障害	

1. 著者名 山崎直也, 平川聡史ほか(日本がんサポーターケア学会編)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 160
3. 書名 がん薬物療法に伴う皮膚障害アトラス&マネジメント.	

〔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
研究分担者	岡崎 茂俊 (Okazaki Shigetoshi) (50394002)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------