

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16742

研究課題名（和文）がん細胞浸潤運動に呼応する腫瘍血管伸長の解明

研究課題名（英文）Elucidation of tumor vascular distribution mechanism controlled by cancer cell infiltration movement

研究代表者

村松 史隆（Muramatsu, Fumitaka）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員

研究者番号：90803627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管内皮と組織内における癌細胞の運動性との関連を軸としたシングルセルレベルの生体イメージング解析を通じて、これまで提唱されてきた腫瘍血管新生モデルとは異なる新たな血管供給モデルを構築し、その根幹となるメカニズムの解析を目指した。VEGFシグナルにより誘導される腫瘍血管の組織内分布様式は、辺縁領域におけるがん細胞の浸潤運動に従うことが明らかとなった。この現象は多様ながん組織においても認められ、腫瘍細胞間の接着性による組織結合性ではなく、浸潤性の高いがん細胞集団がVEGFを強く発現すつことで腫瘍血管先端細胞の伸長ベクトルを制御することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、血管内皮と組織内における癌細胞の運動性との関連を軸としたシングルセルレベルの生体イメージング解析を通じて、これまで提唱されてきた腫瘍血管新生モデルとは異なる新たな血管供給モデルの構築とそのメカニズムを解析した。さらに腫瘍細胞集団一部のサブセットにおいて、この新しい血管供給モデルの誘因する特異的な細胞群が存在することが判明した。さらにこの細胞群は血管新生阻害剤に耐性を示すがん種において、顕著に認められることから、血管新生阻害剤が多くの臨床試験で有効な生存期間の延長が得られていない問題を解決の糸口となり、新概念に基づくがん治療の開発に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed a new vascular supply model different from the tumor angiogenesis model proposed so far. Through single-cell level bioimaging analysis centered on the relationship between vascular endothelium and cancer cell motility in tissues, it was revealed that the distribution pattern of VEGF signal-induced angiogenesis follows the infiltration movement of surrounding cancer tissues. This phenomenon is also observed in various cancer tissues, and it is clarified that the highly invasive cancer subpopulation controls the elongation vector of tumor vascular tip cells, not due to cell-cell adhesion molecules.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 がん 生体イメージング 神経膠芽腫

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織の隅々にまで新たに張り巡らされた血管ネットワークは、酸素や栄養分を供給することで腫瘍の増大に働いている。血管内皮細胞成長因子 (VEGF) が血管内皮細胞に作用することで、既存の血管から新たな血管が発芽する「血管新生」が引き起こされ、腫瘍血管が構築されている。腫瘍血管内皮細胞は、がん微小環境を構成する細胞でもあり、薬剤耐性がん細胞を支持したり、腫瘍内部の間質圧を高めて薬剤送達を妨げたりしてしまうため、抗がん剤の治療効果を減弱させる一因と言われていた。そのため、抗 VEGF 薬を始めとする腫瘍血管抑制法が研究されてきた。その一方、近年目覚ましい発展がみられる「がん免疫療法」をより効果的にするには、腫瘍血管を介したリンパ球の供給が不可欠であり、がん治療において腫瘍内に血管組織が豊富に存在することは必ずしもがん治療に不利となるわけではない。がんの種類に応じた適切な治療を選択するには、血管網が腫瘍組織内における分布する意義およびその詳細なメカニズムの理解が必要とされている。

体系的な血管網が構築される発生過程に見られる血管新生パターンと異なり、腫瘍組織では歪で不均一な血管網が形成される。そのため腫瘍血管の形成パターンを決定づける根源的なドグマは存在せず、腫瘍組織内での過剰な VEGF 産生や、無秩序な VEGF 濃度勾配形成によって、結果的にやみくもな血管網が形成されていると考えられてきた。この混沌とした腫瘍血管新生の詳細を理解し、腫瘍血管形成過程における血管内皮細胞のダイナミクスを解明するため、長期間の連続的生体イメージング解析腫瘍を開発した。これまでの神経膠芽腫モデルを用いた腫瘍血管新生の生体イメージング研究では、組織内 VEGF 濃度勾配に従い腫瘍を灌流するような求心的な内皮細胞の遊走は観察されなかった。一方で、VEGF による新生血管内皮の伸長ベクトルと腫瘍組織の増大するベクトルには局所的な強い相関が認められた。このような血管分布の様式は古典的な血管新生モデルでは説明できず、新しい腫瘍血管新生モデルの構築とその分子機構の詳細な検討が必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

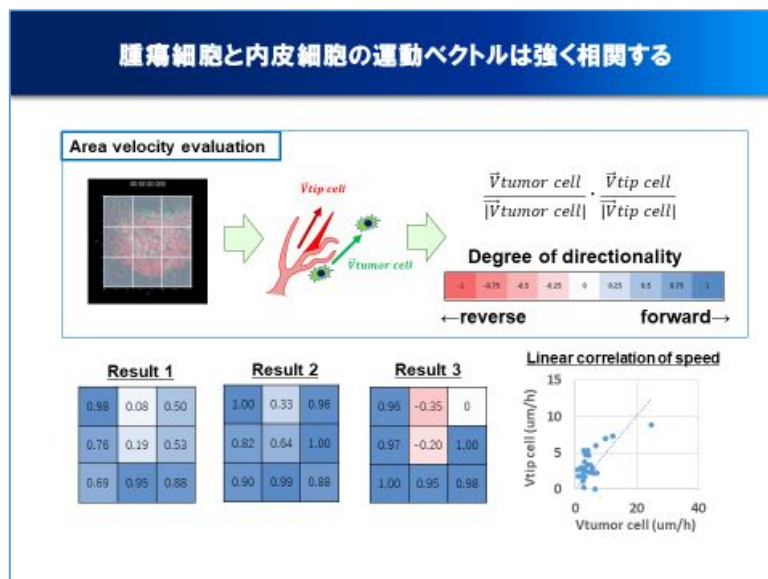
本研究は、血管内皮と組織内における癌細胞の運動性との関連を軸としたシングルセルレベルの生体イメージング解析を通じて、これまで提唱されてきた腫瘍血管新生モデルとは異なる新たな血管供給モデルの構築とそのメカニズムの解明を目的としている。この新しい血管供給モデルは血管新生阻害剤が多くのヒト臨床試験で限定的な効果しか示せなかった理由を解明し、新概念に基づくがん治療の開発に繋がると期待できる。

### 3. 研究の方法

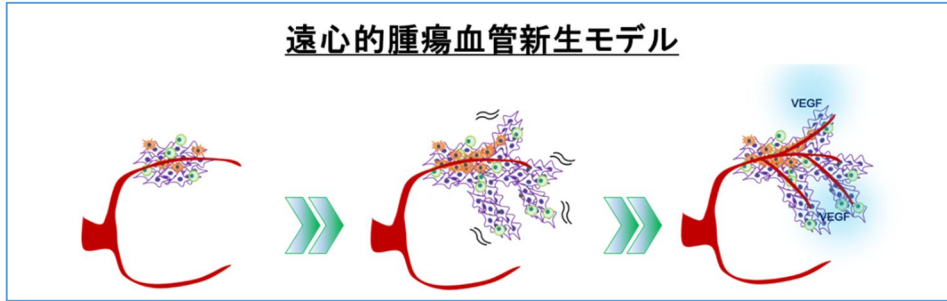
「腫瘍細胞運動による血管伸長」現象を理解するため腫瘍血管の生体イメージング解析系を確立させた。血管イメージングマウス *Apln-promoter-tdTomato* TG マウスの大脳皮質に *open skull* 法を応用して、種々のがんスフェロイドを頭蓋内に移植するモデルマウスを作製した。これらのモデルマウスを麻酔し、二光子励起顕微鏡下で 24 時間の連続撮影を行うことで、がん細胞運動性と腫瘍血管新生の運動性を評価した。連続撮影像の画像処理および解析は、*Volocity* 解析ソフトを用いた。さらに、腫瘍内の微細な環境の違いによる、個々のがん細胞の詳細な遺伝子発現パターンを解析するため、*ICell8* を利用したシングルセル RNA-Seq 解析を行い、細胞のクラスタリングを行った。

### 4. 研究成果

神経膠芽腫 GL261 細胞および腫瘍血管内皮細胞の生体イメージング解析の結果より、腫瘍細胞の運動性と新生血管の伸長方向には強い正の相関があることが明らかとなった。初めは数個の腫瘍細胞は 1 週間ほどかけて分裂増殖を繰り返すうち、腫瘍内部に原始の新生血管を獲得することで腫瘍組織としての体系を獲得することが明らかとなった。我々は連続的にその原始の腫瘍血管から分岐する新生



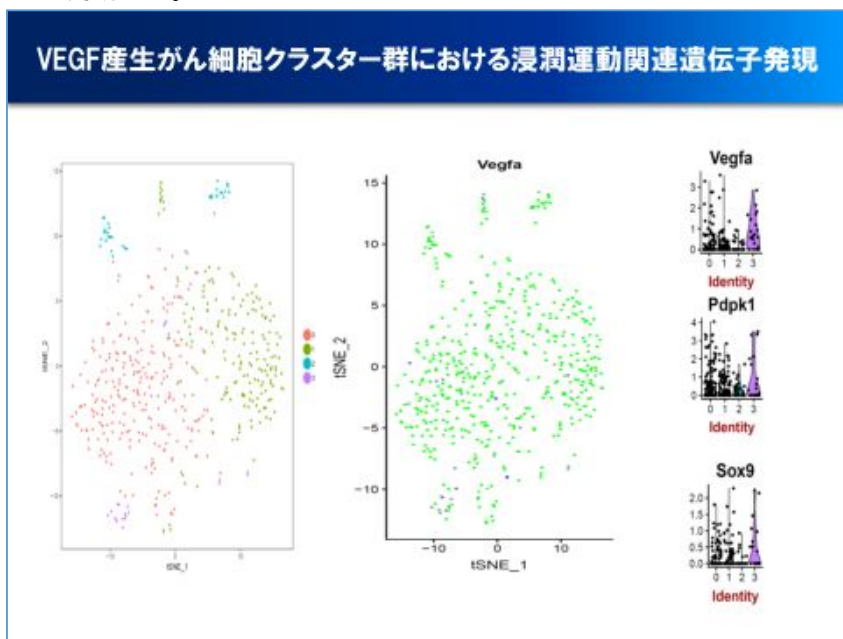
## 遠心的腫瘍血管新生モデル



血管の枝の進展をつぶさに観察したところ、腫瘍組織を構成する血管は腫瘍組織を形成した後は、腫瘍外部すなわち正常大脳皮質由来の新生血管を獲得するのではなく、腫瘍組織の増大分を追いかけるよう内部血管が伸長することで組織内を還流する血管を獲得していることが判明した。この現象は、低酸素となった腫瘍細胞が産生する VEGF によって腫瘍血管が組織内部に侵入する古典的腫瘍血管新生モデルとは異なっていた。さらに腫瘍内部に形成された腫瘍血管からは、ほとんど発芽の血管新生は認められず、腫瘍辺縁領域に腫瘍浸潤方向に沿う形で発芽的血管新生が認められたことから、腫瘍組織内の腫瘍細胞の合一的な運動性との因果関係が想起された。LLC 肺がんは特に腫瘍組織の成長が著しいがん種であるが、生体イメージング解析の結果では GL261 細胞よりも激しい細胞浸潤運動と早い新生血管の伸長が確認され、腫瘍細胞運動により制御される血管新生パターンと強く合致した。LLC 細胞と GL261 細胞の運動性と血管伸長速度の差異に着目し、それぞれのがん細胞の遺伝子パターンを RNA-Seq 解析し、細胞間接着分子と細胞運動関連遺伝子の発現の差異を中心に検証をすすめた。

RNA-seq 解析および、ウェスタンプロテイングにより、GL261 と LLC 腫瘍細胞とでは細胞間接着因子 N-カドヘリンの発現に大きな差異があることが判明した。LLC 肺がん細胞は N-カドヘリンの発現に乏しいために個々の細胞運動が活発であり、逆に GL261 は N-カドヘリンを介した安定的な細胞間接着により個々の細胞浸潤速度が低下していると考えられた。そのため N-カドヘリンを恒常的に発現する LLC 細胞および、Crispr-Cas9 システムを利用した N-カドヘリンノックアウト GL261 細胞を作製し、生体イメージング解析を行った。その結果、それぞれの腫瘍細胞の接着性は変化してはいたが、個々の細胞の運動性が変化し、腫瘍血管伸長速度に影響を与えるにはいたらなかった。結果的に、「腫瘍細胞運動により制御される血管新生モデル」と細胞間接着分子の関与は乏しいことが判明した。

次に、我々は個々の細胞の運動性と VEGF の発現量との因果関係がこの血管新生モデルとなると予想し、シングルセル解析によりがん細胞を 4 つのクラスターに分類した。腫瘍組織辺縁での運動性に伴う血管新生は VEGF シグナルにより制御されていたので、VEGF を強く発現する細胞クラスターに着目し、他の遺伝子発現を検討したところ、細胞浸潤に関連する Pdpk1 や Sox9 転写因子も強く



発現していた。さらにこの VEGF 高く発現するクラスターでは、HIF1a の発現強く認められ、がん浸潤の辺縁領域、すなわち血管から遠い位置にて浸潤するがん細胞で、特に強い VEGF 発現が誘導される要因となっていると考えられた。

本研究は、血管内皮と組織内における癌細胞の運動性との関連を軸としたシングルセルレベルの生体イメージング解析を通じて、これまで提唱されてきた腫瘍血管新生モデルとは異なる新たな血管供給モデルの構築に成功し、この血管供給モデルを高い浸潤運動性をもつ細胞群が担うことを示した。以上の成果は、既存の血管新生阻害剤が有効でない腫瘍血管に対する新規治療法の開発に繋がると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kidoya Hiroyasu, Muramatsu Fumitaka, Shimamura Teppei, Jia Weizhen, Satoh Takashi, Hayashi Yumiko, Naito Hisamichi, Kunisaki Yuya, Arai Fumio, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Osawa Tsuyoshi, Akira Shizuo, Takakura Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09028-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Yumiko, Jia Weizhen, Kidoya Hiroyasu, Muramatsu Fumitaka, Tsukada Yohei, Takakura Nobuyuki	4. 巻 189
2. 論文標題 Galectin-3 Inhibits Cancer Metastasis by Negatively Regulating Integrin 3 Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 900 ~ 910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naito Hisamichi, Iba Tomohiro, Wakabayashi Taku, Tai-Nagara Ikuo, Suehiro Jun-ichi, Jia Weizhen, Eino Daisuke, Sakimoto Susumu, Muramatsu Fumitaka, Kidoya Hiroyasu, Sakurai Hiroyuki, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Kubota Yoshiaki, Takakura Nobuyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 151 ~ 166.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2018.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichijo R., Kabata M., Kidoya H., Muramatsu F., Ishibashi R., Abe K., Tsutsui K., Kubo H., Iizuka Y., Kitano S., Miyachi H., Kubota Y., Fujiwara H., Sada A., Yamamoto T., Toyoshima F.	4. 巻 7
2. 論文標題 Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukada Yohei, Muramatsu Fumitaka, Hayashi Yumiko, Inagaki Chiaki, Su Hang, Iba Tomohiro, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 An in vivo model allowing continuous observation of human vascular formation in the same animal over time	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80497-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jia Weizhen, Kong Lingyu, Kidoya Hiroyasu, Naito Hisanichi, Muramatsu Fumitaka, Hayashi Yumiko, Hsieh Han-Yun, Yamakawa Daishi, Hsu Daniel K., Liu Fu-Tong, Takakura Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22346-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村松 史隆、木戸屋 浩康、林 弓美子、塚田 陽平、高倉 伸幸
2. 発表標題 テモノロミド耐性膠芽腫の生体イメージング解析
3. 学会等名 第27回日本血管生物学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生体イメージング解析が解き明かす神経膠腫の薬剤耐性化メカニズム
2. 発表標題 村松 史隆、木戸屋 浩康、塚田 陽平、高倉 伸幸
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitaka Muramatsu, Hiroyasu Kidoya, Yumiko Hayashi, Yohei Tsukada, Nobuyuki Takakura
2. 発表標題 Vascular Niche Signals via Ceruloplasmin-Iron Ion Metabolism Promote Glioma Resistance to Anticancer Drugs
3. 学会等名 IVBM2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumitaka Muramatsu, Hiroyasu Kidoya, Yumiko Hayashi, Yohei Tsukada, Nobuyuki Takakura
2. 発表標題 グリオーマ腫瘍血管は、セルロプラスミンによる鉄イオン代謝を介して薬剤耐性を促す微小環境を構築する
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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

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