

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460262

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュがんモデルを用いた腫瘍リンパ管新生の形態形成と分子機構の解明

研究課題名(英文) Tumor cell dynamism and molecular mechanism invloved in tumor vascular metastasis in novel cancer research model of zebrafish

研究代表者

下田 浩 (Shimoda, Hiroshi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20274748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトがん細胞の転移ダイナミズムを解析可能なfli1:egfpトランスジェニックゼブラフィッシュがんモデルシステムを開発・構築した。本システムにおいてがん細胞の生体内動態、血管・リンパ管への侵入と脈管内の移動をライブイメージングムービーで初めて捉え、がん転移におけるセルダイナミズムと微小脈管新生を明らかにした。VEGF産生がん細胞などの移植モデルでは血管およびリンパ管内皮細胞ががん細胞に対して局所増生を示し、脈管侵襲を促進するなど、がん細胞の脈管成長関連分子の発現の差異および生体の時間軸における分子発現動態により様々な転移セルダイナミズムを呈することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A novel cancer research model of transgenic zebrafishes, which allowed a precise analysis of cancer cell dynamism for metastasis through blood and lymphatic vasculature, was developed. Live imaging of human tumor cells in the metastasis model unveiled some unique patterns of tumor vascular invasion and of motion of tumor cells through vasculature. The zebrafish implanted with human pancreatic cancer cells producing VEGF-A often demonstrated focal growth of vascular endothelial cells at tumor invasion sites. The molecular mechanisms involved in tumor vascular invasion including microangiogenesis and/or lymphangiogenesis is under investigation.

達成度

研究分野：医歯薬学

キーワード：ゼブラフィッシュがんモデル 腫瘍脈管新生 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

がんの進展と血行性・リンパ行性転移のメカニズムの解明に向けて生体イメージングや遺伝子操作に優れた新たな研究モデルの開発が強く望まれている。最近我々はそれらの利点を備えた次世代バイオアッセイモデルとして注目されるゼブラフィッシュに血管系の発達とともにリンパ管系が形成されることを明示した。

これより、ゼブラフィッシュがん移植モデルを開発し、がん細胞の脈管新生・侵襲および転移のダイナミズムとメカニズムの解明に向けて新しい展開を行う。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュがん移植モデルを確立し、がんの脈管新生・侵襲と転移微小環境形成のダイナミズム、ならびにその制御分子の発現と機能を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 野生型および脈管系が緑色蛍光 (GFP) を発するトランスジェニック (fli1:egfp) ゼブラフィッシュを実験動物として用いた。
- 2) 受精後数日から数週の各ゼブラフィッシュの心臓尾側の体腔内に赤色蛍光 (RFP) 標識した肺癌、乳癌など数種のヒトがん細胞数個~数十個をマイクロインジェクションし、ヒトがん細胞移植ゼブラフィッシュモデルを開発・確立した。
- 3) 移植がん細胞における脈管成長因子、がん転移関連因子の発現解析を行うとともに、血管成長因子 (VEGF-A など) を高発現するがん細胞を確立し、2) と同様にゼブラフィッシュの体腔内に移植し、がんモデルを開発・確立した。
- 4) がん細胞の体内動態、生体内脈管新生、がん転移微小環境の細胞・組織の時間軸におけるダイナミズムについてタイムラプスイメージング技術によりゼブラフィッシュ全体における生体ライブイメージングを行った。
- 5) 3) で得られたライブイメージングデータとともに実験モデルより生体組織固定試料を採取し、分子形態学・生物学的手法によりがん微小環境・転移制御因子の発現と機能ならびにがん細胞の機能分子発現と役割について解析を行った。
- 6) CRISPR/Cas9 システムを用いて VEGFR-3 (脈管成長因子受容体の一つ):egfp の導入および VEGFR3 のノックダウンを行ったトランスジェニックゼブラフィッシュならびにそれを用い

たがん移植モデルの開発に伴うライブイメージング・分子形態学的解析が現在進行中である。

4. 研究成果

1) がん細胞動態の生体イメージングモデルの開発

野生型および fli1:egfp トランスジェニックゼブラフィッシュの心臓尾側の体腔内に数個のヒトがん細胞をマイクロインジェクションすることでがん細胞の体腔内及び脈管転移セルダイナミズムを追跡できるシステムを開発した (図1)。

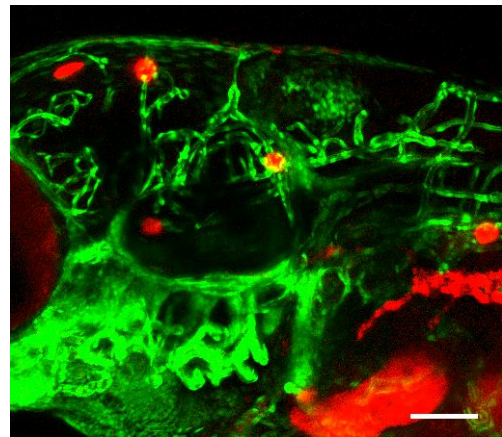


図1. ヒトがん細胞 (赤) 移植 1 日後の fli1:egfp ゼブラフィッシュの生体イメージング。体腔内に移植された複数のヒトがん細胞が頭~体部にかけて広がっている。一部のがん細胞は脈管 (緑) 壁に付着している。Bar 100 μ m

2) がん細胞脈管侵襲のダイナミズム

生体内でがん細胞は体腔内を移動した後、血管の外壁において細胞質突起を探触子のように伸ばし、外形を変化させながらアメーバ状の動きをもって管壁に沿って移動した。その後、がん細胞は主に2種類の様式をもって血管内への侵入を図っていた。

一つは血管外壁のある領域で細胞形の一部を紡錘状に伸長し、血管内皮細胞とせめぎ合いながら内皮細胞間に小列隙を生じさせて血管内に侵入していく様式であり、もう一つは VEGF 産生性がん細胞に見られたもので、複数の血管内皮細胞ががん細胞に向かって膜様の細胞質突起を広げてがん細胞を血管内腔に取り込んでいく侵襲様式であった (図2)。

これらは脈管侵襲を含むがんの微小環境形成の細胞・組織ダイナミズムを初めて生体イメージングで捉えたもので

あり、特に後者の様式はがん転移に与る微小血管新生といった新しい概念を提供している。

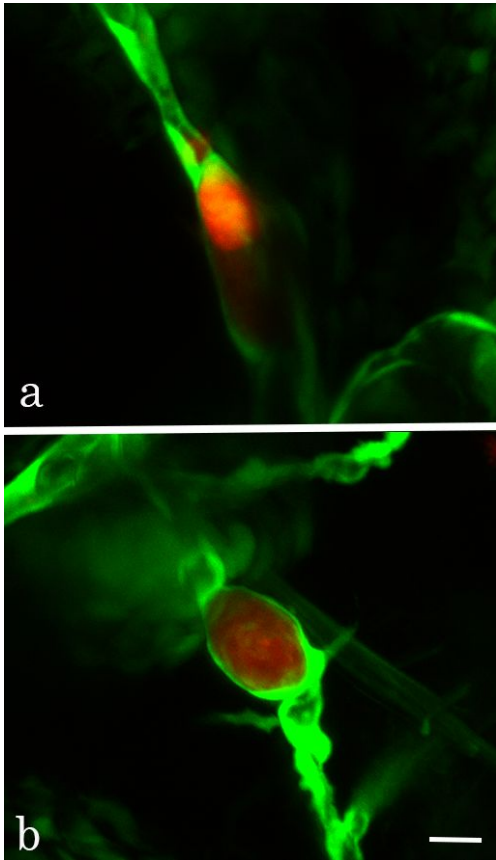


図2 . ヒトがん細胞 (赤) 移植 2 日後の fli1:egfp ゼブラフィッシュ体幹の脈管 (緑) の一部 . a. がん細胞の紡錘状の先進部が脈管内皮細胞の間隙より内腔に侵入する . b. がん細胞が脈管壁に接着した後、脈管内皮細胞が細胞質を膜状に広げて (微小脈管新生) がん細胞を管腔内に取り込む。Bar 10 μm

3) がん細胞脈管内動態のダイナミズム

血管内に侵入したがん細胞は血流に乗るよりもむしろアメーバ様の動きをもって血管内皮に接しながら移動し、内腔ががん細胞径より狭い部位の移動は血管壁の分節運動を利用していった (図3)。また、移動経路の選択はがん細胞と血管内皮細胞との競合により選択されていた。血管から組織内への移行と転移巣の形成については引き続き解析中である。

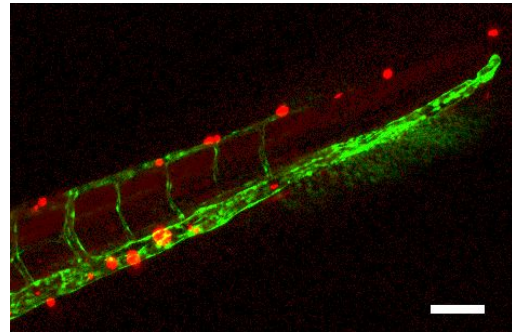


図3 . ヒトがん細胞 (赤) 移植 3 日後の fli1:egfp ゼブラフィッシュ体幹の脈管 (緑) の一部。血管内に侵入したがん細胞 (赤) が脈管内皮に接しながら移動している。Bar 100 μm

4) がん微小脈管新生のダイナミズム

がん細胞の VEGF など脈管成長因子の発現の差異および遺伝子抑制により微小血管・リンパ管新生およびがん転移動態が異なることが判明した。

VEGF 産生がん細胞などの移植モデルにおいて血管新生とともにリンパ管内皮細胞の局所的増生 (微小脈管新生) が見られた。現在さらに明確なリンパ管新生・転移メカニズムを追跡できる CRISPR/Cas9 システムによる VEGFR3:egfp の導入と VEGFR3 ノックダウンを行ったゼブラフィッシュによるがん移植モデルの開発と解析を行っている。

5) 研究成果の位置づけとインパクト

本研究はゼブラフィッシュを用いてがん転移のメカニズム解明に向けた新しい研究モデルを開発・確立した。本モデルは生体内における 1 個のがん細胞のダイナミズムを時間・空間軸で追究することが出来るユニークなモデルである。これによりがん細胞の体内での動き、血管・リンパ管への侵襲とそれに対する脈管構成細胞の反応・動態、血管・リンパ管内でのがん細胞の移動、さらに脈管外へのがん細胞の移動・定着、転移巣の形成を、これまでのような静的・断片的な解析ではなく、ライブイメージングにより連続した動きを捉えた情報を得ることが可能である。

がん細胞や生体自身のある特定の分子発現によりがん細胞と生体組織・細胞のダイナミズムに明らかな変化が見られ、微小脈管新生を初めとするこれまで全く知られていなかった新しいがん細胞の脈管侵襲、脈管内移動に与るがん細胞と脈管構成細胞の動態について新知見を提供している。

6) 今後の展望

本研究は現在も進行中であるが、今後本モデルにおいてさらにがん細胞およびゼブラフィッシュ生体の遺伝子改変を併用、充実させることにより、がん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、本モデルは抗がん剤を初めとする薬剤の薬効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

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

ある

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Erina Saito, Sumio Isogai, Hirokazu Narita, Daisuke Okano, Hiroshi Shimoda: Lymphatic transport pathway in small fish. 25th World Congress of Lymphology. 2015.9.7-9.11 Hilton Union Square, San Francisco, CA, USA

齊藤絵里奈、磯貝純夫、木村英二、下田 浩、人見次郎: 血管発生・新生における動・静脈内皮細胞分化に係わる新しいメカニズム。第 120 回日本解剖学会総会・学術集会 / 第 92 回日本生理学会大会合同学術集会 2015.3.21-3.23, 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

齊藤絵里奈、出口友則、磯貝純夫、成田大一、岡野大輔、浅野義哉、下田 浩: 小型魚類リンパ管の機能形態学的解析。第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。2014.9.27-9.28, 松本市中央公民館(長野県・松本市)

齊藤絵里奈、磯貝純夫、出口友則、成田大一、岡野大輔、浅野義哉、下田 浩: 小型魚類リンパ管の組織化学的解析。第 119 回日本解剖学会総会・学術集会 2014.3.27-29, 自治医科大学(栃木県・下野市)

齊藤絵里奈、磯貝純夫、出口友則、成田大一、浅野義哉、下田 浩: 小型魚類におけるリンパ管の発生過程と機能形態。第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2013.9.26-9.28, 航空会館(東京都)

下田 浩、齊藤絵里奈、渡邊誠二、浅野義哉、谷 利樹、岡野大輔、成田大一、外崎敬和: 小型魚類の血管・リンパ管系の構築とがん移植モデルの確立。第 97 回弘前医学会 2013.1.28, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター(青森県・弘前市)

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 浩(SHIMODA HIROSHI)
弘前大学大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20274748

(2) 研究分担者

磯貝純夫(ISOGAI SUMIO)
岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60212966

(3) 連携研究者

()

研究者番号: