

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23885

研究課題名（和文）骨髄系細胞が誘導する新規腫瘍血管形成メカニズムの解明と制御法の探索

研究課題名（英文）Elucidation of novel tumor blood vessel formation mechanism induced by myeloid cells

研究代表者

林 弓美子（Hayashi, Yumiko）

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：00844127

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍組織における血管を標的とした治療法に対する耐性機構を明らかにするため、本研究では、腫瘍血管と骨髄系細胞の動的変化に着目し、生体イメージング解析システムを構築した。このシステムを用いて、腫瘍構造の変化を生体により近い状態で経時的に観察することが可能となり、血管新生阻害剤を投与することにより成熟した腫瘍血管の局在や血管密度の変化が認められた。腫瘍組織への骨髄系細胞の集積が経時的に観察され、特に血管の形態変化が起きている近傍で認められた。さらに骨髄系細胞が分泌する因子が血管内皮細胞の動態制御に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生阻害剤に耐性を示すメカニズムを明らかにすることで、がん治療へのアプローチを再検討することができる。従来の解析方法では、経時的な観察を行っても同一個体の解析が難しいため個体差が大きく、腫瘍内で本当に起きている現象を捉えているとは言い難い。本研究で構築した腫瘍組織内の血管と骨髄系細胞の生体イメージング解析を用いた細胞間相互作用を検討することで、新たながん治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the dynamic changes of tumor blood vessels and myeloid cells to clarify the mechanism of resistance to anti angiogenic therapy. We constructed a biological imaging analysis system. Using this system, it has become possible to observe changes in tumor structure over time in a state closer to the living body. In addition, the localization of mature tumor blood vessels and changes in blood vessel density were observed by administration of angiogenesis inhibitors. Furthermore, the accumulation of myeloid cells in the tumor tissue was observed over time in the vicinity of the morphological change of blood vessels. These results suggest that myeloid cells are involved in blood vessel formation in tumors that are resistant to angiogenesis inhibitors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍血管 生体イメージング 血管新生阻害

1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管新生には VEGF (血管内皮細胞増殖因子) シグナル系が重要な役割を担っているため、これまでに多くの VEGF/VEGF 受容体系阻害剤が開発され、ヒトがん患者でも使用されている (Ferrara et al. Nat Rev Drug Discov. 2016)。担がんマウスに血管新生阻害剤を投与すると、ほとんどの腫瘍では未熟な腫瘍血管が消失して血管数が減少するが、抗腫瘍効果はほとんど認められない。この現象はヒトがん患者の治療においても共通しており、血管新生阻害剤単剤での抗腫瘍効果は認められていない。その理由として、VEGF 以外の血管新生因子の存在や、血管内皮細胞に依存しない血管の補填といった仮説が提唱されてきた (Bergers G et al. Nat Rev Cancer. 2008)。

しかしながら、これらの仮説では説明できない部分も多く、現状では血管新生阻害剤への治療抵抗性が生まれる原因は明確になっていない。腫瘍の増殖には血管が必須であるため、抗腫瘍効果が見られない理由として未知の血管形成機序が存在している可能性がある。

申請者は、予備的な検討から血管新生阻害剤の投与が腫瘍組織内での血管リモデリングを引き起こし、低酸素・低栄養領域に血管の供給が生じる可能性を見出している。このような現象が腫瘍の再増殖が誘導されているのではと仮説を立てた。さらに、血管新生阻害剤による血管リモデリングが新規骨髄系細胞である血管制御骨髄系細胞を介した現象であることを示唆するデータを得ている。

2. 研究の目的

本申請研究では、血管新生阻害剤に応答する腫瘍血管の動態を経時的に把握することにより、血管新生阻害剤に対する治療抵抗性の獲得機構を明らかにする。

これまでの腫瘍血管に関する研究は、組織切片による解析に基づいており、動的な血管構造の変化を観察したものではなかった。申請者は、多光子顕微鏡と血管イメージングマウスを用いることで、同一個体における腫瘍組織の変化を経時的に観察する実験系を確立しており、リアルタイムで腫瘍組織の全体像を捉えることができる。また、着目している血管制御骨髄系細胞は、これまでに多様性が示されているマクロファージとは異なる細胞表面マーカーを発現する新規の細胞群である。この細胞群を特異的に除去することが出来れば、新規血管リモデリングを抑制することで血管新生阻害剤の治療効果を劇的に改善できる可能性がある。そのため、この細胞群がどのような機序で新規血管リモデリングを制御しているのかを明らかにする必要がある。

この目標の達成に向けて、生体イメージングによる解析と分子レベルでの解析の両面から検討を進めた。

(1) 血管新生阻害剤による腫瘍血管の動的な構造変化と骨髄系細胞の関連性を解明

腫瘍組織内の動的な構造変化を明らかにするために、多光子顕微鏡によるマウス担癌モデルの生体イメージング解析の構築を行う。生体イメージング解析により、腫瘍血管と骨髄系細胞の相互作用に関して視覚的な変化を明示する。

(2) 腫瘍組織において血管構造変化を引き起こす関連分子の同定

予備検討より、血管制御骨髄系細胞は血管関連因子を高発現することが分かっている。そこで新規血管リモデリングを誘導する分子メカニズムにこれらの因子が関与しているかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍血管の動的な構造変化と骨髄系細胞の関連性を解明・生体イメージング系の構築

腫瘍血管の生体イメージング

腫瘍組織における血管をリアルタイムで観察するために、予備検討で用いていた実験系と同様に、マウス皮下モデルである Dorsal Skinfold Chamber (DSC) モデルを作製した。このモデルでは血管特異的蛍光イメージングマウス (apelin promoter-tdTomato BAC Tg マウス、以後血管イメージングマウス) の背側皮膚に観察窓を作成し、蛍光標識したマウス肺がん細胞のスフェロイドを移植した。また、大脳皮質に腫瘍細胞のスフェロイドを移植し観察窓を作成する Cranial Window (CW) モデルも作製した。移植 10~14 日後に二光子励起顕微鏡 (TCS SP8 MP) にて観察を行った。

また移植の方法として、腫瘍細胞のスフェロイド以外にも、蛍光標識したがん細胞を血管イメージングマウスに皮下移植し腫瘍組織を形成させた後に腫瘍を回収し、ミンス後に観察窓に移植する方法も検討した (以下、腫瘍組織再移植法とする)。

腫瘍血管と骨髄系細胞の生体イメージング

骨髄系細胞イメージングマウスをドナー、血管イメージングマウスをレシピエントとした骨髄移植を行い、イメージング用マウスを得た。さらに腫瘍を移植し、14 日後から腫瘍血管と骨髄系細胞の観察を行った。

(2) 腫瘍組織において血管構造変化を引き起こす関連分子の同定

血管制御骨髄系細胞が高発現しているいくつかの血管制御因子に関して、腫瘍組織の免疫染色を行い、発現局在や血管領域との位置関係を検討した。さらに、各リコンビナントタンパク質を血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)に添加し、経時的な変化を観察した。

生体レベルでの検討を行うために、CRISPR-Cas9 システムを用いたエレクトロポレーション法を用いて遺伝子欠損マウスの作製に着手した(Hashimoto M, et al. Dev Biol. 2016)。

4. 研究成果

(1) 生体イメージング系の構築

腫瘍血管の生体イメージング

DSC モデルによる検討では、比較的長期間にわたって腫瘍血管の変化を観察することが可能であった。移植から 10 日後から腫瘍血管を観察し、同時に血管新生阻害剤を投与することで血管新生の抑制を観察することができた。一方で、観察窓を作成する際に虚血部位が生じ、血流が乏しい個体が多く、本来の腫瘍組織内の環境を再現出来ていない可能性が考えられたため、解析を断念した。

次に CW モデルによる検討を行ったところ、スフェロイド移植から数日で腫瘍周囲や腫瘍部位からの出血が多数認められ、観察できる個体数が顕著に少なかった。そこで、この移植方法を断念し、腫瘍組織再移植法を検討した。すると、腫瘍細胞スフェロイドを移植した際とは異なり、多くの個体において腫瘍組織の生着、血管新生が生じ、解析に使用できる個体が多数得られた。一旦腫瘍組織を形成した腫瘍塊は蛍光標識した腫瘍細胞、tdTomato 陽性の血管内皮細胞やその他線維芽細胞などから構成されている。腫瘍環境下で増殖した腫瘍細胞や血管内皮細胞は組織の構造を失うことなく移植されることで、低酸素・低 pH 環境に対応して腫瘍の生着や増殖が起きていると考えられた。

腫瘍血管と骨髄系細胞の生体イメージング

上述のイメージングマウスに腫瘍組織再移植法を採用し検討を行ったところ、腫瘍血管と骨髄系細胞の観察が可能となった。移植から 14 日後のマウスに血管新生阻害剤を投与することで tip 細胞の退縮や血管数の減少、成熟した血管の出現が認められた。一方で、血管新生阻害剤の投与により骨髄系細胞の集積が顕著に認められた。さらに投与を続けると、血管リモデリングが起きている血管の周囲に骨髄系細胞の顕著な集積が認められ、この現象は血管新生阻害剤を連日投与し 5-7 日後から生じることが分かった。

(2) 腫瘍組織において血管構造変化を引き起こす関連分子の同定

予備検討より、血管制御骨髄系細胞は血管関連因子をいくつか高発現していることが分かっている。その中で、X, Y, Z 因子に着目し、各因子の腫瘍組織内局在を検討した。その結果、因子 X は血管内皮細胞と血球細胞で発現しており、因子 Y は血球細胞でのみ発現が認められ、血管新生阻害剤を投与した腫瘍でその発現が顕著であった。因子 Z は血管内皮細胞でのみ発現が認められた。さらに各因子を HUVEC に添加し、経時的な観察を行ったところ、因子 Y を添加した場合において、細胞運動能に顕著な変化が生じた。さらに、Tube formation assay にて血管形成後に各因子で刺激を行ったところ、因子 Y 刺激群において濃度依存的に血管内皮細胞集団の浸潤(Collective cell invasion)が確認された。

上記の結果から、X, Y 因子の遺伝子欠損マウスの作製に着手した。エレクトロポレーション法により、受精卵に直接 gRNA と Cas9 を導入することで両アレルに塩基の欠損が生じ、一世代で遺伝子欠損マウスを得ることが可能であるが、今回得られたマウスは全てヘテロマウスであった。そのため、ヘテロマウス同士を交配し、遺伝子欠損マウスを得た。このマウスを使用し、抗腫瘍効果の検討を行っていく予定である。

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 1件）

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 745
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林 弓美子、木戸屋 浩康、村松 史隆、塚田 陽平、高倉 伸幸
2. 発表標題 血管新生阻害剤抵抗性腫瘍における腫瘍血管の動的変化
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumiko Hayashi, Hiroyasu Kidoya, Fumitaka Muramatsu, Yohei Tsukada, Nobuyuki Takakura
2. 発表標題 Dynamic Changes of Tumor Blood Vessels in Tumors Resistant to Angiogenesis Inhibitors
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 弓美子、木戸屋 浩康、村松 史隆、高倉 伸幸
2. 発表標題 血管新生阻害剤に抵抗性を生み出す腫瘍血管動態
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

〔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
---------	---------