

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16139

研究課題名(和文)新規培養モデルを用いたがん悪液質におけるアストロサイトの活性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the activation mechanism of astrocytes under cancer cachexic condition by using a novel cell culture model

研究代表者

宇津 美秋(Uzu, Miaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：20802896

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):本研究では、コラーゲンビトリゲル膜(CVM)を介してヒト包皮由来微小血管内皮細胞(HMVEC)とヒト胎児由来アストロサイト(HA)を共培養することで、高い内皮バリア機能を有するヒト血液脳関門モデルを構築することができた。CVMまたはスライドガラス上で培養したHAの分化マーカー発現を比較すると、CVM上で培養した方が発現が高かったことから、CVMを利用した培養モデルはアストロサイトの活性評価に適していることが示唆された。また、構築したモデルにがん悪液質と関連のある炎症性サイトカインを曝露すると内皮バリア機能が低下したことから、がん悪液質において中枢神経系への物質輸送が変化していると予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体の結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維網から成るコラーゲンビトリゲル膜を培養担体として用いることにより、微小血管内皮細胞とアストロサイトのそれぞれの細胞の機能を賦活化した新規のヒト血液脳関門モデルを構築することに成功した。本モデルはがん悪液質の発症・進展に関連のある炎症性サイトカインに良好な反応を示したことから、今後本モデルを用いてがん悪液質におけるアストロサイトの役割を詳細に解析することで、アストロサイトを標的とした新規のがん悪液質治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文): In this study, a novel human blood-brain barrier (BBB) model was fabricated by coculturing human microvascular endothelial cells (HMVEC) derived from the newborn foreskin and human fetal astrocytes (HA) via a collagen vitrigel membrane (CVM). HA cultured on a CVM showed higher protein expression of differentiation markers than those cultured on a glass slide, suggesting that the cell culture model fabricated by utilizing a CVM is suitable for analyzing HA activity. It is expected that molecular permeability into the central nervous system may alter in the cachexic condition because the endothelial barrier function of the BBB model was decreased by the treatment of proinflammatory cytokines related to cancer cachexia.

研究分野：薬理学

キーワード：アストロサイト 血液脳関門 がん悪液質 培養モデル コラーゲンビトリゲル

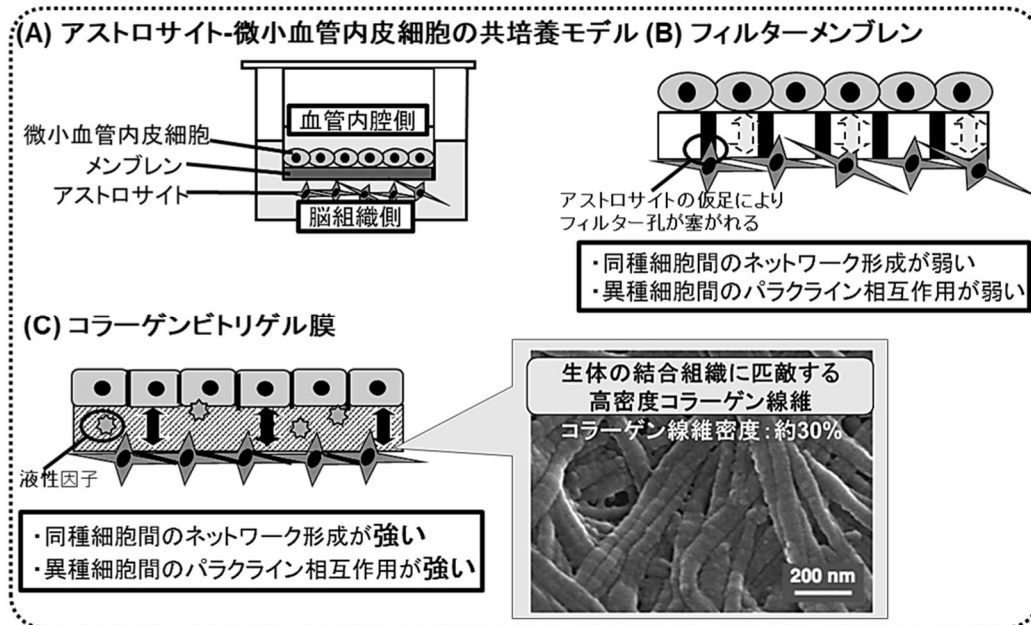
## 1. 研究開始当初の背景

がん悪液質は、がん細胞または宿主由来の炎症性サイトカインによって引き起こされる全身性の消耗病態であり、食欲不振、体重減少、脂肪・筋肉組織の消耗、全身衰弱、倦怠感を特徴とする。特に進行がん患者では約 80%に認められ、がん死因の約 20%を占めるとの報告もある (Muscaritoli et al., Eur J Cancer., 2006)。がん悪液質は患者の QOL 低下を招き、生命予後にも影響するため、その対策は喫緊の課題であるが、現在承認されている治療薬はグレリン誘導体のアナモレリンのみである。その要因のひとつに、ヒトの悪液質の診断基準を満たす動物モデルが少なく、悪液質の発症・進展メカニズムの解明が不十分であることが挙げられる。そのような背景から、研究代表者が以前に所属していた国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野では、ラットまたはマウスに 85As2 (ヒト胃がん細胞株) を皮下移植することでヒトの臨床診断基準を満たすがん悪液質モデル動物を作製した (Terawaki et al., Am J Physiol Endocrinol Metab., 2014)。研究代表者は本モデルマウスを用いて中枢神経系における変化を解析し、視床下部のアストロサイトが活性化していることを見出した (Uzu et al., J Pharmacol Sci., 2019)。アストロサイトは中枢神経系を構成するグリア細胞の一種で、ニューロンを支持する役割を担うが (Benarroch, Mayo Clin Proc., 2005)、近年ではアストロサイト自身にも中枢神経系の機能を制御する役割があることが明らかにされている。例えば、視床下部のアストロサイトが摂食促進ニューロンの機能を抑制することで摂食行動を抑制することが報告されている (Yang et al., Cell Rep., 2015)。以上より、がん悪液質における食欲不振にもアストロサイトが関与している可能性があり、この機序を詳細に明らかにすることで革新的ながん悪液質治療薬の開発につながることを期待される。

研究代表者は、ラット新生仔由来アストロサイトの単独培養系に対し 85As2 細胞の培養上清を加えることでアストロサイトの活性化マーカーの発現が上昇するか検討したが、予想に反して変化は認められなかった。この結果を受けて、がん細胞または宿主由来のサイトカインはアストロサイトに直接作用するのではなく、血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) を構成する脳微小血管内皮細胞に作用し、間接的にアストロサイトが活性化されると考えた。

本研究では、微小血管内皮細胞とアストロサイトで構成される BBB モデルを用いることとした。BBB モデルは製薬業界でもニーズが高く、様々なモデルが提案されている。しかし、中枢神経系細胞は取り扱いが難しく、特に微小血管内皮細胞は生体で観察されるような高いバリア機能を維持し続けることのできる細胞ソースがないため、汎用されるモデルはない。そこで研究代表者は、この原因が従来のモデルの培養担体にあると考え、生体の結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維から成る、コラーゲンビトリゲル膜を使用して新たな BBB モデルを構築することを考えた。

図 1 (A) に示すように、2 種類の異種細胞を共培養する場合、培養担体であるメンブレンの両面に細胞を播種して培養する方法が一般的である。従来の培養担体にはポリエチレンテレフタレートのような合成樹脂製のフィルターメンブレンが用いられているが、硬い合成樹脂上では細胞が接着・伸展し、同種細胞間でネットワークを形成するには大きな負荷がかかると予想される [図 1 (B)]。さらに、フィルターメンブレン上でアストロサイトを培養すると、アストロサイトの仮足によってフィルター孔が塞がれてしまうことが指摘されている (Sato, Nihon Yakurigaku Zasshi., 2018)。これにより、アストロサイト、微小血管内皮細胞の両者から分泌される液性因子による異種細胞間のコミュニケーション、即ちパラクライン相互作用が阻害されると考えられる。一方、コラーゲンビトリゲル膜はコラーゲン溶液と培養液から成るコラーゲンゲルを、ガラス化して自由水及び一部の結合水を除いた後に再水和することで作製できるコラーゲン線維網の薄膜であり、コラーゲン線維密度は生体の結合組織と同様に約 30%を占める (Takezawa et al., Yakugaku Zasshi., 2010) [図 1 (C)]。したがって細胞を生体内に近い環境で培養することが可能であり、実際、コラーゲンビトリゲル膜上で培養した細胞はフィルターメンブレン上で培養した場合よりも由来組織に近い機能を発揮する、物質透過性がより生体組織に近い、異種細胞同士で良好なパラクライン相互作用を示す、といった特徴が観察されている (Oshikata-Miyazaki & Takezawa, Cytotechnology., 2016、Yamaguchi & Takezawa, Drug Metab Dispos., 2018、Takezawa et al., Cells Tissues Organs., 2007)。以上より、アストロサイトと微小血管内皮細胞をコラーゲンビトリゲル膜上で共培養してサイトカイン応答性を検証することで、がん悪液質におけるアストロサイトの活性化機構の解明につながることを考えた。



【図 1】 コラーゲンビトリゲル膜チャンパーと従来のフィルターメンブレンの違い

## 2. 研究の目的

コラーゲンビトリゲル膜上にアストロサイトと微小血管内皮細胞の共培養モデルを構築し、がん悪液質におけるアストロサイトの活性化機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト微小血管内皮モデルの構築

ヒト大脳由来の微小血管内皮細胞株(hCMEC/D3)またはヒト包皮由来の微小血管内皮細胞(HMVEC)とヒト包皮由来の線維芽細胞(HDF)をコラーゲンビトリゲル膜(CVM)を介して共培養し、経内皮電気抵抗(TEER)値を指標として経時的に内皮バリア機能を評価した。構築したモデルに、代表的な内皮バリア機能低下因子であるヒスタミンを曝露させ、TEER 値およびモデル薬物(フルオレセインナトリウム: 分子量 376, FD-4: 分子量 4,000, FD-40: 分子量 40,000)の透過性の測定により内皮バリア機能変化を評価した。

### (2) ヒト BBB モデルの構築

HMVEC とヒト胎児由来アストロサイト(HA)を CVM を介して共培養し、TEER 値を指標として経時的に内皮バリア機能を評価した。また、HA を CVM 上またはスライドガラス上で 7 日間培養し、アストロサイトの分化マーカーである s100β の発現を確認した。

### (3) サイトカインの影響評価

(2)で構築したヒト BBB モデルに対し、がん悪液質の発症・進展に関連のある炎症性サイトカイン(LIF, IL-6, IL-8)をそれぞれ 10 ng/ml の濃度で 24 時間曝露し、TEER 値測定により内皮バリア機能変化を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト微小血管内皮モデルの構築

hCMEC/D3 を CVM 上で単独培養すると、TEER 値は  $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$  程度と低い値であり、HDF と共培養しても値の変化は認められなかった。一方、HMVEC の単独培養では TEER 値は約  $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$  であり、HDF と共培養すると約  $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$  まで上昇した。HMVEC と HDF から成るヒト微小血管内皮モデルに 1 nM および 1  $\mu\text{M}$  のヒスタミンを加えると、それぞれ  $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、 $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$  まで TEER 値が減少した。また、ヒスタミンを曝露して 3 種類のモデル薬物の透過性を比較すると、FD-4 の透過性のみが有意に亢進した。以上より、ヒスタミンによるヒト微小血管内皮の透過性変化には分子量選択性がある、という大変興味深い結果が得られた。これらの研究成果は原著論文として発表した(Uzu & Takezawa, J Pharmacol Toxicol Methods., 2020)。

### (2) ヒト BBB モデルの構築

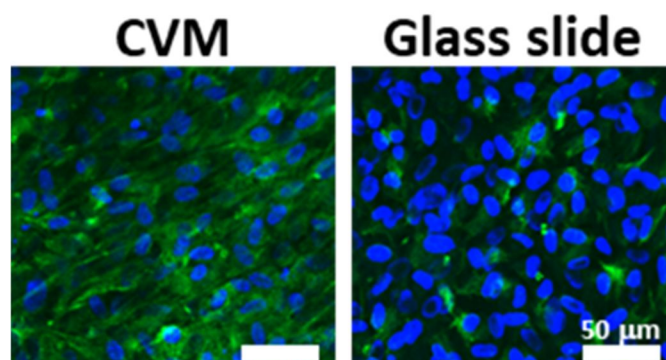
(1)の検討結果より、微小血管内皮細胞は HMVEC を使用することとし、HMVEC と HA の共培養モデルを作製したところ、TEER 値は約  $50 \Omega \cdot \text{cm}^2$  まで上昇した。また、図 2 に示すように、スライドガラス上で培養した場合に比べて CVM 上で培養した場合の方が s100β の発現が高

かったことから、CVM を利用したヒト BBB モデルはアストロサイトの活性評価に適していることが示唆された。

### (3) サイトカインの影響評価

(2)で構築したヒト BBB モデルに対し、LIF, IL-6, IL-8 をそれぞれ 10 ng/ml の濃度で 24 時間曝露すると TEER 値が減少したことから、がん悪液質では中枢神経系への物質輸送が変化している可能性が考えられた。以上(2)および(3)の検討より得られた研究成果は、現在原著論文の執筆を進めている。

以上より、本研究では構築が容易で且つ高い内皮バリア機能を示すヒト BBB モデルの開発に成功した。今後の展望として、HMVEC よりも増殖性の高いヒト微小血管内皮細胞株を樹立し、より再現性の高い BBB モデルを構築することを目指している。高い内皮バリア機能に加え、高い簡便性と再現性を有するヒト BBB モデルは世界的にみても大変ニーズが高いことから、モデルの改良に成功した際のインパクトは非常に大きいと期待される。また、がん悪液質の中枢神経系変化について細胞培養モデルを用いて詳細に解析している先行研究はほとんどないことから、改良したモデルを用いてより詳細な解析（サイトカイン曝露時の HA のシグナル伝達変化や視床下部のニューロンとの相互作用など）を進めることにより、革新的ながん悪液質の治療薬候補の探索につながることを期待される。



【図 2】 HA の s100β 発現(緑 : s100β, 青 : 核)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uzu Miaki, Takezawa Toshiaki	4. 巻 106
2. 論文標題 Novel microvascular endothelial model utilizing a collagen vitrigel membrane and its advantages for predicting histamine-induced microvascular hyperpermeability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods	6. 最初と最後の頁 106916 ~ 106916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vascn.2020.106916	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 Sato Hiromi, Shimizu Ayaka, Okawa Toya, Uzu Miaki, Goto Momoko, Hisaka Akihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Metabolome Shift in Both Metastatic Breast Cancer Cells and Astrocytes Which May Contribute to the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7430 ~ 7430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22147430	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Uzu Miaki, Takezawa Toshiaki
2. 発表標題 "Vascular Endothelial Model Constructed on a Collagen Vitrigel Membrane" Useful for Extrapolating the Histamine-Induced Vascular Hyperpermeability
3. 学会等名 World Congress on In Vitro Biology（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇津 美秋、竹澤 俊明
2. 発表標題 ヒト体内の毛細血管バリアを「変動させる因子の同定」および「透過する化合物の探索」に有用な培養モデルの提案：コラーゲンビトリゲル膜を介した血管内皮細胞と非血管内皮細胞の共培養
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uzu Miaki, Takezawa Toshiaki
2. 発表標題 Microvascular endothelial model that can predict the inflammatory responses in human microvessels with high reproducibility: Culture model of an hCMEC/D3 cell line fabricated in a collagen vitrigel membrane chamber
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇津 美秋、竹澤 俊明
2. 発表標題 コラーゲンピトリゲル膜を利用した微小血管内皮モデルの構築とその炎症病態を外挿する細胞アッセイ系としての有用性
3. 学会等名 日本組織培養学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇津 美秋、竹澤 俊明
2. 発表標題 若手薬学研究者から見たコラーゲンピトリゲル膜の魅力：非臨床試験を加速させるin vitroバリア機能薬理学の提唱
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇津 美秋、竹澤 俊明
2. 発表標題 内皮バリアを標的とした創薬に有用な培養モデルの開発：コラーゲンピトリゲル膜を介した微小血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養
3. 学会等名 第16回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------