

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14517

研究課題名（和文）血管付き人工組織によるがん転移模倣システムの開発

研究課題名（英文）Development of a Cancer Metastasis System by 3D Tissue with Blood Vessels

研究代表者

森 宣仁（Mori, Nobuhito）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：70806215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：がんは本邦における死因の27%強を占める最大の要因である。がんは腫瘍血管と呼ばれる毛細血管を誘導し、栄養を得て増殖し、周囲の組織に浸潤し、最終的には腫瘍血管を通じて他の臓器へと遠隔転移する。がんによる死亡の約90%が転移によると言われている。このため、がんの転移過程の解明と、転移過程をターゲットとした抗がん剤開発が喫緊の課題であり、転移過程の解明及び抗がん剤開発を推進するためのモデルが求められている。本研究では血管付きの3次元がん組織の開発に取り組み、血管新生、浸潤、血管外侵入等のがんの転移において重要な現象の再現に成功した。また抗がん剤やT細胞免疫療法の評価への利用可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では血管を有する人工的ながんを作製した。このシステムは、転移過程のシミュレーションなどがん研究に利用可能であるだけでなく、抗がん剤の評価にも利用可能であると期待できる。特に血管を有する特徴から近年重要性の増しているT細胞免疫療法（CAR-T等）の評価試験に適していると考えられる。このように、本研究の成果はがんの基礎研究から抗がん剤の開発まで、さまざまな応用先がある。

研究成果の概要（英文）：Cancer is the largest cause of death in Japan, accounting for more than 27% of all deaths. Cancer induces capillaries called tumor blood vessels, which grow and nourish the tumor, invade surrounding tissues, and eventually metastasize to other organs through tumor blood vessels. It is estimated that about 90% of cancer deaths are due to metastasis. Therefore, elucidation of the metastatic process of cancer and development of anticancer drugs targeting the metastatic process are urgent issues, and a model to promote elucidation of the metastatic process and development of anticancer drugs is required. In this study, we developed a three-dimensional cancer tissue with blood vessels and succeeded in reproducing important phenomena in cancer metastasis, such as angiogenesis, invasion, and extravasation. We also demonstrated the possibility of using this model for the evaluation of anticancer agents and T-cell immunotherapy.

研究分野：組織工学

キーワード：灌流 MPS 腫瘍 Organ-on-chip 腫瘍血管 がん

### 1. 研究開始当初の背景

がんは本邦における死因の 27%強を占める最大の要因である。原発巣で発生したがんは腫瘍血管と呼ばれる毛細血管を誘導し、栄養を得て増殖し、周囲の組織に浸潤し、最終的には腫瘍血管を通じて他の臓器へと遠隔転移する。がんによる死亡の約 90%が転移によると言われている。このため、がんの転移過程の解明と、転移過程をターゲットとした抗がん剤開発が喫緊の課題であり、転移過程の解明及び抗がん剤開発を推進するためのモデルが求められている。さらに、抗がん剤の薬効は個人差が大きいため、近年では患者から採取したがん検体を培養して薬剤を試験することで、臨床での治療と並行して適切な抗がん剤を選定する co-clinical trial と呼ばれる概念が提唱されている。転移過程を再現可能なモデルへの要請は、このような臨床の観点からも強くなっている。しかしながら、既存のマウスを用いた in vivo モデルではリアルタイムでのモニタリングが課題であり、特に転移において重要な血管侵入の瞬間を捉えることは難しい。また基本的に逐一、マウスを解剖し、組織切片を作ったの評価となるため、薬剤試験で多数の条件がある場合は膨大な手間がかかる。加えてヒト-マウス間の種差も課題となる。これらの理由から、イメージングや電気計測といったモニタリングが容易、かつヒト細胞からなる in vitro モデルの活用が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんの転移過程の解明や抗がん剤開発を加速するため、がんの転移過程を再現可能な 3 次元組織灌流システム「3D がん転移模倣システム」を開発し、その有用性を実証することを目的としている。なお、当初予定では転移過程の模倣に有用な電気測定系の統合を目指していたが、T 細胞免疫療法の薬効評価試験への本システムの利用可能性の探索へと目標を切り替えて推進した。この理由は、CAR-T 療法をはじめとした T 細胞免疫療法は近年重要性を増しており、現在有効な試験系が望まれているためである。本研究において開発する 3D がん転移模倣システムは腫瘍血管や血流など実際のがんに近い環境を有しているため、T 細胞免疫療法の評価試験において有用であると考えられる。

### 3. 研究の方法

3D がん転移模倣システムの構築にあたっては、これまでに研究代表者が開発した灌流デバイスを基礎とし、これをがん組織用に最適化することとした。この灌流デバイスは血管付きの 3 次元組織を構築することができ、さらに血管と外部の灌流システムとのインタフェースとして機能する(図 1)。具体的な手順としては、この灌流デバイス内部でがん細胞及び血管内皮細胞を混合したコラーゲンをゲル化させ、あらかじめ内部に埋め込んでおいたシリンジ針を抜去して形成した空洞流路に、血管内皮細胞を注入播種することで、血管付きのがん組織を構築する(図 2)。さらに構築した血管を通じて灌流培養を行うことで、毛細血管(腫瘍血管)の形成を促進することができる。本研究においてはがん細胞として 3 種の大腸がん細胞株 HT-29、SW620、DiFi を用いた。血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いた。また、T 細胞の灌流実験においては、灌流培養後 3 日後に、灌流に用いる培地に T 細胞を懸濁した。なお、T 細胞と

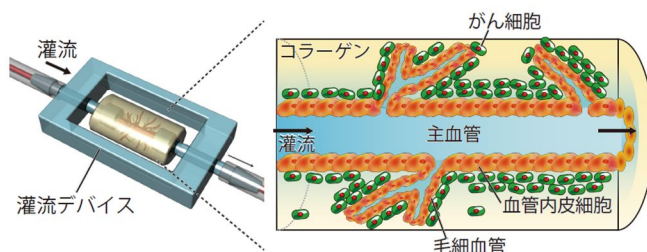


図 1. 3D がん転移模倣システム (血管付きがん組織) の模式図

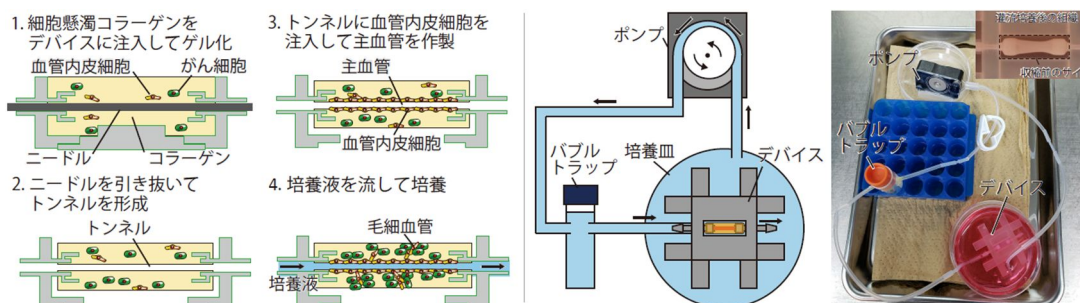


図 2. 血管付きがん組織の構築方法及び灌流システム



しては、ヒト CD8 陽性 T 細胞を拡大培養したものをを用いた。構築した組織の評価には、ホルマリン固定パラフィン包埋切片のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色や免疫染色等、通常の組織学的手法を用いた。

#### 4. 研究成果

3 に記載の方法で血管付きのがん組織を構築したところ、3 種の細胞株いずれにおいても、密ながん細胞組織が形成され、その隙間を縫うかたちで毛細血管(腫瘍血管)が形成された(図 3)。さらに、墨汁を送液したところ、中央の主血管とその周囲の毛細血管に液が灌流されることが確認できた。また、一部の毛細血管については墨汁が入らなかったことから盲端になっていると考えられ、これは実際の腫瘍と類似した構造である。また、主血管および毛細血管内部には各がん細胞が観察された。以上のことから、がん転移過程において重要な血管新生、組織浸潤および血管内侵入(intravasation)が発生したことが示された。またがん細胞の種類によって腫瘍血管の形態(密度や径)が異なり、さらに血管内で発見されるがん細胞の数も異なったことから、本システムを用いることでがんの特性に応じた転移過程の評価が可能であることが示唆された。

次に作成した血管付きがん組織を用いて抗がん剤の薬効評価試験への利用可能性を検討した(図 4)。本研究においては低分子抗がん剤である Doxorubicin を灌流液に投与し、免疫染色像からがん細胞の数と Doxorubicin 濃度の量依存性を測定した。なお、がん細胞数の計測にあたっては ImageJ を用い、がん細胞のマーカーである CK18 に陽性の細胞核の数を計数した。この結果、Doxorubicin によるがん細胞数の減少が確認された。また、Doxorubicin 添加群においては毛細血管の量が増加する現象が観察された。Doxorubicin による腫瘍血管量の増大はこれまでマウスを用いた実験でしか報告がなかった。以上のことから、本システムでは *in vitro* において抗がん剤の薬効評価が可能であるだけでなく、従来と比べて生体に近い現象の再現が可能であることが示唆された。

また、T 細胞免疫療法の試験ツールとしての利用可能性を探索するため、CD8 陽性 T 細胞を灌流した。免疫染色によって組織中の T 細胞を染色したところ、腫瘍血管内やその近傍、さらにはがん細胞の近傍に T 細胞が観察された。これは T 細胞が灌流され、さらに血管外遊走(extravasation)し、組織へ浸潤したことを示している。今後、CAR-T 細胞などを用いることで T 細胞免疫療法の評価を目指す予定である。

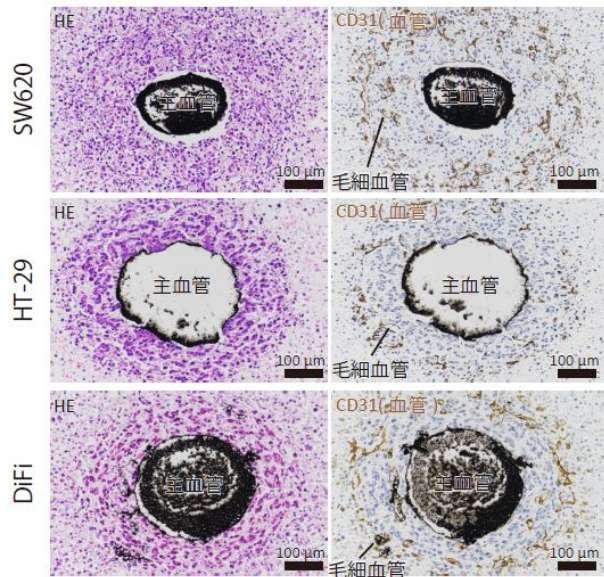
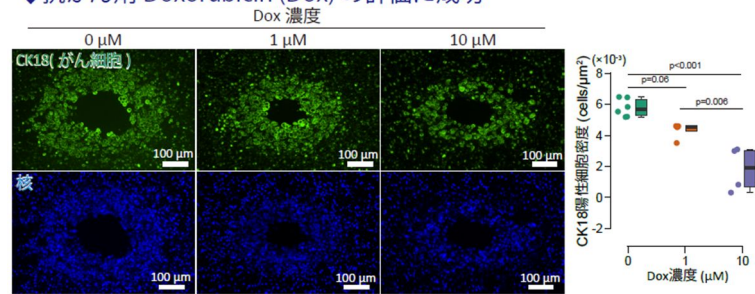
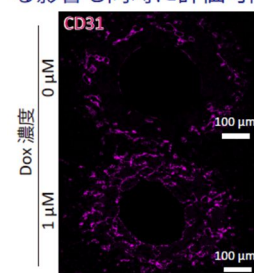


図 3. 3 種の大腸がん細胞株で作成した血管付きのがん組織(左: HE 染色、右: 免疫染色[茶色: 血管、青: 核、黒: 墨汁])

#### ◆抗がん剤 Doxorubicin (Dox) の評価に成功



#### ◆抗がん剤が血管に与える影響も同時に評価可能



#### ◆CD8+ T 細胞の灌流と浸潤の評価に成功

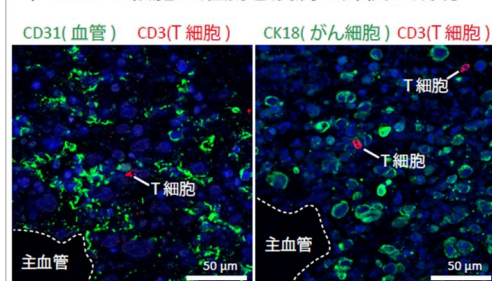


図 4. 血管付きがん組織を用いた評価試験。(上) 低分子抗がん剤 Doxorubicin の薬効評価、(左下) 抗がん剤が血管に与える影響の評価、(右下) CD8 陽性 T 細胞の灌流評価

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 Imai Yukiko, Mori Nobuhito, Nishashi Yuma, Kumagai Yutaro, Shibuya Yoichiro, Oshima Junya, Sasaki Masahiro, Sasaki Kaoru, Aihara Yukiko, Sekido Mitsuru, Kida Yasuyuki S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Therapeutic Potential of Adipose Stem Cell-Derived Conditioned Medium on Scar Contraction Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2388 ~ 2388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10102388	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森宣仁、津村遼、古賀宣勝、木田泰之
2. 発表標題 灌流可能な腫瘍血管を有する3次元腫瘍デバイスの開発
3. 学会等名 第29回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森宣仁、津村遼、古賀宣勝、木田泰之
2. 発表標題 灌流可能な腫瘍血管を有する3次元腫瘍デバイスの開発
3. 学会等名 LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森宣仁、津村遼、古賀宣勝、木田泰之
2. 発表標題 灌流血管を有する3Dがんデバイスの開発
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森宣仁
2. 発表標題 人工的に血管の付いた組織をつくる
3. 学会等名 JST新技術説明会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Singh Rinki、森宣仁、津村遼、古賀宣勝、木田泰之
2. 発表標題 灌流血管を有する3Dがんデバイスの開発
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2023
4. 発表年 2023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
---------	---------