

研究報告書  
令和3年度：A課題

2023年 5月 10日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 福井大学学術研究院医学系部門

住 所 福井県永平寺町松岡下合月23-3

研究者氏名 木戸屋 浩康

(研究課題)

癌微小環境に存在する血管被覆マトリックスの実態解明

令和4年3月10日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【研究背景・目的】

腫瘍組織内にはがん細胞のみならず、線維芽細胞や血管内皮細胞、白血球などの多様な間質細胞が多数存在している。腫瘍の増大化はこのような組織内の多様な細胞群の相互作用によって進展することが明らかになりつつあり、血管新生阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤など、間質細胞を標的とするがん治療法の開発が近年進められている。その一方で、腫瘍組織に存在する細胞外マトリックス (Extra cellular matrix : ECM) については目が向けられておらず、治療標的としての検証も進められていない。本研究では、これまで腫瘍微小環境内の単なる足場とされていた ECM の未知なる役割を解明し、それらを標的とした新規治療法の可能性を探る。がん組織における ECM は浸潤や転移に関与するという報告がされているが、最近の形態形成分野の研究からは組織間の骨格という役割を超えて様々な機能を発揮することが明らかとなりつつある。本研究では、がん微小環境における ECM のダイナミクスを可視化し、さらには腫瘍を構成する細胞間のシグナル制御への影響を時空間的に解析することで、ECM ががんの進展に与える影響の検証を進めた。

## 【実験方法・結果】

本研究では、腫瘍組織に残存する ECM を標的とした新規がん治療の可能性を探るため、「(1) がん組織内の ECM の生体内イメージング系の構築」と「(2) がん細胞増殖に ECM が及ぼす影響の解析」という2つの項目によって進めた。

### (1) がん組織内の ECM の生体内イメージング系の構築

ECM の可視化には、共同研究者の藤原裕展 (理化学研究所・チームリーダー) から提供を受けた、4型コラーゲンによって構成される ECM が蛍光標識される TypeIV collagen-GFP マウスを用いた。さらに、この ECM イメージングマウスと我々が作成した血管イメージングマウス (apelin-tdTomato BAC Tg) を掛け合わせることで、ECM と腫瘍血管を同時に生体内で可視化できるマウスを作成した。このイメージングマウス的大脑表層部に GL261 神経膠腫細胞 (iRFP にて蛍光標識) を移植し、多光子励起顕微鏡下での観察を行うことで、生体内にて腫瘍血管と ECM の動態を観察することが可能なイメージング系を構築した。さらに、長時間にわたる経時的な撮影を可能とするため、腫瘍の移植時期や適切な撮影のタイミング、マウスの保持方法などを検証し、24 時間以上にわたる ECM の生体内イメージングが可能となった。撮影された動画について、画像解析ソフト Volocity にて ECM の空間情報とがん細胞の増殖、腫瘍血管の形成について数値化して定量解析を進めているが、有意な関連性を示す結果が得られつつある。また、腫瘍細胞移植の7日後に抗がん剤を投与し、ECM を間歇的に長期間観察することで、がん微小環境変化に伴う ECM のダイナミクスに解析を進めている。

### (2) ECM によるがん細胞のシグナル制御の実態解明

生体内イメージング解析で確認された、がん細胞の増殖変化に ECM が及ぼす影響について詳細に検討するため、組織切片の作成による解析を進めた。項目 (1) にて作成した ECM・血管イメージングマウス (TypeIV collagen-GFP : apelin-tdTomato BAC Tg マウス) の大脑表層部に GL261 神経膠腫細胞を移植して移植から2週間後に脳組織を回収し、200  $\mu$ m 厚のスライスを作成した。このスライスにて透明化処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行ったところ、ECM の近傍で血管構造が変化してがん細胞の増殖が促進されている様子が確認できている。現在は各種マーカーを用いた免疫染色を行うことで、がん細胞にて起きているシグナルの変化について解析を進めている。

### 【考察・展望】

これまでのがん研究は、回収した腫瘍組織と培養がん細胞を用いた実験により進められてきた。しかしながら、回収して固定された腫瘍組織には活きた生物学的特性が失われており、培養がん細胞には組織微小環境が存在しないという欠点がある。実際のがん組織の病態進展においては微小環境の多様な細胞群の連続的な相互作用が重要であり、特に状況に応じて変化を示す ECM との相互作用を解析するためには、活きた腫瘍組織を時空間的に解析することが必須となる。本研究では、これまで見過ごされてきた基底膜分子の生体内における時空間な動態変化を世界で初めて可視化することで、がんの進展における ECM の重要性に迫った。生体内イメージング解析の結果、がん微小環境の ECM は想定されていた以上にダイナミックに変動しており、がんの進展に大きな影響を与えている可能性が示されつつある。今後、ECM ががんの進展・悪性化に及ぼす分子メカニズムを詳細に解明することで、従来の細胞を対象とした創薬の限界を超えた新世代のがん治療薬の開発が期待される。

### 【論文発表】

Inukai K, Kise K, Hayashi Y, Jia W, Muramatsu F, Okamoto N, Konishi H, Akuta K, Kidoya H, Takakura N. Cancer apelin receptor suppresses vascular mimicry in malignant melanoma. *Pathol Oncol Res.* 29:1610867. 2023.

Takara K, Hayashi-Okada Y, Kidoya H. Neurovascular Interactions in the Development of the Vasculature. *Life (Basel).* 13:42. 2022.

Morita M, Yoneda A, Tokunoh N, Masaki T, Shirakura K, Kinoshita M, Hashimoto R, Shigesada N, Takahashi J, Tachibana M, Tanaka S, Obana M, Hino N, Ikawa M, Tsujikawa K, Ono C, Matsuura Y, Kidoya H, Takakura N, Kubota Y, Doi T, Takayama K, Yoshioka Y, Fujio Y, Okada Y. Upregulation of Robo4 expression by SMAD signaling suppresses vascular permeability and mortality in endotoxemia and COVID-19 models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 120:e2213317120. 2023.

Re Cecconi AD, Barone M, Forti M, Lunardi M, Cagnotto A, Salmona M, Olivari D, Zentilin L, Resovi A, Persichitti P, Belotti D, Palo F, Takakura N, Kidoya H, Piccirillo R. Apelin Resistance Contributes to Muscle Loss during Cancer Cachexia in Mice. *Cancers (Basel).* 14:1814. 2022.

Sawane M, Ogura Y, Nakamura A, Otaka H, Kidoya H, Sato K, Takakura N, Kajiya K. Blood vessels sense dermal stiffness via a novel mechanotransducer, APJ. *Angiogenesis.* 2:151-154. 2022.

### 【謝辞】

本研究は、公益財団法人がん研究振興財団からの助成を賜りましたことで大きく進展させることができました。研究へのご理解とご協力に厚く感謝申し上げます。なお、本研究成果は現在投稿準備中です。