

胞巣状軟部肉腫のオンチップモデルにより血管新生メカニズムを明らかに ～Microphysiological systems (MPS)を活用した血管新生標的分子の評価～

概要

京都大学大学院工学研究科横川隆司教授、S. Chuaychob 特定研究員（現：京大エネルギー理工学研究
所特定助教）らの研究グループは、東京医科大学医学総合研究所未来医療研究センター実験病理学部門
の中村卓郎特任教授、公益財団法人がん研究協会がん研究所がんエピゲノムプロジェクト田中美和主任研
究員らとの共同研究で、胞巣状軟部肉腫（alveolar soft part sarcoma, ASPS）を模倣した ASPS-on-a-
Chip を開発し、腫瘍形成時に血管新生を誘導する血管新生因子が輸送される仕組みを生体外で再現する
ことに成功しました。

ASPS は希少がんである軟部肉腫の一つで、AYA 世代（思春期・若年成人）に好発します。腫瘍の増殖
は緩やかですが、血管形成が盛んなことから全身に転移する傾向が強く、予後不良な疾患です。ASPS の
標的遺伝子には血管形成因子自体と、それらを運ぶ細胞内輸送促進因子が含まれ、ASPS における独特な
血管構造の原因となっていることがわかっています（M. Tanaka *et al.*, *Nat Commun*, 2023）。

今回、腫瘍細胞、周皮細胞、および血管内皮細胞からなる共培養系により、血管が豊富な ASPS-on-a-
Chip を作製して腫瘍微小環境を模倣しました。これにより、機能的および形態的に生体内の ASPS を模
倣し血管網の透過性が上昇すること、および細胞内輸送促進因子である Rab27a と Sytl2 が血管新生を誘
導することを実証しました。今後、輸送促進因子機能を抑える全く新しい治療方法の開発にもつながる
成果と期待されます。

本研究成果は 2024 年 3 月 22 日（米国東部時間）に国際学術誌「*Proceedings of the National Academy
of Sciences (PNAS)*」（米国科学アカデミー紀要）のオンライン版に掲載されました。

【本研究のポイント】

- ◆ 生 体 模 倣 シ ス テ ム
（ Microphysiological
systems (MPS)）内に、ASPS
腫瘍細胞からの血管新生因子
により血管内皮細胞と周皮細胞
からなる、血管が豊富な腫
瘍微小環境である ASPS-on-
a-Chip を開発した。
- ◆ ASPS の 原 因 融 合 遺 伝 子
ASPSCR1-TFE3 (AT3)の存在
により血管新生がより誘導さ

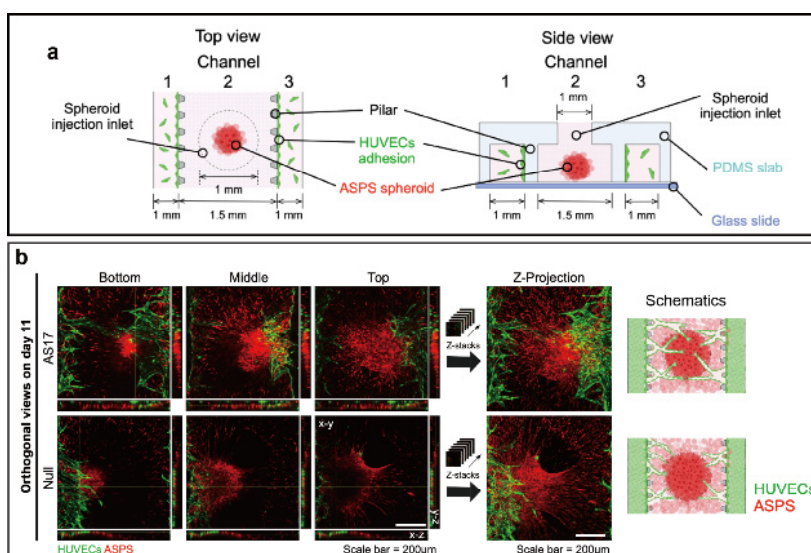


図1:a) 生体模倣システム (Microphysiological systems (MPS)) の概要、ASPSスフェロイドと血管内皮細胞の共培養イメージ図。b) 原因融合遺伝子AT3を有するスフェロイド (AS17) が、より血管新生を誘導することがわかる。

れ血管領域が拡大すること、腫瘍に血管が貫入すること、血管壁の透過性が高くなることが明らかとなり、腫瘍における血管の機能が健常状態とは異なることがわかった。

- ◆ 細胞内輸送促進因子 Rab27a と Sytl2 をノックアウトすることで血管新生が抑制されること、またそれらが輸送する血管新生因子 Pdgfb と Gpnmb がマウスモデルと同様に ASPS-on-a-Chip において高く発現することで血管新生が促進されることがわかった。

1. 背景

腫瘍微小環境においては、低栄養、低酸素などの腫瘍が血管新生により既存の血管から新たな血管を誘導し、その新生血管を経て養分や酸素を受けとり腫瘍細胞が増殖するだけでなく転移や浸潤を引き起こします。ASPS は AYA 世代の大腿や臀部、上腕といった深部の軟部組織に発生する悪性の肉腫で、ゆっくりとした発育態度を示します。その一方で、胞巣状構造と呼ばれる腫瘍細胞と周皮細胞に富む血管組織が一体化した病巣を形成するため、比較的早期から高頻度で肺などへの転移を示します。原因融合遺伝子 AT3 が血管形成に関わる Rab27a、Sytl2、Pdgfb、Vwf などの遺伝子を制御していることが明らかになっています (M. Tanaka *et al.*, *Nat Commun*, 2023)。しかし、これらの因子がどのように血管内皮細胞と周皮細胞を介して血管形成を促進しているのかは理解できておらず、複数の因子を個別に解析することは動物モデルでは困難でした。

一方、MPS を用いると腫瘍微小環境を構成する複数の細胞を制御性良く配置したり、それらが産生する腫瘍形成や血管新生に関わる因子を定量的に評価したりすることが可能になってきました。我々は、乳ガンのスフェロイドに対する血管新生を再現したり、ヒト iPS 細胞から作製した脳オルガノイドへの血管新生因子を特定したりする技術を報告してきました。

そこで、本研究では MPS 内に ASPS 細胞を配置し、血管新生と周皮細胞が同時に血管網を形成する ASPS-on-a-Chip を開発しました。これによって、ASPS の腫瘍微小環境が血管新生因子やそれを運ぶ細胞内輸送促進因子によってどのように形成されるか、形成された環境が生体内を反映したモデルになっているのかを検証することに挑戦しました。

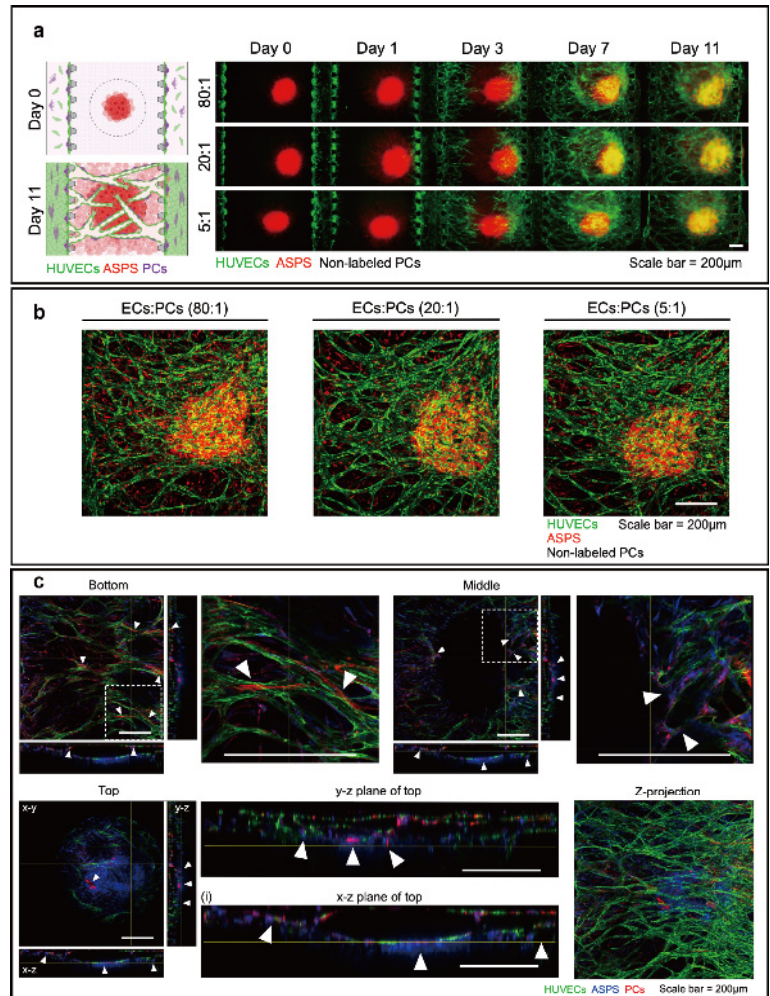


図2: a) 周皮細胞(PC)を導入した際に、周皮細胞の割合が増えるに従って血管網の面積が増大し、腫瘍内部にも侵入する。b) 11日間培養後の拡大図。c) スフェロイドの下部、中央、上部のいずれにおいても、血管内皮細胞(緑)が構成する血管網の周りに周皮細胞(赤)が取り巻き、腫瘍微小環境を模倣した細胞配置になっている。

2. 研究手法・成果

本研究では、中央に ASPS 細胞からなるスフェロイドを配置する流路、左右に血管内皮細胞と周皮細胞を導入する流路からなる 3 流路のマイクロ流体デバイスを開発しました (図 1a)。スフェロイドや各種細胞の寸法に合わせて、デバイス各部の寸法を最適化しました。これを用いて、まず原因融合遺伝子 AT3 を有する細胞およびその発現を失った細胞からなるスフェロイドを用いて、血管内皮細胞のみに対する血管新生誘導能を評価しました。周皮細胞がなくても、内皮細胞の血管新生は惹起されること、またそれが AT3 の存在により亢進されることが明らかになりました (図 1b)。

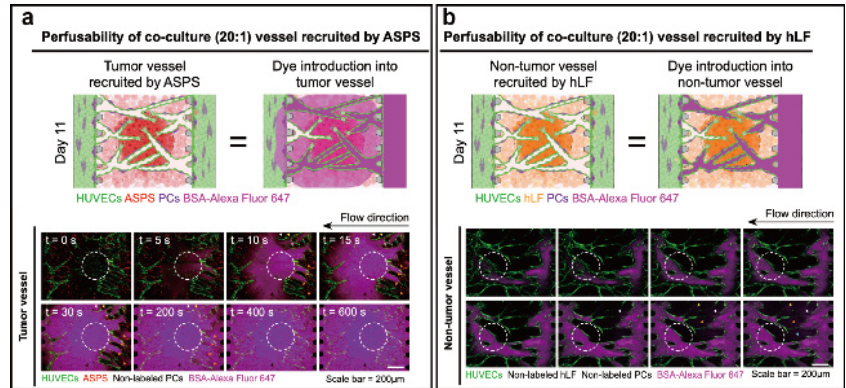


図3: a) ASPSスフェロイドを用いた腫瘍微小環境では血管網は透過性が上昇した。b) 肺線維芽細胞(hLF)からなるスフェロイドを用いた場合は、透過性の低い血管網が構成され、蛍光色素が血管腔内を流れる様子がみられた。

さらに、腫瘍微小環境において重要な周皮細胞を導入したところ、内皮細胞に対する周皮細胞の割合が増加するに従って血管網の面積が増大し、腫瘍内部にも侵入することがわかりました (図 2a,b)。このとき血管網を内皮細胞が取り巻く細胞配置になっており、生体内の環境を模倣していることが示されました。さらに、原因融合遺伝子 AT3 の存在により周皮細胞存在下での血管網の専有面積やスフェロイドへの侵入が亢進しており、三種類の細胞を共培養することによってより生体内の ASPS 腫瘍微小環境を模倣できることがわかりました (図 2c)。腫瘍微小環境では血管壁の透過性が上昇することが知られており、ASPS-on-a-Chip においても蛍光色素の漏出が多いことから透過性の上昇が示されました (図 3)。

確立した ASPS-on-a-Chip を用いて、血管新生因子を輸送する Rab27a あるいは Sytl2 をノックアウトした腫瘍細胞による血管新生を評価したところ、血管新生が有意に抑制されていることがわかりました (図 4a)。よって、これらが輸送する Pdgfb および Gpnmb が血管内皮細胞や周皮細胞に届かなかったため血管新生が起これにくかったと考えられます (図 4b)。そこで、ASPS-on-a-Chip における Pdgfb および Gpnmb の発現を確認したところ、三種類の細胞を共培養したときに最も発現量が高くなることがわかり、これはマウスモデルの腫瘍におけるそれらの発現と同等であることが示されました (図 4c-e)。

3. 波及効果、今後の予定

ASPS のように患者数の少ない希少がんは、その発生機序を理解したり薬剤開発に用いたりするモデルが少ないのが現状です。本研究では、新たな ASPS-on-a-Chip の開発により複雑な腫瘍微小環境を三種類の細胞で再現し、血管が豊富な環境において働く重要な分子輸送機能を個別に評価することを可能にしました。これにより、血管新生因子とそれを輸送する因子が協調して血管内皮細胞と周皮細胞からなる血管網を誘導していることを明らかにしました。今後は、ASPS-on-a-Chip を用いて各因子の機能をさらに明らかにすると共に、血管新生因子の輸送を阻害する薬剤開発などを通して社会に貢献していくことが期待されます。

4. 資料提供

本研究成果に関連する画像や動画資料は下記 URL よりご利用いただけます。報道で利用される場合、

提供元は「横川隆司 京都大学工学研究科教授」と明記するようお願いいたします。

5. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）次世代がん医療創生研究事業（17cm0106609（中村卓郎）、20cm0106277（中村卓郎、横川隆司）、次世代がん医療加速化研究事業（22ama221206h001（田中美和、横川隆司））、日本医療研究開発機構創薬基盤推進研究事業（21ak0101170（中村卓郎））、MPS プロジェクト（JP22be1004204, JP17be0304205）、文部科学省「マテリアル先端リサーチインフラ」事業（JPMX1222KT1172）の支援を受けました。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Mimicking Angiogenic Microenvironment of Alveolar Soft Part Sarcoma in a Microfluidic Co-Culture Vasculature Chip

著者：Surachada Chuaychob、Ruyin Lyu、田中美和、萩庭歩美、北田敦也、中村卓郎、横川隆司*

掲載誌：Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) DOI：10.1073/pnas.2312472121

* 責任著者

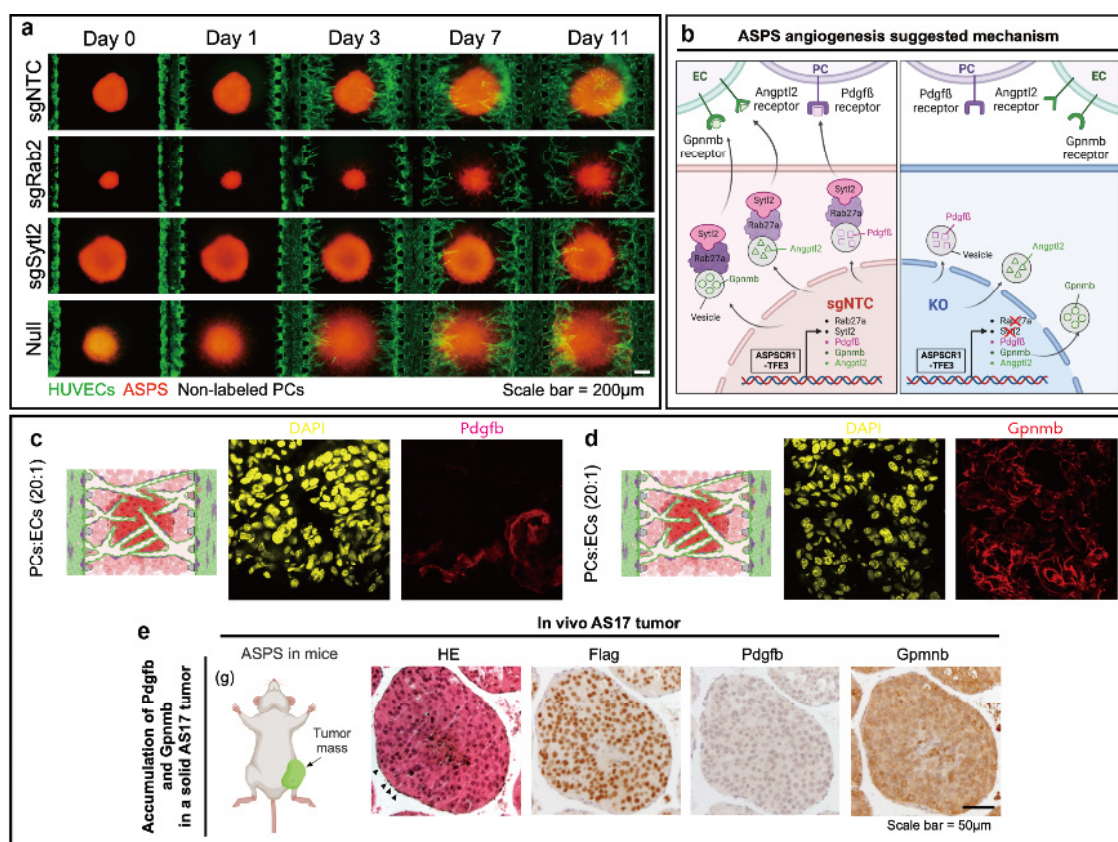


図4：a) 細胞内輸送促進因子Rab27aあるいはSyt2をノックアウトしたASPSスフェロイドでは、血管新生が抑制された。b) Rab27aおよびSyt2が輸送するPdgfbおよびGpnmbが血管内皮細胞や周皮細胞に輸送されず、血管新生が起こりにくかったと考えられる。オンチップでのc) Pdgfb, d) Gpnmbの発現は、e) マウスの腫瘍におけるそれを良く模倣していた。

<用語解説>

注：マイクロ流体デバイス（チップ）は、半導体微細加工技術を用いて流路をガラスや樹脂基板上に作製したものである。臓器細胞を培養して生体内に近い環境を創成したチップは、Microphysiological systems (MPS)あるいは生体模倣システムと呼ばれる。今回の研究では、肉腫・周皮細胞・血管内皮の3種類の細胞を用いて ASPS の血管形成を再現させた。