

## 研究題目 血管の構造変化を制御する新規ミエロイド系細胞の解析

### 研究組織

研究代表者：木戸屋 浩康（福井大学学術研究院医学系部門）

共同研究者：竹本 龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：高岡 勝吉（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

がんの増殖には血管を介した酸素や栄養分の供給が必須であることから、腫瘍血管を標的とした「兵糧攻め」のコンセプトによるがん治療法の開発が進められてきた。特に、腫瘍組織中の血管形成機構として知られている血管新生(angiogenesis)の阻害に向けて、血管新生を誘導する VEGF シグナルを阻害する薬剤が数多く開発されている。現在ではこれらの血管新生阻害剤は臨床にて用いられているが、単独使用では抗腫瘍効果が少なく、期待されていたような劇的な治療効果は示されていない(Nat Rev Clin Oncol. 2009)。その理由として、VEGF 以外の代替的シグナルや、ストローマ細胞による作用、主要組織の代謝適応など様々な説が提唱されているが、治療抵抗性の実体は明らかになっていない(Pinto MP, et al. Int J Mol Sci. 2016)。

我々は腫瘍血管抑制剤に対する治療抵抗性の獲得機構を明らかにするため、様々な癌種の細胞株にて担癌マウスモデルを作成し、血管新生阻害剤による治療効果や、腫瘍組織中の血管の変化を解析した。その結果から導き出されたのは、血管新生阻害剤に対して治療抵抗性を示す腫瘍であっても、血管数が減少しているという事実であった。つまり、「血管が減少するにも関わらず、腫瘍が増大している」という、定説に当てはまらない状況が起きていると考えられる。そこで、本研究では生体イメージング解析系を用いることで血管新生阻害剤の投与に応じて腫瘍組織内にどのような変化が生じるかを解析した。

#### [1-2] 研究の方法・経過

血管イメージングマウス(Apelin-tdTomato

BAC Tg マウス)にて担癌モデルを作成し、二光子励起顕微鏡を用いて生体イメージング解析を進めたところ、血管新生阻害剤の投与に応じて血管構造が大きく変化する様子が確認された。この血管構造変化が血管新生阻害剤に対する治療抵抗性に関与していると考え、そのメカニズムの解析を進めた。腫瘍組織を構成する細胞の変化をフローサイトメトリーや組織学的解析によって進めたところ、ミエロイド系細胞サブセットに変化が生じることを見いだした。そこでこの細胞に注目して、シングルセルトランスクリプトーム解析を行ったところ、この細胞に特徴的に発現する遺伝子群を同定することができた。そこで、これらの遺伝子を欠損するマウスや、蛍光タンパク遺伝子のノックインによるイメージングマウスの作成を、徳島大学先端酵素学研究所の竹本教授および高岡准教授から支援を受けることで進めた。

### 【2】研究成果

#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

共同研究にて作成した遺伝子欠損マウスにて各種がん細胞を移植し、生着後に血管新生阻害時(VEGF 阻害剤)を投与して応答性を検討した。その結果、野生型マウスと比較して遺伝子欠損マウスでは腫瘍サイズの増加が抑制されていた。さらに、移植から 20 日後に腫瘍組織を回収して重量を測定したところ、野生型マウスに血管新生阻害剤を投与した群や、投与無しの遺伝子欠損マウスでは腫瘍重量には大きな差が認められなかったが、遺伝子欠損マウスに血管新生阻害剤を投与すると顕著な重量減少が確認できた。現在は、この抗腫瘍効果が血管構造の変化が抑制された結果であるかを、組織学的解析と生体内イメージング解析にて検討

している。

加えて、作成したミエロイド系細胞イメージングマウスを用いた生体内イメージング解析を進めた。まず、ミエロイド系細胞イメージングマウスと血管イメージングマウスを交配し、血管とミエロイド系細胞を同時に可視化できるマウスを作成した。このマウスにて担癌モデルを作成し、血管新生阻害剤を投与して生体内イメージング系にて観察した。その結果、血管新生の詐害に応じてミエロイド系細胞が腫瘍組織中心部に動員され、周囲の血管の構造変化が引き起こされている様子を観察することができた。この動画データを用いて、ミエロイド系細胞と構造変化する血管の距離を動画解析ソフトにて測定して統計的に解析したところ有意な関連性を示すことを確認できた。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

腫瘍血管は既存血管からの発芽を起点とする「血管新生」によって形作られていくと信じられてきた。このような概念は組織学的解析によるスナップショットによって導かれたものである。しかしながら、本研究にて行われた生体内イメージング解析の結果から、腫瘍中の血管は想像以上に大きな挙動を示していることが明らかになった。これらの結果は、腫瘍血管の形成過程が想定されていたモデルのように単純ではないことを示唆しており、新たな視点からの腫瘍血管へのアプローチの必要性を示している。

本研究では、腫瘍血管に対して血管新生を中心とした概念から脱却して独自の観点から取り組んだ。注目したのは腫瘍血管そのものではなく、これまで注目されていなかったミエロイド系細胞である。本共同研究によって、この新規ミエロイド系細胞がどのようにして腫瘍血管に作用しているか、さらには腫瘍組織内でどのような動態を示すかの一端が明らかとなった。本研究の成果は、血管新生阻害剤に対する治療抵抗性獲得機構の解明に繋がり、既存の腫瘍血管抑制剤の課題を克服した新概念に基づく治療法の開発に繋がると期待できる。

### 【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1) 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.

2) Takara K, Hayashi-Okada Y, Kidoya H. Neurovascular Interactions in the Development of the Vasculature. *Life (Basel)*. 13(1):42. 2022.

3) 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(3):e2213317120. 2023.

4) Re Cecconi AD, Barone M, Forti M, Lunardi M, Cagnotto A, Salmons M, Olivari D, Zentilin L, Resovi A, Persichetti 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(7):1814. 2022.

5) 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.

[3-2] 学会発表

1) 木戸屋 浩康. 間的生体内イメージング解析が示す真の腫瘍血管形成過程. 第 8 回 がん代謝研究会. あいぼーと佐渡. 7月 20 日, 2022 年

2) 木戸屋 浩康. 造血系の正常と異常を制御するアンジオクリンシステム. 第 44 回日本分子生物学会年会. 幕張メッセ. 12月 2 日, 2022 年

3) 木戸屋 浩康. アンジオクリンシステムによる正常と異常の制御. 第 6 回 Neuro-Vascular 研究会. まつや千千. 2月 20-21 日, 2023 年

### 【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究の成果から、血管新生阻害剤への治療抵抗性が創出される原理として、新規ミエロイド系細胞の関与が示された。今後、さらなる分子・細胞機構の解明を進めることで、腫瘍血管を標的としたがん治療法の確立を目指したい。