



Title	A Four-Dimensional Organoid System to Visualize Cancer Cell Vascular Invasion
Author(s)	柳澤, 公紀
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85264
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	柳澤 公紀
論文題名 Title	A Four-Dimensional Organoid System to Visualize Cancer Cell Vascular Invasion (癌血管浸潤の四次元的評価を可能にした血管オルガノイドモデルの構築)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 大腸癌患者は我が国において年間15万人の罹患患者及び5万人の死亡者であり、がん患者において最も罹患数の多い癌腫である。手術・化学療法・放射線治療の進歩により、治療成績は向上しつつあるが、StageIVにおいては5年生存率20%と依然として予後不良であり、転移・再発に対する治療の進歩が求められている。しかしこれまでの研究では二次元培養をしたがん細胞を用いた研究が主であり、in vitro での転移・再発に関する研究を行うことは困難であった。また近年では、マイクロ流体デバイスによる血管モデルを応用した血管浸潤モデルの作成が報告されている。しかし、デバイスの特殊性が高く、容易に再現できる実験系とは言い難かった。これら問題点を解決するために三次元培養法の開発を目指した。三次元培養は細胞間相互作用が維持されるため、単層培養より生体に近似した環境での培養が可能となり生命現象を明らかにする上で有用なツールとなると考えられている。三次元培養では細胞接着が安定化するための足場(scaffold)・細胞外マトリックス(Extra Cellular Matrix: ECM)が必要であることが知られている。我々は、ECMとしてのコラーゲンマイクロファイバー、および間質細胞としてヒト皮膚線維芽細胞(Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF)を用いた三次元培養法の開発を目指した。 本研究の目的は、大腸癌の血管浸潤現象を人工的に再現し、サンプルを評価することで浸潤転機機構を明らかにすると共に、これらの複雑な現象を比較的簡便に評価できる実験系を確立することである。また、癌の浸潤や転移に寄与するとされるエクソソームがどういった機序で大腸癌の血管浸潤に関与するのか、三次元血管オルガノイド培養を利用し検証した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 フィブリノーゲン・スロンビンによるゲル体にECMを含有させ、その中でGFP陽性ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)とNHDFとの共培養を行った。その結果、培養下サンプルを共焦点蛍光顕微鏡にて直接観察可能であり、経時的に観察することでゲル内に血管ネットワークが構築されることを確認した。さらに本サンプルを薄切し、CD31による免疫染色により組織学的評価を行なったところ、血管内皮細胞による内腔の形成が確認された。この血管オルガノイド培養を利用し、蛍光標識した大腸癌細胞株(HT29-RFP)と血管内皮細胞(HUVEC-GFP)との共培養により、大腸癌細胞が内皮細胞のシグナル内に含まれる像を確認した。画像解析ソフトImarisを用いて三次元的位置関係を評価すると、大腸癌細胞が血管組織内部に含まれることが確認された。経時的に培養下サンプルを蛍光共焦点顕微鏡にて強拡大観察を行うことで、大腸癌細胞の増殖・血管壁への接着・血管内部へ浸潤・細胞の分離・遊走という一連の細胞動態をタイムラプスにて記録することに成功した。 次に、血管浸潤における癌細胞由来エクソソームの関連を評価した。大腸癌細胞株KM12SMの培養上澄みを回収・精製した後、超遠心法にてエクソソームの回収を行った。回収したエクソソームはナノサイトにて小胞径を評価した。PKH67によりラベル化したエクソソームをHUVECへ曝露することで、内皮細胞内にエクソソームが取り込まれることを確認した。大腸癌細胞株由来エクソソームをHUVECに曝露させ(Exo-HUVEC)、前述の血管浸潤アッセイを施行し、浸潤した癌細胞の蛍光シグナルを体積にて評価比較すると、Exo-HUVEC群にて大腸癌細胞株の浸潤が増加し、癌由来エクソソームが血管浸潤を促進している可能性が示唆された。このメカニズム解析のためにExo-HUVECを用いて血管オルガノイドを作製し、タイトジャンクション関連タンパク質(p120, VE-cadherin)の蛍光免疫染色を行ったところ、Exo-HUVEC群においてこれらの因子の発現低下が確認された。 〔総 括(Conclusion)〕 ゲルを利用した血管オルガノイド培養を応用し、癌血管浸潤モデルを構築し、細胞動態の四次元的評価を可能とした。また、血管内皮細胞が大腸癌由来エクソソームに曝露されることにより、血管透過性が亢進し、癌血管浸潤が促進されることが示唆された。本培養手法は、癌の進展における血管浸潤の細胞動態を模倣する組織モデルであり、今後の新規抗腫瘍薬の血管浸潤抑制効果の評価を可能とする手法の一つとして有用な技術となり得ると考えられる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 柳澤 公紀				
論文審査担当者		(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	土岐 祐一郎	男 60
	副 査	大阪大学教授	蘭 池 章	男 66
	副 査	大阪大学教授	小川 和彦	男 66

論文審査の結果の要旨

本研究は血管オルガノイド技術を利用した4次元的评价を可能とする癌血管浸潤モデルの構築し、癌血管浸潤における腫瘍由来エクソソーム (Exo) の微小環境に対する影響を検証することを目的とした。

コラーゲン含有フィブリンゲル内で血管内皮・線維芽細胞を培養し、ネットワーク・管腔を有する血管オルガノイドの作成が可能となった。さらに癌細胞を共培養する事で血管浸潤が確認され、共焦点蛍光顕微鏡による時系列観察により血管浸潤細胞動態の4次元的评价が可能であった。癌由来Exoは癌浸潤を促進するという報告があり、次に大腸癌細胞株由来Exoを曝露した血管内皮にて血管オルガノイドを作成すると、癌細胞の浸潤現象の増強が確認された。この癌浸潤のメカニズムを検討するために血管内皮細胞接着因子VEカドヘリン・p120の発現評価し、これらの発現低下が確認され、血管透過性を亢進することで癌細胞の血管浸潤が促進されることが示唆された。

本培養手法は、癌の進展における血管浸潤の細胞動態を模倣する組織モデルであり、今後の新規抗腫瘍薬の血管浸潤抑制効果の評価を可能とする手法の一つとして有用な技術となり得ると考えられる。

したがって、著者は博士 (医学) の学位授与に値する。