



胞巣状軟部肉腫のオンチップモデルを用いた、血管新生標的分子の評価

胞巣状軟部肉腫（Alveolar soft part sarcoma, ASPS）は血管やペリサイトを豊富に含む特殊な環境を形成し、全身に転移する予後不良な疾患である。従来の化学療法に対して耐性がある疾患であり、新たな治療法開発にはASPSの血管新生のメカニズムの解明が重要である。これまでの研究で、ASPSの原因遺伝子が細胞内輸送促進因子を制御し、特殊な血管構造を形成していることが分かってきた（M. Tanaka *et al.*, *Nat Commun*, 2023）。本研究ではASPSスフェロイドと血管内皮細胞、ペリサイトを共培養する生体模倣システム（Microphysiological system, MPS）を開発し、ASPSによる血管新生を再現した。これにより、ASPSによって血管網の透過性が上昇すること、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た。

実験概要

MPSチップはPDMS製であり、スフェロイドを配置する流路、左右に血管内皮細胞とペリサイトを導入する流路、計3流路を有する（図1a）。DsRedを発現させたASPS細胞を低接着性U底ウェルに導入し、1日培養することでスフェロイドを作製した。フィブリンとコラーゲンで構成されたゲルと共にASPSスフェロイドを中央の流路に導入し、左右の流路には培地を導入した。その翌日、血管内皮細胞とペリサイトを20 : 1の割合で混合し、左右の流路に導入、ゲルの界面に接着させた。その後、毎日培地交換をおこない、血管新生の様子を観察した。取得した蛍光画像から、中央流路の全面積における血管が占める割合（= Sprout coverage area）と、スフェロイド領域に対して血管が侵入した面積の割合（= Invasion area）の2つの指標を測定し、各条件での血管新生を比較した。

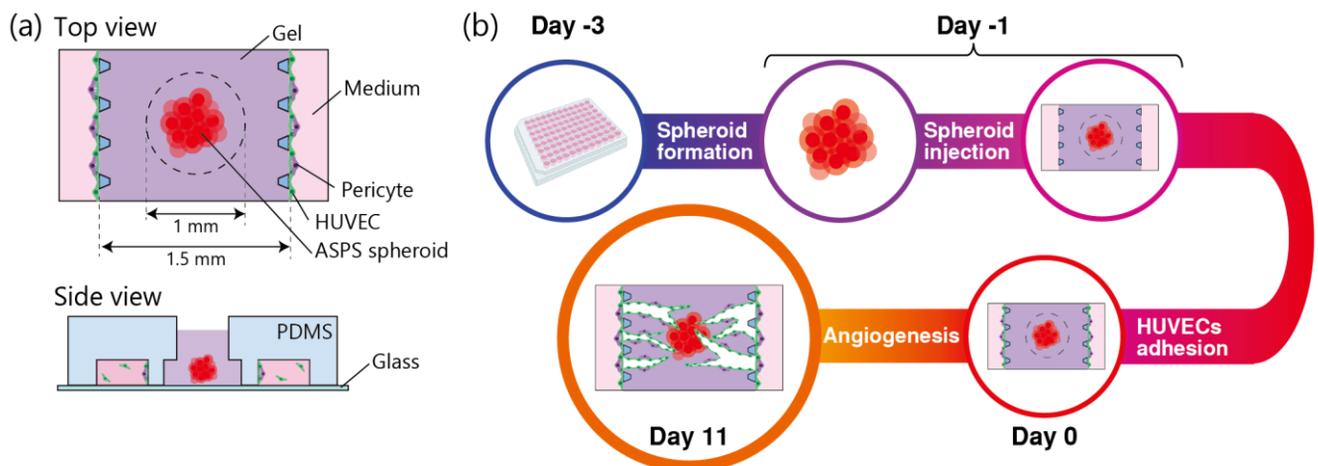


図1 ASPSスフェロイド用いたMPSモデルの概要

- 使用したMPSチップの概要。
- ASPSモデルの構築に向けた手順。血管内皮細胞には臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。

原因遺伝子の発現の有無による血管新生の違い

ASPS細胞と複数継代により原因遺伝子の発現を失ったNull細胞を用い、血管新生を比較した。ASPS細胞の場合、血管が活発にスフェロイドに向かって伸長し、Sprout coverage areaはDay 3で50%を超えていた。また、Day 3ではInvasion areaが40%近くに到達し、血管がスフェロイドに侵入していることがわかる。一方、Null細胞の場合、どのタイムポイントを見ても、Sprout coverage area、Invasion area共にASPS細胞の場合よりも値が小さく、血管新生が抑制的であることがわかった(図2)。以上より、ASPSの原因遺伝子の発現によって血管新生が誘導されていることを確かめた。

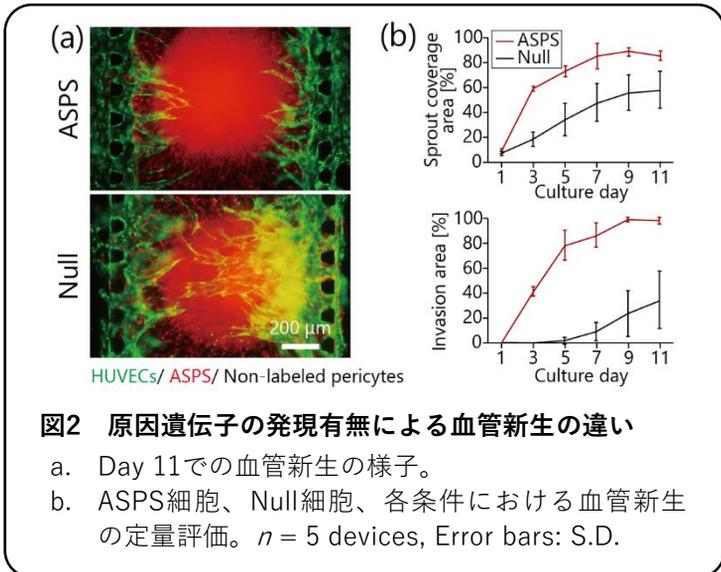


図2 原因遺伝子の発現有無による血管新生の違い

- Day 11での血管新生の様子。
- ASPS細胞、Null細胞、各条件における血管新生の定量評価。n = 5 devices, Error bars: S.D.

ASPSによる血管網の透過性の上昇

一般的に腫瘍血管は正常血管に比べて透過性が高い。腫瘍血管の透過性を模倣できているかを調べるため、ASPSスフェロイドと線維芽細胞のスフェロイドを用い、それらによって形成された血管の透過性を調べた。蛍光BSAを右側流路から血管に導入したところ、ASPSスフェロイドの場合、10秒後には蛍光BSAが血管外へと漏れ出し、600秒後には流路全体に拡散していた。一方、繊維芽スフェロイドの場合、蛍光BSAは600秒経っても血管内に保持されていた(図3)。以上より、ASPSスフェロイドによって形成された血管の透過性が高いことを確かめた。

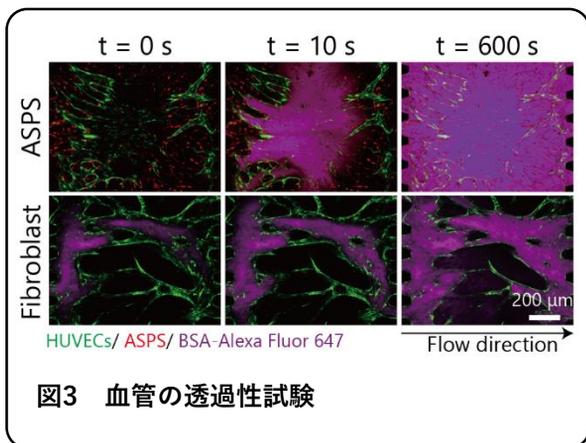


図3 血管の透過性試験

細胞内輸送促進因子と血管新生の関係

Rab27aとSytl2は、血管新生誘導因子(Pdgfb、Gpnmb、Angptl2)をペリサイトや内皮細胞に輸送する細胞内輸送促進因子である。Rab27aまたはSytl2をノックアウトしたASPS細胞(sgRab27a/sytl2)を使用したところ、ASPS細胞と比較し、血管が占める面積が減少した(図4)。以上より、Rab27a/Sytl2がASPSの血管新生誘導に重要な因子であることをMPS上で実証した。開発したMPSは、Rab27aやSytl2等の細胞内輸送促進因子を標的とした新規薬剤を開発する上で強力なツールとなりえる。

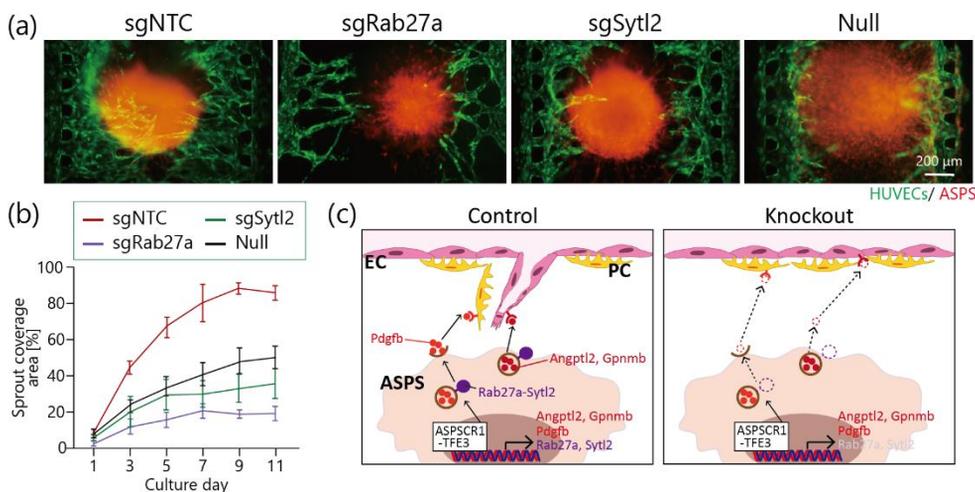


図4 ノックアウト細胞を用いた血管新生評価

- Day 11での血管新生の様子。sgNTCは非標的のsgRNAを導入したASPS細胞。
- 各条件における血管新生の定量評価。n = 5 devices, Error bars: S.D.
- ASPSによる血管新生のメカニズム。