

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10064

研究課題名(和文) 酸性微小環境とのクロストークを介した癌のリンパ節転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of lymph node metastasis via the crosstalk with acidic microenvironment

研究代表者

中西 雅子 (Nakanishi, Masako)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60437382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌のリンパ節転移における腫瘍微小環境の効果を明らかにするため、アシドーシスによるリンパ管内皮細胞(HDLEC)の機能変化を検討した。pH6.4の培養液で刺激するとHDLECの増殖や運動性、管腔形成能が増加した。また、酸刺激はVEGF-C、VEGF-D、IL-8などのリンパ管新生因子の発現を誘導することが確認された。酸刺激による管腔形成や運動性の亢進は、IL-8ノックダウンにより抑制された。これらの効果は、HDLEC上に発現している酸感受性受容体Trpv1を介して引き起こされており、その経路にはNF-kBシグナルが関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Local acidosis is one of the characteristics of cancer microenvironment. In the present study, I focused on the effects of acidosis on human dermal lymphatic endothelial cells (HDLEC) to assess the relationship between acidic microenvironment and lymph node metastasis. Acidic stimulation with low pH medium significantly promoted cellular growth and tube formation. Moreover, real-time PCR revealed that acidic conditions increased the mRNA expression of IL-8. Acidic stimulation increased IL-8 production in HDLEC, whereas a selective Trpv1 antagonist decreased it. IL-8 accelerated the proliferation of HDLEC, and inhibition of IL-8 diminished tube formation and cell migration. In addition, phosphorylation of NF-kB was induced by acidic conditions, and inhibition of NF-kB activation reduced acid-induced IL-8 expression. These results suggest that acidic microenvironment in tumors induce lymphangiogenesis via Trpv1 activation in HDLEC, which in turn may promote lymphatic metastasis.

研究分野：実験病理学

キーワード：リンパ管内皮細胞 癌微小環境 アシドーシス

1. 研究開始当初の背景

癌の病期の進展ならびに予後を評価する上で、所属リンパ節への転移は重要な因子の1つとなる。リンパ節転移には、癌細胞自身が産生する内皮細胞成長因子 **Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C** ならびに **VEGF-D** の発現が重要とされ、これら因子の発現と転移に相関が見られることや、**VEGF-C** 抗体を生体に投与することでリンパ節転移が抑制されることなどが報告されている。

また、近年では癌細胞を取り巻く環境にも注目が集まっており、癌微小環境を形成する線維芽細胞や免疫系細胞が、癌細胞との相互作用を介して転移を促進させていることも明らかになってきた。中でも癌微小環境の1つである低酸素は、癌細胞や周辺細胞において転写因子 **HIF-1 α** の発現を上昇させ、血管ならびにリンパ管の新生を誘導することで転移に促進的に働くとされている。

申請者はこれまで、癌の骨転移とそれに伴う疼痛の発生メカニズムを探るうえで、癌組織の酸性環境に注目してきた。古くより、癌組織は周囲の正常組織に比べて酸性の状態を呈することが知られており、これには癌細胞自身や免疫系細胞により産生されるプロトンや乳酸の関与が考えられている。申請者らは、動物モデルならびに培養細胞系を用いた検討により、特に骨転移巣では破骨細胞によるプロトン産生も相まって局所のアシドーシスが形成され、知覚神経上の酸感受性受容体を刺激することで癌性疼痛の一因となっていることを明らかにした。一方、興味深いことに、この酸性環境は癌細胞自身に働いてその増殖を促進させることや、細胞外基質の分解酵素である **Matrix metalloproteinase** の活性化を引き起こすことで、浸潤・転移といった悪性形質の発現に関与することが報告されている。

2. 研究の目的

以上の背景から、申請者は、癌組織の酸性環境がリンパ節転移にも関与しているのではないかと、との着想に至った。リンパ節転移の成立においてリンパ管新生は最初のステップとなることから、本研究では特にプロトンとリンパ管内皮細胞との相互作用に着目し、リンパ節転移の新たな分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酸刺激によるリンパ管内皮細胞の機能変化の解析

ヒト正常リンパ管内皮細胞 (**HDLEC**) を用い、酸性環境下 (内皮細胞増殖培地 **EGM-MV2** を乳酸添加により **pH6.4** に調整) における細胞の機能変化を検討した。

1) 細胞増殖に対する効果

対照 (**pH7.4**) ならびに酸性環境 (**pH6.4**) における細胞増殖を検討した。

2) 酸刺激による **HDLEC** の形態変化の解明
酸刺激による形態変化を観察するとともに、細胞骨格の発現を免疫蛍光染色ならびに分子生物学的に検討した。

3) **HDLEC** の細胞動態に対する酸刺激の効果の検討

細胞形態の変化は、遊走能や浸潤能の変化を伴っている可能性が示唆される。したがって、**migration assay** ならびに **invasion assay** を行い、酸刺激による細胞運動性の変化について検討した。また、**HDLEC** は血管内皮細胞と同様にコラーゲンゲル上で培養すると管腔を形成する。そこで、**tube formation assay** を行いリンパ管形成に対する酸刺激の影響について検討した。

4) リンパ管新生因子の発現検討

リンパ管新生の促進因子である **VEGF-C**、**VEGF-D**、**IL-1 β** 、**IL-8**、**CXCL1** の発現についてリアルタイム **PCR**、ウェスタンブロット、**ELISA** により検討した。

5) **HDLEC** において主体となる酸感受性受容体の同定

酸感受性受容体のインヒビターを用い、**HDLEC** の機能に重要な因子の同定を試みた。

6) 酸感受性受容体を介した **HDLEC** のシグナル伝達経路を明らかにする目的で、**NF- κ B p65** の関与を検討した。

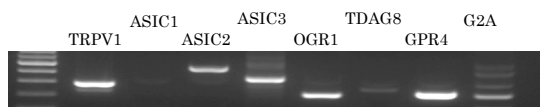
(2) 癌細胞に対する酸の影響ならびにリンパ管内皮細胞と癌細胞との相互作用

ヒト乳癌細胞株である **MDA-MB-231** を用い、酸性環境下における細胞の機能変化について (1) の **HDLEC** と同様に検討した。

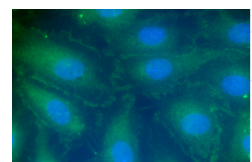
4. 研究成果

(1) 酸刺激による **HDLEC** の機能変化の検討

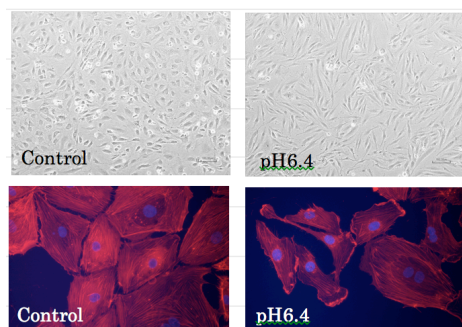
HDLEC は、**TRPV1** や **ASICs** などのイオンチャンネル、ならびに **OGR1**、**TDAG8**、**GPR4**、**G2A** などの **GPCR** といった種々の酸感受性受容体を発現していた (図 1)。



これらのうち、**TRPV1** について免疫蛍光染色を行ったところ、**HDLEC** の細胞膜に一致して発現が認められた (図 2)。

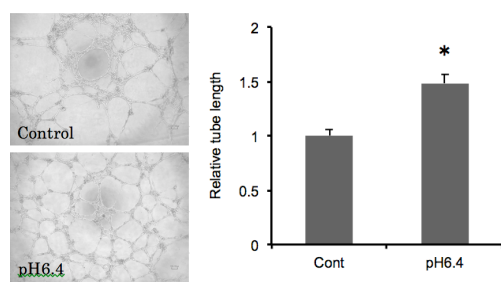


HDLEC は、酸刺激により多角形から紡錘形へと形態変化を起こした。さらにファロイジン染色により、細胞膜上に浸潤突起を形成することが示された (図 3)。

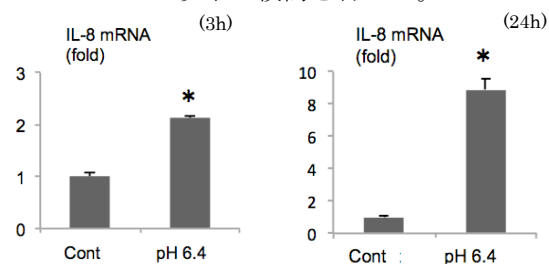


これらの形態変化から、酸性環境下における HDLEC は運動性が高くなっている可能性を考え、invasion assay を行った。その結果、pH6.4 では HDLEC の浸潤能が増加することが示された。

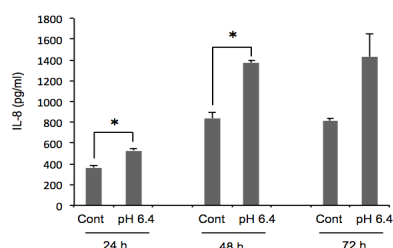
また、HDLEC の増殖能は pH6.4 により有意に増加すること、Tube formation assay においても管腔形成が促進されることが明らかとなった (図 4)。



酸刺激により、HDLEC において VEGF-C、VEGF-D、IL-1 β 、IL-8、CXCL1 などのリンパ管新生因子の mRNA 発現が増加することが示された (図 5)。なかでも最も変動の大きかった IL-8 について以下の検討を行った。

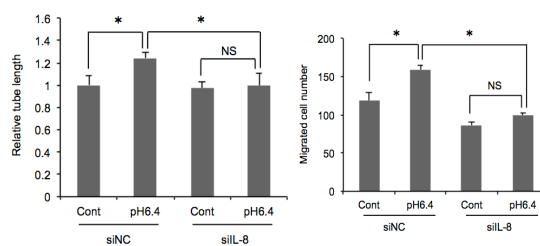


HDLEC における IL-8 の産生量を ELISA で測定したところ、mRNA 発現と同様に酸刺激により有意に増加することが示された (図 6)。

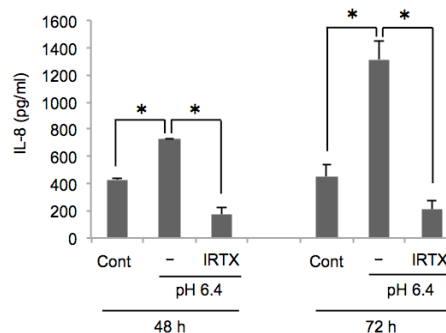


また、HDLEC は IL-8 受容体である CXCR1 ならびに CXCR2 を発現していることが分かった。さらに、IL-8 の添加により HDLEC の増殖は有意に増加し、酸刺激に伴う HDLEC の増殖亢進は IL-8 インヒビターの添加により抑制されることが示された。

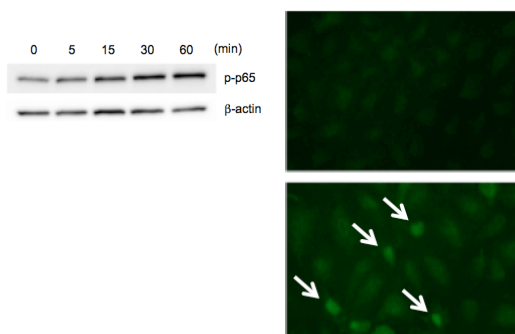
HDLEC の管腔形成能ならびに運動性における IL-8 の効果を検討する目的で、siRNA によるノックダウン実験を行った。その結果、酸刺激により誘導される管腔形成の促進ならびに運動性の亢進は、siIL-8 処置により有意に抑制された (図 7)。



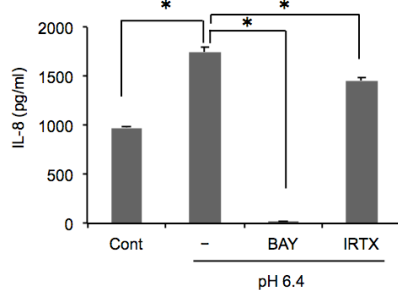
IL-8 の発現誘導における TRPV1 の関与を明らかにするため、TRPV1 のアンタゴニストである IRTX を用いて検討した。その結果、酸刺激により誘導される IL-8 の発現増加は、IRTX 処置により有意に抑制された (図 8)。つまり、酸刺激に伴う IL-8 の発現は、TRPV1 を介していると考えられた。



NF- κ B 経路の活性化は IL-8 の発現に重要な役割を果たすことが報告されている。そこで、TRPV1 を介した IL-8 発現の誘導における NF- κ B シグナルの関与を明らかにするため、リン酸化 p65 (p-p65) の発現について検討した。その結果、HDLEC に対する酸刺激は、p-p65 の発現を増加させることがウェスタンブロット法により明らかになり、免疫蛍光染色では p-p65 の核での染色が増強された (図 9)。



また、これらの効果は、TRPV1 のアンタゴニストである IRTX の処置により抑制されることが示された。同様に、IL-8 mRNA ならびに IL-8 の発現においても、NF- κ B 経路の阻害剤である BAY11-7082 あるいは IRTX を処置することにより、酸刺激による発現誘導が有意に低下する結果が示された (図 10)。

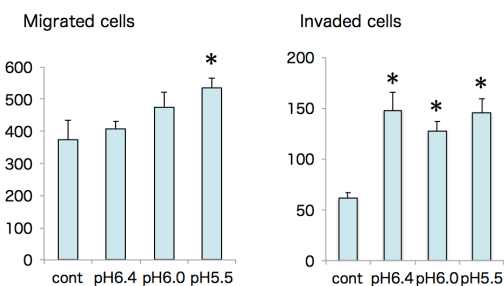
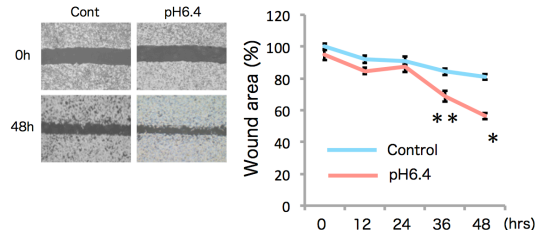


以上の結果から、癌微小環境において形成されるアシドーシスは、リンパ管内皮細胞の運動性に変化を与えると同時に、IL-8 の発現誘導を介してリンパ管新生を増強させている可能性が示唆された。また、この経路には酸感受性受容体である TRPV1 と NF- κ B シグナルが関与すると考えられた。

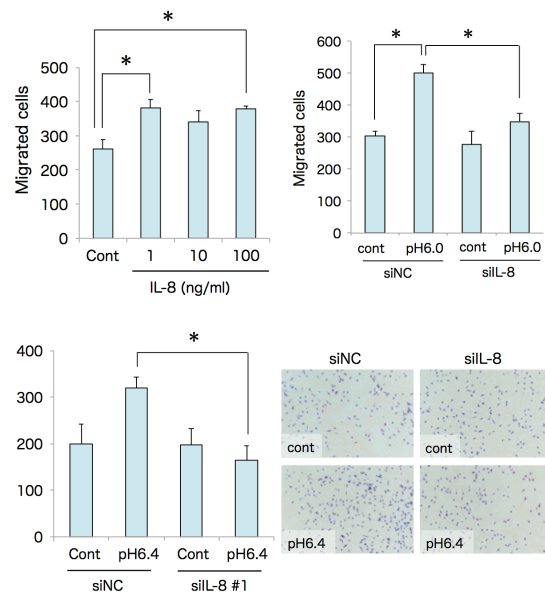
(2) 癌細胞に対する酸の影響

ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 を用いて検討したところ、HDLEC と同様に種々の受容体発現が確認された。

MDA-MB-231 に pH6.4 の酸刺激を行うと、細胞の運動性ならびに浸潤性が有意に増加することが示された (図 11)。



また、MDA-MB-231 における IL-8 産生も酸刺激により発現誘導されることが分かった。酸性環境による MDA-MB-231 の運動性ならびに浸潤能の促進効果は IL-8 を添加した際にも同様に認められた。さらに、酸刺激に伴う運動性の亢進は、IL-8 ノックダウンにより有意に抑制されることが確認された (図 12)。



MDA-MB-231 におけるこれらの変化は、TRPV1 インヒビターでは抑制されなかったため、HDLEC とは異なる受容体を介している可能性が考えられる。現在、この受容体を明らかにするとともに、シグナル経路についても検討中である。

これまでに得られた結果から、癌局所において形成される酸性微小環境は、癌細胞自身ならびにリンパ管内皮細胞の両者に影響を及ぼし、癌の浸潤/転移といった悪性形質の発現に促進的に関与している可能性が示唆された。また、そのメカニズムの一端には IL-8 が重要な役割を果たしていると推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Nakanishi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Acidic microenvironment induce lymphangiogenesis and IL-8 production via TRPV1 activation in human lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res* 345:180-189 (2016)

② Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Omata T, Morita N, Yura Y, Nishimura R, Yoneda T. Cellular fibronectin 1 promotes VEGF-C expression, lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 32:739-753 (2015)

[学会発表] (計 5 件)

① Nakanishi M, Korechika A, Yamakawa H, Kawabe N, Muragaki Y. Acidic

microenvironment contributes the cancer malignancy via IL-8 production

第 106 回日本病理学会 2017 年 4 月 27-29 日 (東京)

② Nakanishi M, Muragaki Y. Acidic microenvironment contributes the development of cancer malignancy via IL-8 production.

第 75 回日本癌学会 2016 年 10 月 6-8 日 (横浜)

③ 中西雅子、是近彩香、山川はるか、川部直子、村垣泰光 癌の悪性化における酸性微小環境の関与

第 105 回日本病理学会 2016 年 5 月 12-14 日 (仙台)

④ Nakanishi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Acidic microenvironment is involved in lymph node metastasis through functional changes of lymphatic endothelial cells.

第 74 回日本癌学会 2015 年 10 月 8-10 日 (名古屋)

⑤ Nakanishi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Acidic microenvironment accelerates lymph node metastasis via the functional changes of LEC.

第 104 回日本病理学会 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日 (名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 雅子 (Nakanishi, Masako)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60437382