

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11222

研究課題名(和文) 遠隔転移モデルマウスによる遠隔転移に関するmicroRNAの解明

研究課題名(英文) Identification of microRNAs associated with distant metastasis in model mouse

研究代表者

嵯峨井 俊 (Sagai, Shun)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90375014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転移モデルマウスとルシフェラーゼ発現腫瘍細胞、および生体発光画像解析装置を用い、転移モデルマウスにおいて、腸骨リンパ節切除において、肺微小転移病巣の活性化が確認された。しかし、活性化までの期間は、腫瘍細胞の種類によって異なった。また、検体数を増やし、尾静脈に腫瘍細胞を注入すると、肺に転移巣を形成する(100%)が、腸骨下リンパ節にも同時に移植すると、それが抑制される(16.7%)ことがわかった。これらの結果より、リンパ節に腫瘍を移植することによって何らかの腫瘍抑制因子が発生すること、リンパ節を切除すると、その因子が抑制されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸骨下リンパ節にがん細胞株(乳癌、悪性組織球腫)を移植すると、高頻度にリンパ節や肺に転移する。さらに移植したリンパ節を切除すると、転移巣が増大するという非常にゆみーくなモデルマウスであるが、日常診療においても、同様の症例が散見され、非常に興味深いモデルと確立できたと考えている。今回の件党内では、その分子病理学的な解明は条件検討などが難しく十分ではなかったが、さらに研究を継続することで新発見を得られるモデルを確立できた学術的意義は大きいものとする。

研究成果の概要(英文)：Using a metastatic model mouse and luciferase expression tumor cells and bioluminescence image analysis equipment, the activation of the pulmonary micrometastasis lesion was confirmed in ilium lymphadenectomy in a metastatic model mouse. However, the time to activation varied according to the type of tumor cells. Furthermore, the implantation of tumor cells into subiliac lymph nodes (SiLN) inhibited the pulmonary micrometastasis when the tumor cells were administered into a caudal vein. These results indicated that some kind of tumor inhibiting factors occurred by a tumor implantation into lymph nodes.

研究分野：頭頸部外科

キーワード：遠隔転移 マウス マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、遠隔転移は患者の生死を規定する大きな予後因子であり、その病態のさらなる解明は、遠隔転移の診断・治療において重要な課題である。近年、non coding RNA である microRNA の研究が盛んに行われており、血中でもエクソソーム中に microRNA が安定し存在することが明らかにされたことにより、癌転移における microRNA の働きが注目されている。本研究の目的は、独自の遠隔転移モデルマウスを用い、活性化した肺転移の機序を解明するために、microRNA の解析を進め、microRNA の遠隔転移における役割を解明することである。また、本研究で同定された転移に関連する microRNA の頭頸部癌患者の腫瘍組織や血中での変動を解析することで、実臨床での高精度診断法や低侵襲治療法への応用の可能性を探ることである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺転移モデルマウスにおける肺転移病巣の活性化の機序を解明するために、肺転移病巣活性化の状態における腫瘍組織や血漿における microRNA を解析し、その遠隔転移における役割を解明すること。また、本研究で同定された遠隔転移に関連する microRNA の頭頸部癌患者の腫瘍組織や血中での変動を解析し、実臨床での高精度診断法や低侵襲治療法への応用の可能性を探ることである。本研究で用いる肺転移モデルマウスは、長径 10mm 程のリンパ節を有する MXH10/Mo/lpr マウスで、腸骨下リンパ節(SiLN)に腫瘍細胞を接種し、そのリンパ節を切除すると肺の転移病巣が活性化するというモデルである。一般に癌が増殖する過程においては、血管やリンパ管の新生や間質細胞の増生等を伴うことから、担癌マウスの組織や血漿に含まれる様々な因子が変動することが予想され、遠隔転移病巣活性化原因を分子生物学的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

検体採取:研究分担者である遠隔転移モデルマウスより組織採取を行う。Microarray(Agilent: マウス遺伝子解析用マイクロアレイキット、マウス microRNA マイクロアレイキット): 採取した組織から抽出した RNA 検体を用いて、マイクロアレイにて遺伝子発現、microRNA 発現の測定を行う。また、マイクロアレイの結果により得られた遺伝子、microRNA につき、以下の実験を行う。Real time PCR(ABI7000): 各遺伝子、microRNA 特異的 primer と蛍光 probe を用い、定量的 PCR を行い、mRNA 発現量、microRNA 発現量を検討する。Immunoblotting(泳動装置、転写装置、可視化装置): 特異的抗体を用い、ECL Detection Reagent (Amersham Biosciences K.K)と LAS1000Plus with a Science Lab 99 Image Gauge(Fuji Photo Film, Minamiashigara, Japan)にて可視化し、遺伝子の発現をみる。

4. 研究成果

平成 28 年度は、上記転移モデルマウスとルシフェラーゼ発現腫瘍細胞、および生体発光画像解析装置を用いて、腫瘍細胞を接種した SiLN 切除のタイミングや腸骨下リンパ節切除後の肺微小転移病巣の活性化の開始時期を検討した。その結果、マウス線維芽細胞由来の腫瘍細胞である MRL/KM-Luc/GFP 細胞およびマウス乳癌細胞由来の FM3A-Luc 細胞のいずれにおいても、SiLN への腫瘍細胞接種後わずか 6 時間経過後に SiLN を切除したマウスにおいて、肺微小転移病巣の活性化が確認された。しかし、リンパ節切除から肺微小転移病巣の活性化までの期間は、MRL/KM-Luc/GFP 細胞においては、SiLN 切除後 9 日であったのに対し、FM3A-Luc 細胞においては SiLN 切除後 28 日で腫瘍細胞の種類によって活性化の時期が異なることが明らかとなった。平成 29.30 年度は、主に、転移関連マイクロ RNA を抽出するためのモデル作成と検体の保存を行った。我々の樹立したリンパ節転移モデル MXH10/Mo-lpr/lpr mouse は、腸骨下リンパ節にがん細胞株(乳癌、悪性組織球腫)を移植すると、高頻度にリンパ節や肺に転移する。さらに移植したリンパ節を切除すると、転移病巣が増大することがわかっている。そのメカニズムに腫瘍由来のマイクロ RNA が関与する可能性を考えている。前年度は、肺転移病巣の活性化が確認される時期を検討した。今回我々は、そのことをふまえて、より詳細に 24 種類の条件を設定し、検体数を増やして(n=144)検討した。また、その際に採取した血清の保存を行った。おどろくべきことに、尾静脈に腫瘍細胞を注入すると、肺に転移病巣を形成する(100%)のは当然のことだが、腸骨下リンパ節にも同時に移植すると、それが抑制される(16.7%)ことがわかった。また、それらのリンパ節を取り除くタイミングを変更してみると、たとえ 6 時間後でもその効果は見られる。これらの結果より、(1)リンパ節に腫瘍を移植することによって何らかの腫瘍抑制因子が発生する。(2)リンパ節を切除すると、その因子が抑制される。ことが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Matsuki D, Oladipo A, Horie S, Okajima J, Komiya A, Oluwafemi O, Maruyama S, Mori S, Kodama T. Treatment of tumor in lymph nodes using near-infrared laser light-activated thermosensitive liposome-encapsulated doxorubicin and gold nanorods. Journal of Biophotonics. 2017 Dec;10(12):1676-1682. doi: 10.1002/jbio.201600241. (査読有)
2. Sato T, Takemura T, Ouchia T, Mori S, Sakamoto M, Arai Y, Kodama T. Monitoring

of blood vessel density using contrast-enhanced high frequency ultrasound may facilitate early diagnosis of lymph node metastasis. *Journal of Cancer*. 2017 Feb 25;8(5):704-715. doi: 10.7150/jca.18027. eCollection 2017. PMID: 28382132 (査読有)

3. Kazu Takeda, Shiro Mori, Tetsuya Kodama. Study of fluid dynamics reveals direct communications between lymphatic vessels and venous blood vessels at lymph nodes of mice. *J Immunol Methods*. 2017 Jun;445:1-9. doi: 10.1016/j.jim.2017.02.008. Epub 2017 Feb 22. (査読有)

4. Mikada, Mamoru; Sukhbaatar, Ariunbuyan; Miura, Yoshinobu; Horie, Sachiko; Sakamoto, Maya; Mori, Shiro; Kodama, Tetsuya. Evaluation of the enhanced permeability and retention effect in the early stages of lymph node metastasis. *Cancer Sci*. 2017 May;108(5):846-852. doi: 10.1111/cas.13206. Epub 2017 May 22. PMID: 28211204 (査読有)

5. Adewale O. Oladipo¹, Oluwatobi S. Oluwafemi, Sandile P. Songca, Ariunbuyan Sukhbaatar, Shiro Mori, Junnosuke Okajima, Atsuki Komiya, Shigenao Maruyama, Tetsuya Kodama. A novel treatment for metastatic lymph nodes using lymphatic delivery and photothermal therapy. *Sci Rep*. 2017 Apr 3;7:45459. doi: 10.1038/srep45459. PMID: 28368042 (査読有)

6. Tada A, Horie S, Mori S, Kodama T. Therapeutic effect of cisplatin given with a lymphatic drug delivery system on false-negative metastatic lymph nodes. *Cancer Sci*. 2017 Nov;108(11):2115-2121. doi: 10.1111/cas.13387. Epub 2017 Sep 15. PMID: 28846190 (査読有)

7. Fujii H, Horie S, Takeda K, Mori S, Kodama T: Optimal range of injection rates for a lymphatic drug delivery system. *J Biophotonics*. 2018 Aug;11(8):e201700401. doi: 10.1002/jbio.201700401. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29461015 (査読有)

8. Uchi T, Sukhbaatar A, Horie S, Sakamoto M, Shiga K, Mori S, Kodama T: Superselective Drug Delivery Using Doxorubicin-Encapsulated Liposomes and Ultrasound in a Mouse Model of Lung Metastasis Activation. *Ultrasound Med Biol*. 2018 Aug;44(8):1818-1827. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.04.003. Epub 2018 May 21. PMID: 29793853 (査読有)

9. Zheng J, Jia L, Mori S, Kodama T: Evaluation of metastatic niches in distant organs after surgical removal of tumor-bearing lymph nodes. *BMC Cancer*. 2018 May 30;18(1):608. doi: 10.1186/s12885-018-4538-8. PMID: 29848296 (査読有)
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：堀井 明

ローマ字氏名：Horii,Akira

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40249983

研究分担者氏名：小玉 哲也

ローマ字氏名：Kodama,Tetsuya

所属研究機関名：東北大学

部局名：医工学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40271986

研究分担者氏名：小川 武則

ローマ字氏名：Ogawa,Takenori

所属研究機関名：東北大学

部局名：病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 50375060

研究分担者氏名：森 士朗

ローマ字氏名：Mori,Shiro

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁): 80230069

研究分担者氏名：齋木 由利子

ローマ字氏名：Saoki,Yuriko

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 80311223

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。