

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18599007  
 研究課題名（和文） 肺癌細胞と共に転移する原発巣由来ストローマ細胞は肺転移巣形成を促進する  
 研究課題名（英文） Lung cancer cells metastasize together with tumor-derived host cells.  
 研究代表者  
 河野 光智（KOHNO MITSUTOMO）  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号 10276272

## 研究成果の概要：

がん転移のメカニズムに関してはさまざまな研究がなされ、宿主 - 腫瘍間の相互作用の重要性が認識されてきている。原発腫瘍ががん細胞とストローマ細胞（間質細胞）とで構成された細胞集塊を血流に放出し、肺に到達したストローマ細胞はがん細胞とともに微小転移巣を形成することを明らかにした。実験的肺転移モデルではストローマ細胞を含む細胞集塊内のがん細胞は viability が高く、ストローマ細胞を含む細胞集塊の方が転移形成能が高いことが明らかとなった。増殖に適した微小環境を作り出す原発巣のストローマ細胞ががん細胞とともに転移先に到達し、がんが転移巣を形成出来る確率を高めていることが示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,000,000	0	1,000,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	600,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌、がん転移、ストローマ細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がん転移のメカニズムに関してはさまざまな研究がなされ、宿主 - 腫瘍間の相互作用の重要性が認識されるようになってきている (Bernards R, and Weinberg RA. A progression puzzle. Nature. 418, 823, 2002)。

腫瘍を構成するがん細胞以外の宿主側のストローマ細胞（間質細胞）には線維芽細胞・筋線維芽細胞などの間葉系細胞、単球・マクロファージなどの免疫細胞、血管内皮細胞や様々な前駆細胞などが挙げられる。しかしな

がら、ストローマ細胞ががん細胞と共に転移し、がん転移のメカニズムに関与していることに関する研究は未だかつてなされたことがなかった。

がんの転移は非常に非効率的な現象であると考えられている。腫瘍は非常に多数のがん細胞を血液中に放出しているが、そのうち実際に転移を形成する率は非常に低いのである。癌細胞が原発巣を離れ、遠隔臓器に転移巣を形成するまでには、数多くのハードルを乗り越えなければならないからである。まず原発巣では癌細胞は血管に入り込んで血流の中に入り込む必要がある。そして激しい血流のなかで破壊されることなく生き残り、転移先臓器に到達する。そこで血管内皮に接着、或いは細い血管網に物理的に捕捉され、その後血管外に出る。免疫機構の攻撃をかわし、増殖を開始し、最後には血管新生を導いてようやく転移が完成する。そのため、癌細胞10万個のうち、転移巣を形成することが出来るのは2、3個にすぎないとされている (Butler TP and Gullino PM, Quantification of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 35, 512-516, 1975 )

そこで研究代表者たちは、生体で転移が実際に成立するのは、増殖に適した微小環境を作り出す原発巣のストローマ細胞ががん細胞とともに転移先に到達し、がんが転移巣を形成出来る確率を高めているからではないかと考え、我々は以下の大胆な仮説を立てた。(1)腫瘍はがん細胞だけでなく、がん細胞とストローマ細胞とから構成される細胞集塊も血流に放出し、転移先に到達したストローマ細胞はがん細胞と共に微小肺転移巣を形成する。(2)ストローマ細胞はがん細胞の増殖に適した微小環境を提供し、転移巣形成の初期にがん細胞をサポートしている。(3)ス

トローマ細胞、或いはストローマ細胞 - がん細胞間の相互作用をターゲットとした転移阻止、抑制が可能である。

## 2 . 研究の目的

がん細胞と共に転移先臓器に到達するストローマ細胞のがん転移巣形成初期のメカニズムへの関与を明らかにすることを目的とし、さらにストローマ細胞或いはストローマ細胞とがん細胞との相互作用をターゲットとする転移抑制法への応用の可能性を探る。

## 3 . 研究の方法

全身の組織や細胞が緑色蛍光を発する GFP マウスにマウス肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma を皮下注射して腫瘍を作る。腫瘍は緑色蛍光を有するストローマ細胞を取り込みながら成長する。得られた腫瘍をミンスして、癌細胞とストローマ細胞から構成される細胞集塊 (直径 40 ~ 100 $\mu$ m) を作成する。この方法により癌細胞とストローマ細胞を蛍光顕微鏡により区別することが可能となり、がんの転移先におけるストローマ細胞の役割を明らかにすることが可能となった。

## 4 . 研究成果

がん転移マウスモデルの作成

### (1) がん細胞株の GFP マウスへの移植

全身の組織、細胞が緑色蛍光を発する GFP マウス (C57BL/6 -Tg(CAG -EGFP)C15 -001 - FJ0010sb) にマウス肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma (LLC) 或いはマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 を1匹あたり  $1 \times 10^6$  個の細胞を皮下或いは腎臓皮膜下注射して腫瘍を作る。腫瘍は宿主マウス由来のストローマ細胞を内部に導きながら成長する。蛍光顕微鏡で腫瘍を観察するとストローマ細胞は緑色に見えるので識別が可能であった。

(2) がん細胞と共に血流に放出されるストローマ細胞の採取

がん細胞を GFP マウスの腎臓皮膜下に注射し、GFP 陽性ストローマ細胞を含む腫瘍を約 3 週間発育させる。マウスに麻酔をかけて頸動脈および頸静脈にカニューレーションし、また腎静脈もカニューレーションする。頸動脈圧をモニターしながら酸素化したマウス血液（別のマウスを犠牲死させて採取する）或いは人工血液（ヘモグロビン小胞体）を持続静注し、腎静脈から約 1 時間持続採血して腫瘍から流出する細胞を採取する。蛍光顕微鏡にてがん細胞およびストローマ細胞（緑）、がん細胞とストローマ細胞からなる細胞集塊を観察する。

原発巣のストローマ細胞を緑の蛍光蛋白で標識してマウス転移モデルを作成することにより、原発腫瘍ががん細胞だけでなくがん細胞とストローマ細胞とで構成された細胞集塊を血流に放出していることが明らかになった。更にまたストローマ細胞を含む細胞集塊内のがん細胞は viability が高いことも明らかとなった。

(3) 実験的転移モデルの作成 がん細胞とストローマ細胞からなるモザイク細胞集塊を静注して出来る微小肺転移の検討

GFP マウスの皮下に発育させた腫瘍をミンスし、2 種類のフィルターを用いて直径 40~100 $\mu$ m のがん細胞とストローマ細胞から構成されるモザイク状微小細胞集塊を作成し、これを野生型 C57BL/7 マウスに 1 匹当たり 2000~3000 個、尾静脈から静注する。5~10 日後にマウスを犠牲死させ、蛍光顕微鏡にて微小肺転移を観察する。野生型マウスの中で、がん細胞およびストローマ細胞（緑）とを含む肺転移巣はモザイク状に観察される。ストローマ細胞を含む細胞集塊の移植後 1 日目には胸腔内に微小播種病巣が形成された。

蛍光顕微鏡で観察すると播種巣内に緑色蛍光を発するストローマ細胞を確認することが出来た。移植された緑色蛍光のストローマ細胞は移植後 5 日後まで観察することが出来た。

(4) 腫瘍組織の移植による自発転移モデル

がん細胞を GFP マウスの腎臓皮膜下に注射して得られた腫瘍組織を、野生型マウスの腎臓皮膜下に移植する。5~10 日後にマウスを微小肺転移巣及び腹腔内リンパ節転移巣、腹膜播種巣を観察する。がん細胞及びストローマ細胞（緑）とを含むモザイク状の微小転移巣が肺内やリンパ節、播種病巣に観察された。

以上の結果より、生体で転移が実際に成立する際に、増殖に適した微小環境を作り出す原発巣のストローマ細胞ががん細胞とともに転移先に到達し、がんが転移巣を形成出来る確率を高めていることが示唆された。原発巣を構成するストローマ細胞が、がん細胞と共に細胞集塊を形成して転移先に到達し、原発巣と同様の微小環境を早期に提供することによって、転移巣形成の初期段階で重要な役割を果たしていると考えられた。

## 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 18 件 すべて査読あり)

1. Exacerbation of bleomycin-induced injury and fibrosis by pneumonectomy in the residual lung of mice. Kakizaki T, Kohno M, Watanabe M, Tajima A, Izumi Y, Miyasho T, Tasaka S, Fukunaga K, Maruyama I, Ishizaka A, Kobayashi K. J Surg Res. [in press]

2. Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. Tajima A, Kohno M, Watanabe M, Izumi Y, Tasaka S, Maruyama I, Miyasho T, Kobayashi K. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2008 Aug 19. [Epub ahead of print]
3. Systemic Administration of Hemoglobin Vesicle Elevates Tumor Tissue Oxygen Tension and Modifies Tumor Response to Irradiation. Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. *J Surg Res* 2008. [Epub ahead of print]
4. Histopathological changes of rat brain after direct injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. Sakai H, Okamoto M, Ikeda E, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jul 31. [Epub ahead of print]
5. Structure, photophysical property, and cytotoxicity of human serum albumin complexed with tris(dicarboxymethylene)[60]fullerene. Qu X, Komatsu T, Sato T, Glatter O, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. *Bioconjug Chem*. 2008 Aug;19(8):1556-1560. Epub 2008 Jul 22.
6. Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, Hashiguchi A, Yamada T, Izumi Y, Watanabe M, Kawamura M, Horinouchi H, Shimada N, Kobayashi K, Sakamoto M. *Mod Pathol*. 2008 Aug;21(8):992-1001. Epub 2008 May 30.
7. Enhanced radiation response of a solid tumor with the artificial oxygen carrier 'albumin-heme'. Horinouchi H, Yamamoto H, Komatsu T, Huang Y, Tsuchida E, Kobayashi K. *Cancer Sci*. 2008 Jun;99(6):1274-1278. Epub 2008 Apr 21.
8. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone after chemotherapy with vinorelbine. Kuroda H, Kawamura M, Hato T, Kamiya K, Kawakubo M, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayashi K, Nakayama M. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jul;62(2):331-333.
9. 術前化学療法後に外科的切除し得た前縦隔原発 Germ cell tumor with somatic type malignancy の 1 例 高橋祐介, 池田達彦, 河野光智, 堀之内宏久, 林雄一郎, 小林紘一, 仁木利郎 *肺癌* 2007.10. 47 巻 6 号:793-794
10. 縦隔へ向かって発育を示した鎖骨原発軟骨肉腫の 1 例 江間俊哉, 江口圭介, 井澤菜緒子, 高橋祐介, 池田達彦, 朝倉啓介, 塚田紀理, 河野光智, 泉陽太郎, 渡辺真純, 堀之内宏久, 川村雅文, 小林紘一 *日本呼吸器外科学会雑誌* 2007.09. 21 巻 6 号:850-853
11. Hemostatic efficacy of a recombinant thrombin-coated polyglycolic acid sheet coupled with liquid fibrinogen, evaluated in a canine model of pulmonary arterial hemorrhage. Izumi Y, Gika M, Shinya N, Miyabashira S, Imamura T, Nozaki C, Kawamura M, Kobayashi K. *J Trauma*. 2007 Oct;63(4):783-787; discussion 787.
12. The short-term efficacy of fibrin glue combined with absorptive sheet material in visceral pleural defect repair. Gika M,

Kawamura M, Izumi Y, Kobayashi K. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2007 Feb;6(1):12-15.

13. Prediction of anti-tumour effect of thermochemotherapy with in vitro thermochemosensitivity testing for non-small cell lung cancer. Abiko T, Kawamura M, Izumi Y, Oyama T, Saito Y, Kobayashi K. Int J Hyperthermia. 2007 May;23(3):267-275.

14. Cross-linked poly (gamma-glutamic acid) attenuates peritoneal adhesion in a rat model. Izumi Y, Yamamoto M, Kawamura M, Adachi T, Kobayashi K. Surgery. 2007 May;141(5):678-681.

15. Hyperthermia-enhanced tumor accumulation and antitumor efficacy of a doxorubicin-conjugate with a novel macromolecular carrier system in mice with non-small cell lung cancer. Oyama T, Kawamura M, Abiko T, Izumi Y, Watanabe M, Kumazawa E, Kuga H, Shiose Y, Kobayashi K. Oncol Rep. 2007 Mar;17(3):653-659.

16. Phase II trial of gemcitabine and docetaxel in patients with completely resected stage IIA-III A non-small cell lung cancer. Kawamura M, Eguchi K, Izumi Y, Yamato Y, Koike T, Sakaguchi H, Hada E, Kobayashi K. Cancer Chemother Pharmacol. 2007 Sep;60(4):495-501.

17. Effects of initial passage of endotoxin through the liver on the extent of acute lung injury in a rat model. Shimada H, Hasegawa N, Koh H, Tasaka S, Shimizu M, Yamada W, Nishimura T, Amakawa K, Kohno M, Sawafuji M, Nakamura K, Fujishima S, Yamaguchi K, Ishizaka A Shock. 2006 Sep;26(3):311-315.

18. Early pulmonary resection for Mycobacterium avium complex lung disease treated with macrolides and quinolones. Watanabe M, Hasegawa N, Ishizaka A, Asakura K, Izumi Y, Eguchi K, Kawamura M, Horinouchi H, Kobayashi K. Ann Thorac Surg. 2006 Jun;81(6):2026-2030.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕 該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
河野 光智 (KOHNO MITSUTOMO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：10276272

(2)研究分担者  
小林 紘一 (KOBAYASHI KOICHI)  
慶應義塾大学・医学部・名誉教授  
研究者番号：80051704

堀之内 宏久 (HORINOUCHI HIROHISA)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：60173647

渡辺 真純 (WATANABE MASAZUMI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90201227

泉 陽太郎 (IZUMI YOTARO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：90245506