

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590384

研究課題名（和文） リンパ管形成場としての腫瘍間質の分子病理学的検討

研究課題名（英文） Molecular and pathological examination of lymphangiogenic tumor stroma

研究代表者

板野 直樹 (ITANO NAOKI)

信州大学 医学系研究科・准教授

研究者番号：40257712

研究成果の概要：

腫瘍間質を構成するヒアルロン酸糖鎖がリンパ管新生に働く機構と、それに関わる分子実体の解明を目的として、新規に樹立したリンパ管新生を伴う乳癌モデルマウスを用いて分子病理学的解析を施行した。さらに、リンパ管形成の“場”としての腫瘍間質に着目して、それを構成している分子の会合状態や炎症細胞の動員作用、がん細胞に対する遺伝子発現調節の機構について解析を施行し、進行がんのリスク要因であるリンパ管新生の病態解明を目指した。本研究の結果、腫瘍関連線維芽細胞の形成するヒアルロン酸マトリックスが、腫瘍内微小環境を修飾することで、マクロファージの腫瘍内への動員に中心的な役割を果たしていること、さらにはこのマクロファージが腫瘍リンパ管新生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍・細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

がんのリンパ行性転移は、従来の考えでは、既存のリンパ管に浸潤到達したがん細胞が、管内に移行することにより起きるとされてきたが、血管新生と同様に腫瘍内にリンパ管が新生し、新生リンパ管内にがん細胞が移行するとの見方が重要視されてきている。つまり、腫瘍リンパ管新生は、リンパ行性転移のリスク要因とされ、このリンパ管新生の機構解明と抑制によってがん転移を阻止すること

も可能と考えられる。一般にリンパ管新生の成立機序は、がん細胞の産生するリンパ管新生因子が、リンパ管内皮細胞に直接あるいは間接的に作用した結果として説明される。しかしながら、臨床病理像が示すように、リンパ管はがん細胞よりもむしろ腫瘍間質細胞と関連して観察されるとの報告もある。従って、リンパ管新生は、がん細胞と宿主間質細胞の関係したさらに複雑な機構により調節されている可能性がある。

がん組織は、がん細胞に加えて線維芽細胞、炎症細胞、血管内皮細胞など様々な宿主由来細胞が混在する細胞集団であるが、単なる細胞塊ではなく、細胞間隙にいわゆる“腫瘍間質”を形成して相互に影響し合い、細胞社会を形成している。この腫瘍間質は、細胞外マトリックスや増殖因子等の生理活性物質からなる反応プラットフォームであり、腫瘍内微小環境としてがんの生物像決定に重要な役割を果たす。またこの腫瘍間質は、宿主に作用して血管新生の促進に働くことも知られている。しかしながら、リンパ管新生に対する腫瘍間質の作用については、適したモデル実験系の欠如もあって、知見の集積が乏しくその関与は依然不明瞭である。当該研究者はこれまでに、乳腺腫瘍および乳腺上皮においてヒアルロン酸を過剰産生する乳癌自然発症モデルマウスを用いて、ヒアルロン酸過剰産生下に乳腺腫瘍内へ間質細胞が顕著に動員されること、そして間質細胞由来の血管新生因子やリンパ管新生因子が腫瘍血管やリンパ管形成の促進に働くことを明らかにしてきた(図1)。

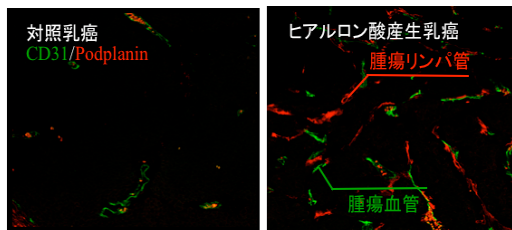


図1 ヒアルロン酸過剰産生乳癌における血管・リンパ管新生の亢進

2. 研究の目的

腫瘍間質を構成するヒアルロン酸糖鎖がリンパ管新生に働く機構と、それに関わる分子実体の解明を目的として、新規に樹立したリンパ管新生を伴う乳癌モデルマウスを用いて分子病理学的解析を施行した。さらに、リンパ管形成の“場”としての腫瘍間質に着目して、それを構成している分子の会合状態や炎症細胞の動員作用、そして、それに関連する遺伝子発現の調節機構について解析を施行し、進行がんのリスク要因であるリンパ管新生の病態解明を目指した。

3. 研究の方法

ヒアルロン酸過剰産生群 (Has2^{ΔNeo}) と対照群 (Has2^{+Neo}) の乳癌について、腫瘍内へのマクロファージの動員の有無を、マクロファージに対する特異抗体を用いて、免疫組織化学的解析とFACS解析により検討した。マクロファージは、その細胞表面にヒアルロン酸受容体を発現しており、これを介してヒアルロン酸へ接着することが知られている。そこで、間質の主要な構成成分として機能しているヒ

アルロン酸細胞外マトリックスに対する腹腔マクロファージの接着性を、培養下において検討した。

DNAマイクロアレイにより、乳癌組織でヒアルロン酸依存的に発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。また、増殖因子やリンパ管新生因子の発現について、ヒアルロン酸依存的な変動を抗体アレイにより調べた。具体的には、ヒアルロン酸過剰産生群と、リンパ管形成の乏しい対照群から同径サイズの乳癌を摘出してRNAを抽出し、逆転写反応後、DNAマイクロアレイと発現解析ソフトウェアにより遺伝子発現の多変量解析を行った。特徴的な発現変動の確認された遺伝子については、リアルタイム定量RT-PCR法により確認した。更に、タンパク質抽出後、代表的な増殖因子やサイトカインについては、抗体アレイを用いて定量解析を行った。

ヒアルロン酸過剰産生マウスの乳癌組織より、がん細胞と腫瘍関連線維芽細胞 (TAF) を分離・樹立した。樹立したTAFの存在下あるいは非存在下で、がん細胞をヌードマウスマウスの乳腺皮下組織に移植して担癌状態を作り、癌のin vivo再構成系を確立した。そして、腫瘍増殖やリンパ管新生に対する影響を検討して、腫瘍間質のリンパ管新生に対する促進作用を検証した。

4. 研究成果

腫瘍間質を構成するヒアルロン酸糖鎖がリンパ管新生に働く機構と、それに関わる分子実体の解明を目的として、ヒアルロン酸過剰産生の乳癌モデルマウスを用いて分子病理学的解析を施行した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生群の乳癌において腫瘍間質の形成が亢進していた(図2)。さらには、ヒアルロン酸過剰産生群のマウス乳癌組織を、マクロファージ特異的なマーカーである

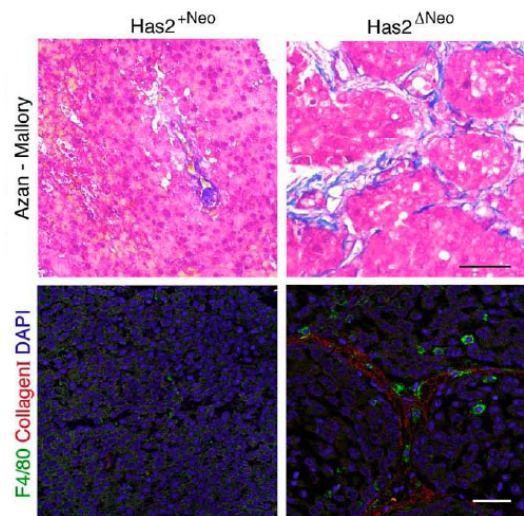


図2. ヒアルロン酸産生乳癌 (Has2^{ΔNeo}) における腫瘍間質形成の亢進と間質近傍へのマクロファージの動員。

F4/80 抗体にて染色すると、腫瘍間質へのマクロファージの動員が顕著にみられた (図 2、3)。この結果は、ヒアルロン酸に富んだ腫瘍微小環境が、マクロファージの腫瘍内への動員を誘導している事を示唆している。

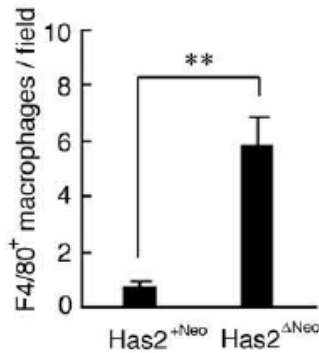


図 3. マクロファージの腫瘍内動員
ヒアルロン酸産生乳癌 (Has2^{ΔNeo}) と対照乳癌 (Has2^{+Neo}) において F4/80 陽性マクロファージの腫瘍内動員を比較した。

ヒアルロン酸過剰産生マウスの乳癌組織より樹立したTAFを用いて、TAFの存在下あるいは非存在下で、がん細胞をヌードマウス乳癌皮下組織に移植して、移植癌へのマクロファージの動員を検討した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞を用いて形成した移植癌では、TAFの存在に関わらず腫瘍間質の形成と腫瘍内へのマクロファージの動員が顕著であった (図 4)。一方、対照乳癌細胞の移植癌では、TAF非存在下ではマクロファージの動員は自然発症の対照乳癌と同程度に低かった。しかしながら、TAF共存下では、腫瘍間質の形成が亢進し、マクロファージの腫瘍内動員が有意に増加していた。以上の結果から、マクロファージの腫瘍内への動員にTAFとそれが形成する腫瘍間質が中心的な役割を果たしていることが示唆された。

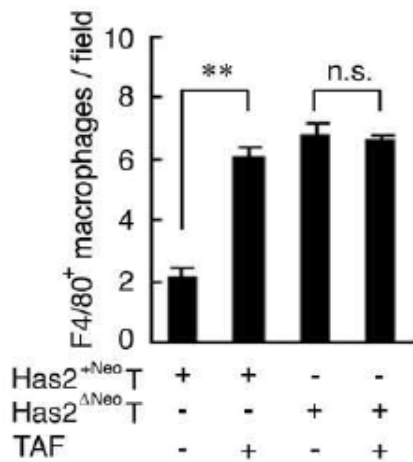


図 4. 移植癌へのマクロファージの動員がん細胞と TAF の組み合わせ (図下)。

近年、腫瘍内の血管新生やリンパ管新生の促進に腫瘍関連マクロファージ (TAM) が密接に関与しているとの報告がある。マクロフ

ァージには性質の異なるサブタイプの存在が明らかとなっており、TAM はそのうち M2 マクロファージの性質を有していることが報告されている。そこで、M2 マクロファージの細胞表面マーカーである CD206 を指標に FACS 解析を行った。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌において M2 マクロファージが、対照乳癌に比して多く動員されていることを明らかにした (図 5)。以上の事実から、当該マクロファージが、腫瘍の成長や血管新生・リンパ管新生の促進に働く TAM である可能性が示唆された。

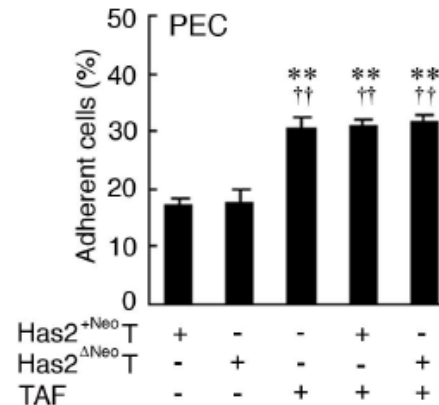


図 6. 腹腔マクロファージの接着性の解析

そこで、TAM の腫瘍間質への動員機構を検討するために、ヒアルロン酸過剰産生群の腫瘍より樹立したがん細胞および TAF 細胞株を用いてマクロファージの接着実験を行った。その結果、マクロファージはがん細胞に比べて TAF に対してより接着すること、そしてその接着にヒアルロン酸マトリックスが部分的に関与していることを見出した (図 6)。これらの結果から、腫瘍内 TAM の動員には、TAF とそれらが形成する微小環境が重要であると推測された。

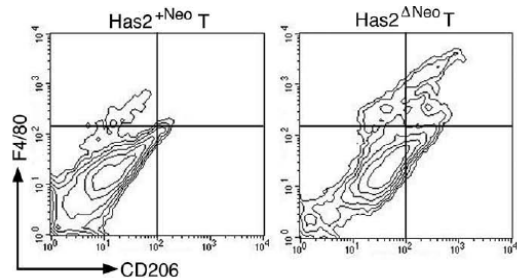


図 5. 腫瘍内 M2 マクロファージの FACS 解析

ヒアルロン酸の過剰な産生は、腫瘍内微小環境を構成する細胞外マトリックスの性質を修飾し、マトリックスに蓄積している増

殖因子の発現や存在状態を変化させる可能性が考えられる。そこで、乳癌組織における遺伝子発現をDNAマイクロアレイとリアルタイム定量 RT-PCR 法により解析した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌では、リンパ管新生因子の VEGF-C とケモカインの CXCL12 について発現の亢進を認めた。これまでに、TAM はリンパ管新生因子の VEGF-C の主たる産生細胞として知られており、また TAF からは間葉系幹細胞の動員に働く CXCL12 が産生されることが知られている。つまり、腫瘍間質を構成しているヒアルロン酸が TAF や TAM を腫瘍内に動員する結果、リンパ管新生因子やケモカインを豊富に含有する“リンパ管新生の場”が形成されたと考えられた(図7)。

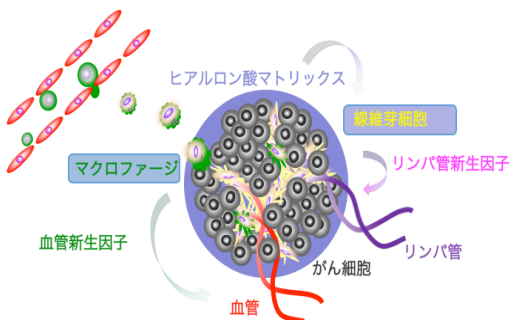


図7. ヒアルロン酸合成促進によって引き起こされる進行生乳癌の病態

以上の結果より、間質線維芽細胞の形成するヒアルロン酸リッチな腫瘍微小環境が、TAM の動員とその後の血管・リンパ管新生に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は、ヒアルロン酸依存的なシグナル因子の発現を制御して、がん進展を阻止する技術の開発を進める計画である。

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 4 件)

- ① Koyama, H., Kobayashi, N., Harada, M., Takeoka, M., Kawai, Y., Sano, K., Fujimori, M., Amano, J., Ohhashi, T., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Significance of Tumor-Associated Stroma in Promotion of Intratumoral Lymphangiogenesis: Pivotal Role of a Hyaluronan-Rich Tumor Microenvironment. *Am. J. Pathol.* 172:179-193. 2008. 査読有
- ② Itano, N., Zhuo, L., and Kimata, K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci.* 99:1720-1725. 2008. 査読有

- ③ Itano, N., and Kimata, K. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 18:268-274. 2008. 査読有
- ④ 三好征司、小林宣隆、板野直樹 進行癌モニタリングにおけるヒアルロン酸リッチ腫瘍内微小環境の重要性 臨床糖鎖バイオマーカーの開発-糖鎖機能の解明とその応用(成松久監修) 遺伝子医学MOOK 234-239, 2008. 査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① 板野直樹 谷口俊一郎 ヒアルロン酸：がん-間質細胞相互作用の微小環境メディエーター 第67回日本癌学会学術総会 シンポジウム「がんの浸潤・転移の分子機構」名古屋(名古屋国際会議場) 2008. 10. 30
- ② 小林宣隆、三好征司、鄒健、小山 洋、竹岡みち子、吉田和夫、天野 純、谷口俊一郎、板野直樹 ヒアルロン酸を介したマクロファージ動員による腫瘍間質形成と血管成熟化機構の検討 第67回日本癌学会学術総会 名古屋(名古屋国際会議場) 2008. 10. 29
- ③ 三好征司、小林宣隆、鄒健、竹岡みち子、谷口俊一郎、板野直樹 ヒアルロン酸細胞外マトリックスによる腫瘍関連マクロファージ(TAM)の動員機構 第17回日本がん転移学会学術集会 鹿児島(鹿児島サンロイヤルホテル) 2008. 7. 24
- ④ 三好征司、小林宣隆、板野直樹 血管・リンパ管新生におけるヒアルロン酸リッチ腫瘍微小環境と腫瘍関連マクロファージの作用 平成20年度糖鎖機能研究会 愛知(岡崎自然科学研究機構) 2008. 5. 22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板野 直樹 (ITANO NAOKI)

信州大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40257712

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者