

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890056
 研究課題名（和文） リンパ管内皮細胞間接着が癌細胞のリンパ管浸潤に与える影響
 研究課題名（英文） Structural changes of junctions between lymphatic endothelial cells in lymphatic invasion
 研究代表者
 岩田 要（IWATA CANAME）
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：50511391

研究成果の概要（和文）：「リンパ行性転移の場ではリンパ管内皮細胞間隙の開大がみられ、癌細胞のリンパ管侵襲を受けやすくなっている」という仮説が成立するかの検討を目標に、癌細胞を用いる前段階として炎症時のリンパ管変化を観察した。マウス腹腔に催炎剤を投与するとマウス横隔膜リンパ管の腹腔開口部（Stomata）の開大が明らかになった。また、マルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブを投与してみると、炎症時の Stomata 開大が非炎症時レベルまで抑制された。

研究成果の概要（英文）：We hypothesize that the junctions between lymphatic endothelial cells are dilated in tumor environment and that the dilation help the invasion of cancer cells. We used the murine model of peritoneal inflammation and observed the structural changes in lymphatic vessels on the diaphragms. Stomatias, which are the entrance of initial lymphatic vessels on diaphragm, are dilated after the i.p. injection of proinflammatory agent. And the dilation is completely inhibited by treatment of sorafenib, a multikinase inhibitor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：癌転移・リンパ管・炎症

1. 研究開始当初の背景

●臨床・基礎におけるリンパ管研究

リンパ行性転移は一般的に癌患者の予後決定因子の一つであり、Halsted の時代から臨床上の重要性が認識されていた。ところが、リンパ行性転移の病理診断が主として所属リンパ節への転移の有無に基づいて行われるため、癌細胞の進展経路となるリンパ管自体が注目されることはまれであった。近年、縮小手術を行う根拠を得るための要請から、センチネルリンパ節の同定やその転移の評価が注目されているが、やはり臨床リンパ管自体は注目されていない。

一方、リンパ管の基礎的な研究は、形態学的には電子顕微鏡による微細形態構造の観察が、そして機能的にはリンパ液の輸送の解析が 1980 年代までにほぼ完了した。1990 年代後半に、リンパ管特異的のマーカールが発見され微小リンパ管の同定が可能になると、リンパ管研究は再び脚光を浴びるようになった。VEGF-C、-D/VEGFR-3 を中心としたリンパ管内皮細胞増殖に関わる経路が特定されると、リンパ管の形態と機能とを関連させる研究が急速に進展した。

●腫瘍リンパ管の形態と機能(転移)の関連

それらの研究のなかでも重要なのは、腫瘍リンパ管新生(形態的な増加)とリンパ行性転移(病態としての機能)とが関連していることが明らかにされたことである(Stacker et al. 2001 Nature Med. and Skobe et al. 2001 Nature Med.)。この現象は複数の動物実験および臨床標本の検討から再現され、現在では一般に受け入れられている。また、腫瘍リンパ管が径の拡張や弁機能不全をおこし、リンパ流の方向性が失われるという報告もあり(Hoshida et al. 2006 Cancer Research)、これも腫瘍リンパ管

の形態が機能と関連することを明らかにしている例である。

ところで、腫瘍リンパ管よりも研究が先行している腫瘍血管の知見によれば、腫瘍血管は内皮細胞間隙が開大し透過性が亢進している。そのような内皮細胞間隙の開大は、腫瘍リンパ管内皮においても想定することができる。リンパ行性転移ではリンパ管のいずれかの部位で癌細胞がリンパ管外から管内へ侵入している筈であり、仮に腫瘍リンパ管が内皮細胞間隙の開大という形態上の特徴を有するならば、リンパ管侵襲の受けやすさという病態(機能)に関連している可能性が考えられる。

●リンパ行性転移に影響する要因:リンパ管新生以外の可能性

研究代表者は、これまでヒト胃癌のリンパ行性転移をよく模倣した動物モデル(ヒト胃癌細胞株のヌードマウス胃壁への同所移植モデル)を用い、胃同所移植巣周囲に腫瘍リンパ管新生を認めること、そして腫瘍リンパ管新生をシクロオキシゲナーゼ-2 阻害剤の投与により抑制すると所属リンパ節転移が抑えられることを明らかにし(Iwata et al. 2007 Cancer Research)、リンパ管新生がリンパ行性転移と相関することを確認した。ところが、ヒト膀胱癌細胞株の皮下移植という別のマウスモデルにおいては、明らかな腫瘍新生リンパ管が存在するにも関わらず癌のリンパ管侵襲がほとんど認められないという状況も経験し(Oka and Iwata et al. 2008 Blood)、リンパ行性転移に影響するものとしてリンパ管新生以外の要因も想定せざるを得なかった。(これと等価の内容で、リンパ節転移を起こす際にリンパ管新生を必ずしも必要としないという報告(Wong et al. 2005 Cancer Research)も存在する。)

また、前出の胃癌細胞株は、胃壁移植巣に

においてはリンパ管(毛細リンパ管)に容易に侵襲するにも関わらず、一たび侵襲した後は逸出することなくリンパ管(集合リンパ管)内を進展する様子も観察され(図1)、癌細胞のリンパ管の「出入り」にはリンパ管の構造が影響していることが推測される。

●内皮細胞間隙の開大、透過性亢進という現象

前述した腫瘍血管の透過性に関し、研究代表者は腫瘍血管の透過性を操作することにより高分子抗癌剤の腫瘍内分布を高め、抗腫瘍効果の増強を図る方法を報告している(Kano and Iwata et al. 2007 Proc Natl Acad Sci U S A.)。

このような透過性が、腫瘍リンパ管においても存在するかについての直接的な証拠は得られていないものの、リンパ管の透過性が亢進する病態が実際に存在する例として、紫外線B波刺激(日光皮膚炎のモデル)によるリンパ管の透過性亢進の報告をあげることができる(Kajiyama et al. 2006 Am J Pathol.)。研究代表者は予備実験としてこのモデルを追試しリンパ管内皮細胞接着を検討したところ、紫外線刺激後のリンパ管内皮細胞間隙の開大を示唆する観察結果が得られた。一般的に炎症と腫瘍には共通の病態が観察されることが多いことより(例:血管透過性の亢進)、腫瘍リンパ管内皮細胞間隙に開大している可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

①リンパ管侵襲を認める腫瘍組織環境で、リンパ管内皮細胞間接着に形態変化を認めるか、および、②リンパ管内皮細胞間接着を外因性に操作することにより、リンパ管侵襲の程度が変化するか、を *in vivo*(動物モデル)において観察されるか明らかにする。

3. 研究の方法

腫瘍リンパ管の形態(細胞間接着)と機能(リンパ行性転移)の関連を示すために、

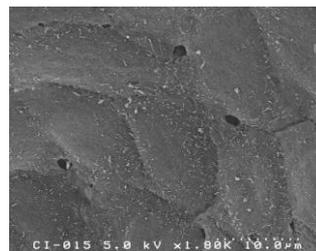
(A)リンパ管侵襲をきたしている腫瘍または同環境で、リンパ管内皮細胞間接着が変化しているかの検討(機能→形態)

(B)リンパ管内皮細胞間接着を外的に操作して、リンパ管侵襲の程度が変化するかの検討(形態→機能)を行う。

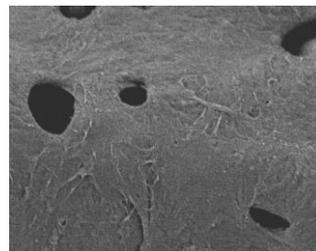
4. 研究成果

起始リンパ管の評価として、マウス横隔膜リンパ管の腹腔開口部(Stomata)を用い、この径の変化に着目した。また、癌において炎症と共通したリンパ管変化を認めることが多いという知見をもとに、癌細胞を用いた観察の前段階として炎症時のリンパ管変化に注目して観察した。

マウスの腹腔に催炎剤チオグリコレートを投与すると、横隔膜 Stomata が開大することが横隔膜 whole mount の免染および走査電顕の観察により明らかになった。



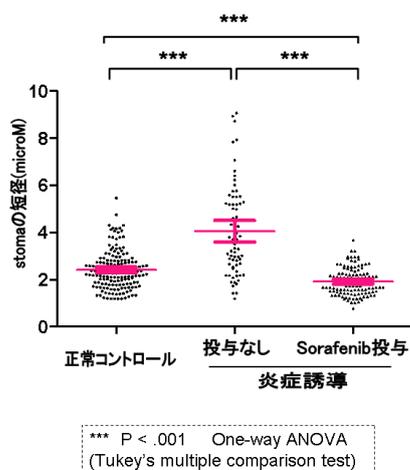
非炎症時の Stomata



炎症時の Stomata の開大

また時間経過を追って観察したところ、Stomata 開大は催炎剤投与開始直後ではなく、少なくとも3日目以降に起きており、また複数の Stomata が融合して大きなリンパ開口部を形成していることが示唆された。

Stomata 開大のメカニズムを解明するために、マルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブを投与してみると、炎症時の Stomata 開大が非炎症時レベルまで抑制された。



一方、Stomata 開大と癌細胞の転移については明確な関係が得ることができなかった。

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3件)

- ①Harada K, Yamazaki T, Iwata C, Y oshimatsu Y, Sase H, Mishima K, Morishita Y, Hirashima M, Oike Y, Suda T, Miura N, Watabe T, Miyazono K, Identification of targets of Prox1 during in vitro vascular differentiation from embryonic stem cells: functional roles of HoxD8 in lymphangiogenesis

Journal of Cell Science (2010) 112, 3923-3930, 査読有

- ②Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE, Pepper MS, Zawieja DC, Ran S. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1 Blood (2009), 115, 418-429, 査読有

- ③Oka M, Iwata C, Suzuki HI, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T, Komuro A, Kano MR, Miyazono K. Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis Blood (2008), 111, 4571-4579, 査読有

[学会発表] (計1件)

- ①Iwata C, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K. Microstructural change of lymphatic endothelial cells in metastatic lymph node (Poster) 第68回日本癌学会学術総会(横浜) 2009年10月1-3日

[その他]

ホームページ等

<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岩田 要 (IWATA CANAME)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50511391
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし