

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501018

研究課題名（和文） 可溶性 VEGF-C 受容体を用いたがん転移抑制の試み

研究課題名（英文） The evaluation of suppressive effects concerning tumor metastasis using soluble VEGF-C receptor

研究代表者

北里 英郎 (KITASATO HIDERO)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：90195256

研究成果の概要（和文）：

本研究は、可溶性 VEGF-C 受容体をレトロウイルスベクターによりマウス線維芽細胞あるいは、肺癌細胞に導入しリンパ管新生抑制効果を検討した。その結果、*in vitro*では、マウス線維芽細胞に十分な可溶性 VEGF-C 受容体が発現し、VEGF-C と強い結合性が免疫沈降反応により確認された。また、*in vivo*においては、肺癌細胞に導入した結果、原発巣において有意にリンパ管新生を抑制することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

The suppressive effects of lymphangiogenesis using mouse soluble vascular endothelial growth factor (VEGF)-C receptor (sVegfr-2) cDNA introduced mouse embryonic fibroblast cells (C57-sVegfr-2) and Lweis lung carcinoma cells (LLC-sVegfr-2) were evaluated. The production of sVegfr-2 and strong binding effect with VEGF-C in the supernatant of C57-sVegfr-2 were verified *in vitro* by Western blotting and immune -precipitation, respectively. The lymphangiogenesis was significantly reduced in primary lesion, followed by inoculation of LLC-sVegfr-2 into C57 mice, *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

血管・リンパ管新生の異常は、動脈硬化、癌、リンパ管腫、関節リウマチ、加齢黄斑変性症、がん転移に関係があると考えられている。VEGF-C は、リンパ管新生因子として同定され、がん転移に関しては既存のリンパ管内皮細

胞に発現する受容体の VEGF-R3 に作用して、腫瘍の周囲、内部に拡大・増殖したいわゆる腫瘍リンパ管を新生させる。この腫瘍リンパ管新生によりがん細胞は、リンパ管内に侵入し易くなり、さらにリンパ節内にリンパ管を

新生・増殖させ、最終的な遠隔転移に繋がると考えられている。実際に、胃癌、大腸癌、肺癌、前立腺癌などで、VEGF-C の発現と転移が関連していることや、VEGF-C 高発現細胞株では転移能が亢進していることから、抗 VEGF-C 抗体によるリンパ管新生やリンパ管転移を抑制されることが報告されている (Cancer Sci, 95:328-33, 2004)。しかしながら、VEGF-C は、VEGF-A、-D とともに受容体 R2 (VEGF-R2) を介して、血管発生・新生、透過性、DNA 合成、細胞遊走に関するシグナルを生体に伝達していることから、特異的なリンパ管新生に関する抑制因子が検索されてきた。近年、新たな特異的 VEGF-C 抑制因子であるとして報告された可溶性リンパ管新生因子受容体 (sVegfr-2) は、発生過程や修飾過程における血管新生を抑制することなく、リンパ管新生を抑制する極めて重要な因子であると考えられる (Nature Medicine, 15 (9), 1023-30, 2009)。

2. 研究の目的

血管新生およびリンパ管新生の異常は、癌、腫瘍転移との因果関係が示唆されている。本研究は、可溶性のリンパ管新生因子受容体 (sVegfr-2) をレトロウイルスベクターによりマウス線維芽細胞に導入し、*in vitro* における VEGF-C 結合性を確認する。また、マウス肺癌細胞に導入し、原発巣にて高発現させ、*in vivo* におけるリンパ管新生抑制や、転移に関する作用機序を考察する。

3. 研究の方法

(1) マウス可溶性 VEGF-C 受容体

(sVegfr-2) 産生細胞の作製

マウス胎児由来線維芽細胞 (C57) 及びマウス肺癌由来細胞 (LLC) に sVegfr-2 をレトロウイルスベクターにより導入した (C57-sVegfr-2, LLC-sVegfr-2)。対照として

は、レトロウイルスだけを導入した、C57-EV あるいは LLC-EV、また、陽性コントロールとしてマウス VEGF-C を導入した C57-VEGF-C を使用した。

(2) *In vitro* における C57-sVegfr-2 の解析

C57-sVegfr-2 の細胞上清中の sVegfr-2 蛋白の発現及びその VEGF-C との結合性をそれぞれウェスタンブロット及び免疫沈降法にて解析した。

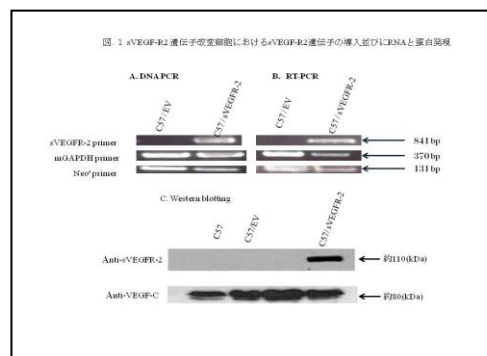
(3) *In vivo* における LLC-sVegfr-2 によるリンパ管新生抑制効果の検討

2x10⁶ 個の LLC-sVegfr-2 及び対照である LLC-EV をマウス皮下に移入し、10 日後に腫瘍組織を摘出し、病理学的解析並びに、リンパ管特異的染色 Lyve-1 抗体による免疫染色により、リンパ管新生抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) C57-sVegfr-2 の解析

① sVegfr-2 遺伝子とその転写物・蛋白の発現
C57-sVegfr-2 において導入されたマウス sVegfr-2 をそれぞれ PCR, RT-PCR, Western Blot

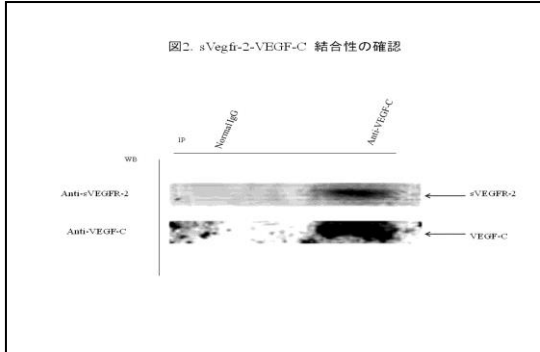


により確認した。その結果、特異的な 841bp のバンドと 110kD の蛋白を特異的に C57-sVegfr-2 において確認した (図 1)。

②免疫沈降反応による sVegfr-2 と VEGF-C の結合性

C57-sVegfr-2 と C57-VEGF-C の培養上清を同量混合した後に、プロテイン G ビーズ並びに

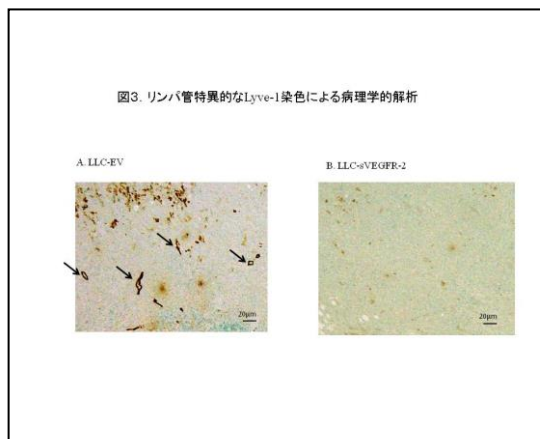
抗 VEGF-C 抗体を用いて免疫沈降反応を行った。陰性コントロールとしては、抗 Mouse IgG Agarose を用いて Normal IgG とした。この沈降物を抗 sVegfr-2 抗体並びに抗 sVEGF-C 抗体を用いて Western Blot を行った (図 2)。



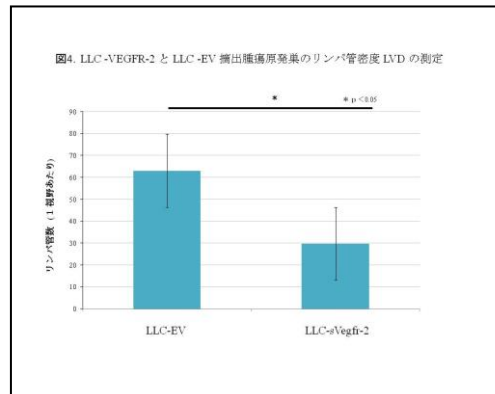
その結果、抗 VEGF-C 抗体を用いて沈降した際に、抗 sVegfr-2 抗体並びに抗 VEGF-C 抗体でバンドが確認され、sVegfr-2 と VEGF-C の結合性が確認された。

(2) *In vivo*における LLC-sVegfr-2 によるリンパ管新生抑制効果の検討

C57 マウス背部にスポンジを移入した血管・リンパ管新生モデルに C57-sVegfr-2, C57-EV 及び C57-VEGF-C を移入し、細胞治療による評価を行ったが、スポンジによるバックグラウンドが高く、適切な評価が得られなかったため、マウス肺癌細胞に sVegfr-2 を導入した LLC-sVegfr-2 及び LLC-EV を用いて、細胞移入後、10 日後にそれぞれの原発巣を摘出し、病理学的解析によるリンパ管新生抑制効果を検討した (図 3)。



その結果、矢印に示す新生リンパ管は、減少していた。さらに、摘出した組織切片から無作為に 6 視野を強拡大で観察し、1 視野あたりのリンパ管数 LVD (lymph vessel density) を算定し対照と比較した。その結果、LLC-EV 移植群では 63.1 個 / 視野であったのに対し、LLC-sVEGFR-2 移植群では 29.8 個 / 視野と有意に減少していた (図 4)。



一方、新生血管を特異的に染色する抗 CD31 抗体を用いた免疫染色の結果では、LLC-EV 及び LLC-sVegfr-2 移植群間で有意な差は見られなかった。

(3) 得られた成果とインパクト

レトロウイルスベクターを用いて作製した C57-sVegfr-2 を用いた *in vitro* の解析により sVegfr-2 の強い発現と VEGF-C との結合性が確認された。また、LLC-sVegfr-2 を用いた *in vivo* の解析により腫瘍の原発巣において、血管新生を抑制せずに、リンパ管新生を特異的に抑制することが判明した。本研究は、sVegfr-2 が特異的に VEGF-C を結合させリンパ管新生を特異的に抑制する独創性の高い研究であると第 33 回日本炎症再生医学会において高く評価された (学会③)。

(4) 今後の展望

原発巣における VEGF-C の発現低下を今後、免疫染色法などを用いて検討する。また、転移に関する遺伝子の一つである MMP-9 を中心に原発巣において解析し、他の細胞骨格遺伝子群や転移に関する原癌遺伝子 (Rho など) との関連も含めて網羅的に解析を行う。原発巣におけるリンパ管新生抑制が、転移巣である肺への転移にどのように影響するかを現在検討中である。

(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 Nakamura M, Tsumura H, Satoh T, Matsumoto K, Maruyama H, Majima M, Kitasato H. Tumor apoptosis in prostate cancer by PGD(2) and its metabolite 15d-PGJ(2) in murine model. Biomed Pharmacother, 査読有, Feb;67(1), 2013, 66-71.
DOI: 10.1016/j.biopha.2012.10.012.
Epub 2012 Nov 19.
- ② Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Suzuki T, Ogawa F, Iyoda A, Satoh Y, Kao S, Nakamura M, Kitasato H, Narumiya S, Majima M. Thromboxane A(2) receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. Cancer Sci., 査読有, 2011.
DOI : 10.1111/j.1349-7006.2012.02200.x.
- ③ Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunobiology, 査読有, 216巻 (7), 2011, 811-820.
- ④ Imoto A, Okada M, Okazaki T, Kitasato H, Harigae H, Takahashi S. Metallothionein-1 isoform and vimentin are direct PU.1 downstream target genes in leukemia cells, J Biol Chem, 査読有, 285巻, 2010, 10300-103009

[学会発表] (計 8 件)

- ① 奈良場惇哉、北里英郎、中村正樹：胎盤由来増殖因子 (Placental growth factor) 遺伝子改変細胞による細胞療法. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012. 7. 5、福岡
- ② 香川理紗、中村正樹、北里英郎：プロスタグランジン E2 遺伝子導入による腫瘍血管新生への影響. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012. 7. 6、福岡
- ③ 村上 麗、中村正樹、北里英郎：可溶性 VEGFR-2 を用いた癌転移細胞治療の試み. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012. 7. 5、福岡
- ④ 今井理実華、増茂愛海、中村正樹、北里英郎：VEGF-C 遺伝子導入によるリンパ管新生肺癌高転移モデルマウスの作成. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012. 7. 5、福岡
- ⑤ 中村正樹、松本和将、馬嶋正隆、北里英郎：プロスタグランジン遺伝子導入によるマウス前立腺癌 *in vivo* モデルにおけるアポトーシスの誘導. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012. 7. 5、福岡
- ⑥ 高橋諒多、中村正樹、北里英郎：マウス トロンボキサン合成酵素遺伝子導入細胞によるマウス血管新生モデルにおける血管新生作用機序の検討. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012. 7. 6、福岡
- ⑦ Hidero Kitasato, Takahiro Kakutani, Remi Inoue, Masaki Nakamura, Kazumasa Matsumoto, Izumi Hayashi, Masataka Majima. The Different Effect of Thromboxane (TX)A2 on the Angiogenesis in the Wound Healing and Cancer Animal Models. 10th World Congress on Inflammation. 2011.6.25, Paris, France
- ⑧ 丸茂雅哉、高橋諒多、奈良場惇哉、筑比地隆史、中村正樹、馬嶋正隆、北里英郎、抗腫瘍性プロスタグランジン遺伝子導入による肺癌転移モデルマウスに対する抗腫瘍効果の検討、第23回北里大学バイオサイエンスフォーラム (研究会)、2010. 8. 6、北里大学十和田キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北里 英郎 (KITASATO HIDERO)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：90195256

(2) 研究分担者

片桐 真人 (KATAGIRI MASATO)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：50152674

馬嶋 正隆 (MAJIMA MASATAKA)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641

松本 和将 (MATSUMOTO KAZUMASA)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70306603