

## 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 5 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590857

研究課題名（和文）

リンパ管新生関連遺伝子発現に基づく肺癌リンパ節転移の機序解析と診断、治療法の開発

研究課題名（英文）

Exploration of new therapy and diagnosis in lymph metastasis of lung cancer based on the profile of lymphangiogenic-related genes expression

研究代表者

今泉 和良 (Kazuyoshi Imaizumi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：50362257

研究成果の概要（和文）：

近年腫瘍微小環境(TM)の重要性への認識の高まりから、肺癌においても TM が上皮間葉系移行 (EMT)の悪性表現型獲得を誘導してリンパ節転移をもたらすと考えられている。本研究により、肺癌組織は遷延化低酸素状態にあることを確認するとともに、遷延化低酸素状態により安定化発現する低酸素誘導因子 HIF1 $\alpha$ が確認された。ドキシサイクリン(Dox)誘導安定化 HIF1 $\alpha$ 発現によって肺癌細胞でリンパ管新生に重要な役割を果たすとされる VEGF の有意な上昇を確認できた。センチネルリンパ節での VEGF 受容体発現が亢進している知見と合わせて、腫瘍の低酸素状態を標的とした治療戦略は EMT 制御に加えて、肺癌のリンパ節転移制御にも有効であるという認識に至った。

研究成果の概要（英文）：

Based on our recognition for the importance of tumor microenvironment(TM), TM induces acquisition of malignant phenotype such as epithelial-mesenchymal transition (EMT), resulting in metastasis into lymph nodes. In this study, persistent tissue hypoxia might be involved in tumor tissue in an *in vivo* orthotopic intrapulmonary implantation model. Persistent hypoxia also induced the stabilized HIF1 $\alpha$  expression in lung cancer cells. Transduction of HIF1 $\alpha$  into lung cancers with the Doxycycline inducible gene expression system caused de novo VEGF-A expression. Taken together with the evidence of increasing VEGF receptor expression lymphatic endothelial cells in sentinel lymph nodes, hypoxia as TM in lung cancers might be a therapeutic target for the metastasis into lymph nodes and lymphangiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌の治療方針の決定、治療成績向上においてリンパ節転移を正確に診断し制御することは必須の課題であるが、近年の画像診断の発達によって肺門および縦隔リンパ節転移の診断は進歩を遂げたものの、転移の有無を正確に診断する事は未だ容易ではない。

癌のリンパ節転移における分子生物学的研究の中で、癌転移におけるリンパ管新生に関与する遺伝子群の役割が注目されている。癌転移におけるリンパ管新生に関与する遺伝子群の多くはリンパ管内皮細胞に発現する受容体である。腫瘍細胞はこれらの受容体群に対してさまざまな増殖因子を発現させることによりリンパ管新生を促し、自らのリンパ流路への転移を有利にしていると考えられる。特に sentinel リンパ節では腫瘍細胞の進展に先立ってリンパ管新生が増強されている事実が示された。

### 2. 研究の目的

- 1) ヒト肺癌手術症例において、廓清されたリンパ節組織および腫瘍組織でのリンパ管新生関連遺伝子群の発現を解析し病理所見と比較することでリンパ節転移に強く関連するリンパ管新生関連遺伝子を同定する。
- 2) マウス肺癌モデル(orthotopic intrapulmonary implantation model)を用いて転移リンパ節におけるリンパ管新生関連遺伝子群の発現を解析し、転移に関与するリンパ管新生関連遺伝子を同定する。
- 3) 同定した遺伝子発現の関与するリンパ管新生経路を利用できないように遺伝子ノックダウンを行った肺癌細胞株を樹立し、縦隔リンパ節転移の程度、リンパ管新生

の程度を野生株と比較することで、リンパ節転移阻害治療の可能性を検討する。

- 4) ヒト肺癌症例では超音波気管支鏡下リンパ節生検(EBUS-TBNA)の検体でこの遺伝子群の発現を解析するシステムを構築し、リンパ管新生関連遺伝子発現の違いによる転移判定を確立し、その感度、特異度を評価するとともに、手術症例および縦隔放射線療法をうける症例において、リンパ節局所再発の予測因子になり得るかを検討する。

これらにより遺伝子発現を利用したリンパ節転移の早期診断、予後推定の可能性を探索する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス肺癌モデル(orthotopic intrapulmonary implantation model)での微小環境としての低酸素状態の評価

研究分担者の橋本 直純は、ブレオマイシン(BLM)誘導肺線維症モデルを作成して、肺線維症病変が低酸素状態に陥っていることを低酸素反応物質である pimonidazole(PM)に対する免疫染色と低酸素状態で安定発現する hypoxia-inducible factor 1 (HIF1 $\alpha$ )に対する免疫染色により評価することにより、線維化病変に遷延化低酸素状態にあることを確認した(課題番号:21590987)。そこで、まずマウス肺癌モデルにおいて腫瘍病変内の微小環境としての低酸素状態の存在を評価した。

ヒト肺癌細胞株をヌードマウスに皮下接種を行い、腫瘍形成が確認された時点で腫瘍摘出90分前に低酸素反応物質であるPMを投与した。摘出腫瘍に対してPM検出染色をおこ

なったところ、PM に対する抗体を加えないコントロール染色においては pimonidazole を確認できなかった。一方、pimonidazole に対する抗体を加えた染色では腫瘍内に pimonidazole 強発現を確認できた (Figure 1)。

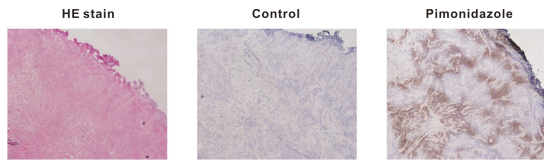


Figure1

(2) 微小環境としての低酸素状態におけるヒト肺癌肺癌細胞株のリンパ管新生関与遺伝子発現に対する検討

研究分担者の橋本 直純は、低酸素状態が肺上皮細胞株に与える影響を評価するために、遷延化低酸素暴露下で肺上皮細胞株を培養して、上皮間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal transition; EMT) 誘導を確認した (課題番号: 21590987)。そこで、肺上皮細胞株に対して、ドキシサイクリン (Dox) 誘導遺伝子発現システムを導入した。その細胞株に、通常酸素濃度下でも安定的に発現する 2 箇所のプロリンをアラニン置換した HIF-1 $\alpha$  dPA を導入した。低酸素状態に暴露した肺上皮細胞株、および、Dox 誘導 HIF-1 $\alpha$  dPA 発現肺上皮細胞株は HIF-1 $\alpha$  の誘導を示したが、Dox 誘導 GFP 発現肺上皮細胞株では HIF-1 $\alpha$  の誘導を示さなかった (Figure 2)。これらの細胞株でリンパ管新生関与遺伝子の中で重要と考えられるリンパ管内皮細胞に発現する受容体リガンドである、VEGF-A の発現を検討した。Dox 誘導 GFP 発現肺上皮細胞株では有意な VEGF-A の発現を認めなかったが、低酸素状態および Dox 誘導 HIF-1 $\alpha$  dPA 発現において、有意な VEGF-A の発現を認めた (Figure 3)。

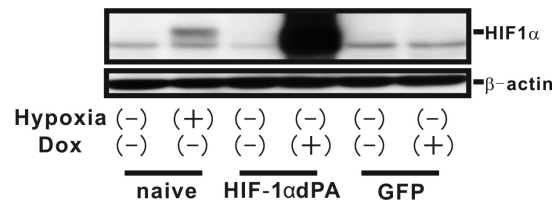


Figure2

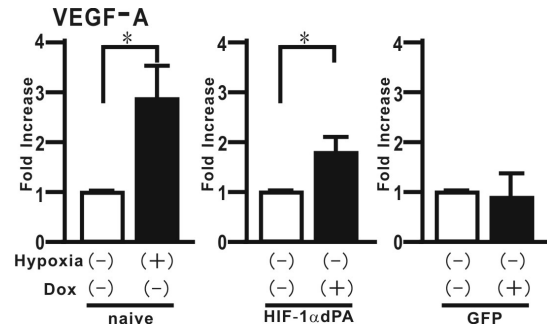


Figure3

(3) 微小環境としての低酸素状態がヒト肺癌肺癌細胞株の細胞遊走能に与える影響の評価

遷延化低酸素暴露下で肺上皮細胞株を培養して、細胞遊走能を評価した。肺癌細胞は遷延化低酸素刺激により定常酸素状態と比較して有意な細胞遊走亢進を認めた。また、低酸素状態で誘導される EMT 関連遺伝子である twist の安定発現細胞株ではコントロール株と比較して有意な細胞遊走能の亢進を認めた (Figure 4)。

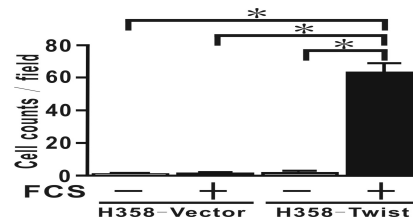


Figure4

#### 4. 研究成果

肺癌リンパ節転移の分子生物学的解析を、腫瘍内微小環境としての遷延化低酸素状態の役割という観点から検討した。腫瘍の増大およびそれに関連するリンパ節転移および血行性転移はしばしば腫瘍微小環境にともなう局所でのさまざまな因子によって決定付けられることが報告されている。低酸素刺激

が EMT を誘導するという報告と合わせて、肺癌腫瘍病変が低酸素化状態に陥っているかどうかを評価した。肺線維症の線維化病変が遷延化低酸素状態を示していることと合致した所見として肺癌腫瘍内においても遷延化低酸素状態が存在することが確認された。遷延化低酸素状態にさらされる肺癌細胞は EMT の表現型獲得とともに、細胞遊走能の亢進を示した。そうした細胞表現型を獲得した状況の細胞で低酸素刺激により安定化 HIF-1 $\alpha$  発現を示す生物学的意義を評価するために、通常酸素濃度下でも安定的に HIF-1 $\alpha$  を発現させる目的で 2 箇所のプロリンをアラニンに置換した HIF-1 $\alpha$  dPA を Dox 誘導型遺伝子発現させる細胞株を樹立した。Dox 誘導 HIF-1 $\alpha$  dPA では有意な VEGF-A の発現を示すことを確認した。センチネルリンパ節におけるリンパ管新生が増強されている事実と合わせて、組織微小環境である遷延化低酸素状態は肺癌細胞に EMT 細胞表現型を獲得させるとともに、VEGF-A の発現誘導をもたらし、リンパ管新生・増生を亢進して、リンパ節転移を誘導している可能性があるという認識に至った。以上の結果から、腫瘍微小環境を網羅的に制御する遺伝子に着目して新たな治療戦略の構築につなげ得る可能性が示唆された。

一方で、EBUS-TBNA による臨床例でのリンパ節病理組織での VEGF-A 発現の解析は検体が微少であることもあり安定した結果が得られなかったため、臨床像との相関の解析には至らなかった。今後、微少サンプルから鋭敏で定量的な EMT 関連遺伝子の発現を解析するシステムを考慮する必要がある。

##### 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)

1. Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration in older people.

Okachi S, Imai N, Imaizumi K, Hase T, Shindo Y, Sakamoto K, Aso H, Wakahara K, Hashimoto I, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y.

Geriatr Gerontol Int. 2013 in press doi: 10.1111/ggi.12043. 査読有

2. Detection of loci for allergic asthma using SMXA recombinant inbred strains of mice.

Ohno T, Okamoto M, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, Matsushima M, Nishimura M, Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T.

Immunogenetics. 2013 65(1):17-24.

査読有

3. An aqueous fraction of Sauropus androgynus might be responsible for bronchiolitis obliterans.

Hashimoto I, Imaizumi K, Hashimoto N, Furukawa H, Noda Y, Kawabe T, Honda T, Ogawa T, Matsuo M, Imai N, Ito S, Sato M, Kondo M, Shimokata K, Hasegawa Y.

Respirology. 2013 18(2): 340-347. 査読有

4. Febrile complications after endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for intra-pulmonary mass lesions of lung cancer-a series of 3 cases.

Oguri T, Imai N, Imaizumi K, Elshazley M, Hashimoto I, Hashimoto N, Hasegawa Y.

Respir Investig. 2012 50(4):162-165.

査読有

5. Non-Genomic Effects of Fluticasone Propionate and Budesonide on Human Airway Anion Secretion.

Mizutani T, Morise M, Ito Y, Hibino Y, Matsuno T, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Imaizumi K, Hasegawa Y.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2012

47(5): 645-51. 査読有

6. Differential modulation of surfactant protein D under acute and persistent hypoxia in acute lung injury.

Sakamoto K, [Hashimoto N](#), Kondoh Y, [Imaizumi K](#), Aoyama D, Kohnoh T, Kusunose M, Kimura M, Kawabe T, Taniguchi H, Hasegawa Y.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012 Jul;303(1):L43-53. 査読有

7. Interstitial pneumonia and nodular regenerative hyperplasia of the liver as initial manifestations of polyarteritis nodosa.

Tanaka I, [Imaizumi K](#), Hashimoto I, Asai N, Yokoi T, Matsuno T, Hasegawa Y.

Intern Med. 2012;51(6):635-8. 査読有

8. Inspiratory capacity as a preoperative assessment of patients undergoing thoracic surgery.

Matsuo M, [Hashimoto N](#), Usami N, [Imaizumi K](#), Wakai K, Kawabe T, Yokoi K, Hasegawa Y.

Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2012 May;14(5):560-4. 査読有

9. Three Cases of Bronchial Asthma Preceding IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis.

Ito S, Ko SB, Morioka M, [Imaizumi K](#), Kondo M, Mizuno N, Hasegawa Y.

Allergol Int. 2012.61(1):171-174. 査読有

10. Mesenchymal Stem Cells Stably Transduced with a Dominant-Negative Inhibitor of CCL2 Greatly Attenuate Bleomycin-Induced Lung Damage.

Saito S, Nakayama T, [Hashimoto N](#), Miyata Y, Egashira K, Nakao N, Nishiwaki S, Hasegawa M, Hasegawa Y, Naoe T.

Am J Pathol. 2011 179(3):1088-94. 査読有

11. Quercetin protects against pulmonary oxidant stress via heme oxygenase-1 induction in lung epithelial cells.

Hayashi Y, Matsushima M, Nakamura T, Shibasaki M, [Hashimoto N](#), [Imaizumi K](#), Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 417 (1); 169-174. 査読有

12. Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells.

Nakashima H, [Hashimoto N](#), Aoyama D, Kohnoh T, Sakamoto K, Kusunose M, [Imaizumi K](#), Takeyama Y, Sato M, Kawabe T, Hasegawa Y.

Mol Carcinog. 2011 51(5) 400-410. 査読有

13. Acute exacerbation of IPF following diagnostic bronchoalveolar lavage procedures.

Sakamoto K, Taniguchi H, Kondoh Y, Wakai K, Kimura T, Kataoka K, [Hashimoto N](#), Nishiyama O, Hasegawa Y.

Respir Med. 2012 106(3):436-42. 査読有

14. Capsaicinoids regulate airway anion transporters through Rho kinase- and cAMP-dependent mechanisms

Hibino Y, Morise M, Ito Y, Mizutani T, Matsuno T, Ito S, [Hashimoto N](#), [Sato M](#), Kondo M, [Imaizumi K](#), and Hasegawa Y

Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 45(4):684-91. 査読有

15. Attenuation of TGF- $\alpha$ -Stimulated Collagen Production in Fibroblasts by Quercetin-Induced HO-1.

Nakamura T, Matsushima M, Hayashi Y, Shibasaki M, [Imaizumi K](#), [Hashimoto N](#), Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 44(5):

614-20. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 和良 ( Kazuyoshi Imaizumi )

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号 : 50362257

(2) 研究分担者

佐藤 光夫 ( Mitsuo Sato )

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号 : 70467281

(3) 研究分担者

橋本 直純 ( Naozumi Hashimoto )

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 30378020