

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659098

研究課題名(和文) 消化器癌転移時のセンチネルリンパ節微小環境変化を可視化評価するための基礎研究

研究課題名(英文) Development of imaging changes in microenvironment within the sentinel lymph node combined with micrometastasis of carcinoma cells

研究代表者

大橋 俊夫 (OHASHI, Toshio)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80020832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床応用も行われているセンチネルリンパ節理論であるが、癌転移巣の形成に関しては癌細胞の特性の研究は多く行われているものの、その受け皿であるリンパ節内の環境が変化するという視点からの研究はほぼ皆無であった。本研究課題の遂行により、リンパ節の内部環境を変化させるような要因がリンパの流れや癌細胞から分泌されるケモカインであることが確認できた。この事実をもとに、リンパ節の環境変化を察知することが癌細胞のリンパ節内転移の早期診断につながるという観点からの基盤研究をさらに進めることが、臨床応用を行う上での今後の課題と考える。

研究成果の概要(英文)：Metastasis of carcinoma cells mainly occurs through the lymphatic system, and the extent of metastasis in lymph nodes is clinically used as a useful prognostic indication. The clinical importance of SLN has been proven in many breast cancer patients. However, the biological and histological properties of lymphatic endothelial cells (LEC) in the SLN that interact with micrometastatic carcinoma cells remain unclear. Therefore, using the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231, we have attempted to examine the effects of supernatants cultured with the cell line on the expression of adhesion molecules on human LEC and then to investigate whether the expressed adhesion molecules accelerate the attachment of carcinoma cells to the LEC. The experimental findings suggest that MDA-MB-231 may release or leak ATP, which produces the overexpression of ICAM-1 on human LEC through activation of purinergic receptors and then facilitates ICAM-1-mediated attachment of carcinoma cells to the LEC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：病態生理 センチネルリンパ節 微小環境 癌転移

1. 研究開始当初の背景

- リンパ行性微小癌転移の成立に関する病態生理学研究 -

私共は最近、センチネルリンパ節に到達した癌細胞が多量の ATP を放出し、リンパ管内皮細胞に接着因子の ICAM-1 の発現を誘導し、微小癌転移を成立させる環境をリンパ節内に作り上げていることを証明した (Kawai et al., *AJP*, 2008; *Cancer Sci.*, 2009)。本研究では、この研究を発展させ、センチネルリンパ節における微小癌転移を成立させる生物学的特性を体系的に解明することを目的にこの挑戦的萌芽研究を企画立案した。

2. 研究の目的

(1) リンパ行性転移を起こしやすい腫瘍細胞株を用いて、センチネルリンパ節内リンパ管内皮細胞に発現する接着因子の特性と腫瘍細胞との相互作用を分子生物学的手法 (遺伝子チップ法や RT-PCR 法など) を用いて解析し、センチネルリンパ節における微小癌転移を同定することのできる分子プロファイルを体系的に解析する。

(2) 腫瘍細胞の組織間隙移動様式とセンチネルリンパ節への到達特性を *in vivo* の生体顕微鏡実験で解析し、センチネルリンパ節への癌細胞の到達に及ぼすリンパ管系の形態学的ならびに機能的特性と腫瘍組織由来物質の生物学的役割を体系的に解明する。

3. 研究の方法

(1) センチネルリンパ節における微小癌転移の成立時にリンパ管内皮細胞に発現する細胞接着因子の解明と腫瘍細胞との相互作用に関する研究を分子生物学・分子遺伝学的手法を用いて実施する。

(2) 腫瘍細胞のセンチネルリンパ節への到達に影響を及ぼす機能・形態学的特性を *in vivo* 生体顕微鏡法を用いて解析する。

4. 研究成果

私共はセンチネルリンパ節理論を生理学的視点から考え直してみると、癌の原発巣から最も多量のリンパ液が流れ込んでいるリンパ節と言い換えることができる、との仮説を提唱してきた。その証明のために、本研究課題ではラット・マウスの小動物からミニブタの大動物を用いた *in vivo* 実験を行い、多角的かつ網羅的に解析を行った。すなわち、(1) ラット尾部に、流れ刺激によってリンパ管内皮細胞から分泌されるのと同濃度の ATP を外因的に投与し、リンパ節内のリンパ管内皮細胞表面の細胞接着分子 ICAM-1 の発現が亢進することを発見した。(2) ケモカインの一種である CCL2 で培養リンパ管内皮細胞を刺激することによっても、リンパ管内皮細胞

表面の ICAM-1 の発現亢進が認められた。(3) 発現が亢進した ICAM-1 を用いて培養乳癌細胞がリンパ管内皮細胞と接着しやすくなることも確認した。

本研究課題の遂行により、リンパ節の内部環境を変化させるような要因がリンパの流れや癌細胞から分泌されるケモカインであることが確認できた。この事実をもとに、リンパ節の環境変化を察知することが癌細胞のリンパ節内転移の早期診断につながる基盤研究を進めることが更なる課題と考える。

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12件)

1) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Cell surface F1/F0 ATP synthase contributes to interstitial flow-mediated development of the acidic microenvironment in tumor tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305: C1139-C1150, 2013, 査読有

2) Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, Yang X, Jensen L, Lim S, Feng N, Xue Y, Li X, Larsson O, Ohhashi T, Cao Y. Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat. Comm.* 4, article number: 2129, 2013, 査読有

3) Bridenbaugh EA, Nizamutdinova IT, Jupiter D, Nagai T, Thangaswamy S, Chatterjee V, Gashev AA. Lymphatic muscle cells in mesenteric lymphatic vessels of various ages. *Lymphat. Res. Biol.* 11: 35-42, 2013, 査読有

4) 大橋俊夫 日本発汗学会 20 年のあゆみと将来展望 - 自らの手掌部発汗研究のあゆみと照らし合わせて - 発汗学 20(1): 2-11, 2013, 査読有

5) 河合佳子 ずり応力刺激による脈管内皮細胞機能の制御機構 (総説) 信州医学雑誌 61(2): 45-56, 2013, 査読有

6) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管の解剖・生理学の最近のトピックス *Angiology Frontier* 12(2): 91-96, 2013, 査読有

7) Kawai Y, Yoshida K, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Shear stress-mediated F1/F0 ATP synthase-dependent CO₂ gas excretion

from human pulmonary arteriolar endothelial cells. J. Cell. Physiol. 227(5): 2059-2068 2012, 査読有

8) Ohhashi T. The establishment of new lymphology: Overview. Ann. Vasc. Dis. 5: 247-248, 2012, 査読有

9) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Pivotal roles of shear stress in the microenvironmental changes that occur within sentinel lymph nodes. Cancer Sci. 103(7): 1245-1252, 2012, 査読有

10) Ikomi F, Kawai Y, Ohhashi T. Recent advance in lymph dynamic analysis in lymphatics and lymph nodes. Ann. Vasc. Dis. 5: 258-268, 2012, 査読有

11) Kawai Y, Ohhashi T. Current topics of immunohistochemical and biological properties of human lymphatic endothelial cells. Ann. Vasc. Dis. 5: 269-274, 2012, 査読有

12) 河合佳子, 大橋俊夫 リンパ管内皮細胞の機能についての新知見 リンパ学 35(1): 18-19, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計 1 1 件)

1) 河合佳子 流れ刺激による肺の炭酸ガス排出機構における新しい概念 日本学術会議中部地区講演会 (松本:2013年7月12日)

2) 河合佳子, 大橋俊夫 肺での炭酸ガス発生における流れ刺激の役割: 新呼吸概念の提言 第14回関東心・血管フォーラム (東京: 2013年6月1日)

3) 河合佳子 リンパ管やリンパ節の生理・病態生理学的役割におけるリンパの流れの意義について 第14回リンパ微小循環研究会 特別講演 (大分: 2012年11月7日)

4) 大橋俊夫 日本発汗学会20年のあゆみと将来展望 - 自らの手掌部発汗研究のあゆみと照らし合わせて - 第20回日本発汗学会総会 特別講演 (奈良: 2012年8月24, 25日)

5) 大橋俊夫 リンパ浮腫の外科治療に関連したリンパ動態学の基礎知識 第47回日本形成外科学会中部支部学術集会 特別講演 (松本: 2012年7月7日)

6) 河合佳子, 大橋俊夫 流れ刺激によるリンパ管内皮細胞の特性変化とセンチネルリンパ節環境変化に関する研究 第36回日本

リンパ学会総会 シンポジウム (東京: 2012年6月28-30日)

7) 大橋俊夫 私の研究の歩みとその根底に流れる研究哲学 - そこから見た循環器病学の将来展望 - 第60回循環力学研究会 記念講演 (東京: 2012年5月26日)

8) 河合佳子 260gの偉大な臓器: 腎臓 - 体重の1/200の臓器に1/4の血液が流れている理由 - 第89回日本生理学会大会 日本生理学会教育委員会シンポジウム: 生理学モデル講義 (松本: 2012年3月29-31日)

9) 河合佳子, 安嶋久美子, 大橋俊夫 超音波造影剤ソナゾイドによるリンパ節の可視化とその臨床応用 第89回日本生理学会大会 日本リンパ学会連携シンポジウム (松本: 2012年3月29-31日)

10) 大橋俊夫 物理的因子(流れと圧力)と血管の働きとの関係について 第25回日本老年脳神経外科学会 教育講演 (松本: 2012年3月16日)

11) 河合佳子, 大橋俊夫 VEGF-Cを介する集合リンパ管の再疎通現象について 第85回日本薬理学会年会 シンポジウム (京都: 2012年3月13, 14日)

〔図書〕(計 1 0 件)

1) 大橋俊夫 第8章 血液, 第9章 循環, 分担執筆 標準生理学 第8版, 編集委員, 医学書院, 東京, p.502-666 (2013年)

2) 大橋俊夫, 佐藤佳代子 リンパマッサージ健康法 PHP 研究所, 東京 (2013年), p.12-109

3) 大橋俊夫 「診療指針」作成の意義 リンパ浮腫診断治療方針2013(リンパ浮腫療法士認定機構編)メディカルトリビューン社, 東京, p.iii (2013年)

4) 河合佳子, 大橋俊夫 リンパ管の生理 リンパ浮腫診断治療方針2013(リンパ浮腫療法士認定機構編)メディカルトリビューン社, 東京, p.9-10 (2013年)

5) 大橋俊夫 「美と健康の要 リンパと血流大研究」日経ヘルス 日経 BP 社, 東京, p.47-49 (2013年)

6) 河合佳子 流れ刺激による肺の炭酸ガス排出機構における新しい概念 日本学術会議中部地区会議ニュース No. 135 p. 6-7 (2013年)

7) 大橋俊夫 リンパの誤解 Health & Beauty Review5月号, 東京, p.65-69 (2012年)

8) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管の生理原発性リンパ浮腫診断治療指針(笹嶋唯博編), メディカルトリビューン社, 東京, p.8-10 (2012年)

9) 大橋俊夫 名医のセカンドオピニオン週刊朝日増刊号 新「名医」最新治療 2013, 朝日新聞出版, 東京, p.82-83 (2012年)

10) 大橋俊夫、河合佳子 集合リンパ管の再生とリンパ流の効果 生体の科学, 金原一郎記念医学医療新興財団, 東京, 生体の科学 63(6): 577-583 (2012年)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋 俊夫 (OHHASHI, Toshio)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 80020832

(2)研究分担者

河合 佳子 (KAWAI, Yoshiko)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 10362112

永井 崇 (NAGAI, Takashi)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 50514353

安嶋 久美子 (AJIMA, Kumiko)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 70584051

(3)連携研究者

なし