

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293257

研究課題名(和文)薬剤送達に対するリンパ管の役割：転写因子FOXC2に着目したリンパ管機能解析

研究課題名(英文)A potential role of lymphatic vessels in drug delivery system

研究代表者

平川 聡史(Hirakawa, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50419511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌微小環境におけるリンパ管の機能を、薬物送達に関わる重要な因子の一つとして解明することに取り組んだ。癌血管新生について、そのプロセスが多様な細胞によって組織されることが明らかになる一方、癌リンパ管新生のプロセスについては、いまだ不明な点が多い。本研究では、癌組織を始めとする病的リンパ管新生の生物学的意義を解明すべく、血管内投与した物質の送達を可視化すべく観測した。具体的には、表皮特異的VEGF-Aトランスジェニック・マウス及びFOXC2^{+/-}マウスを用いて、病的リンパ管の機能解析を行い、リンパ管の新たな機能評価系を構築すべく取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Tumor lymphangiogenesis is promoted by stepwise process although it has not been fully elucidated. Among tumor microenvironment, tumor-associated angiogenesis has been well characterized. Furthermore, it is well understood that vascular system plays a key role in drug delivery during chemotherapy. Therefore, in the present study, we aimed to show a significant role of lymphatic vessels in drug delivery as well as clearance during the therapy. Lymphatic vessels show persistent enlargement during inflammation, leading to reduced draining function. Furthermore, tumor-associated lymphatic vessels are known to show the reduction of flow in tumor progression. Here we subjected transgenic mice which express green fluorescent protein under the Prox1 promoter which is specifically activated in lymphatic endothelial cells, and successfully found that fluorescence-labeled dextran was absorbed by the lymphatic capillary vessels.

研究分野：皮膚科学

キーワード：がん細胞 リンパ管新生 生理学 炎症 遺伝子改変モデル

1. 研究開始当初の背景

1 - 1. 癌組織における薬物送達の重要性

癌は、本邦の疾病における死因の第1位を占める。皮膚癌を始め、癌治療の基盤研究は喫緊の課題であり、その課題の解決は、広く国民から求められている。進行癌において、その主たる治療は化学療法である。化学療法の治療効果は、一般的には薬剤の血中濃度が指標である。そして、より本質的には薬物が病変部まで送達されることであり、組織間質液が効率良くクリアランスされる必要がある。この役割を担うのが血管とリンパ管である。従って、癌組織における血管とリンパ管の構造と機能を理解することは、極めて重要である。

1 - 2. 癌血管新生：EPR 効果と壁細胞

癌微小環境では、腫瘍細胞の増殖と共に、血管及びリンパ管が新生する。新生した血管・リンパ管は、概して未熟で無秩序な構造である。従って、その機能も不明な点が多い。

癌微小環境は、細胞増殖や免疫担当細胞の浸潤に伴い、多様な増殖因子やサイトカインが産生される。腫瘍血管を構成する細胞は、血管内皮細胞と壁細胞である。腫瘍を始めとする上皮系細胞は、vascular endothelial growth factor (VEGF)-A を始めとする血管新生因子を産生する。VEGF-A は、内皮細胞の増殖を誘導すると共に、著しい血管透過性作用を持つ。この結果、癌微小環境では血管新生が亢進し、腫瘍血管は病的漏出を伴うことがある。実際、腫瘍血管は構造が未熟で有窓し、100 nm 前後のナノ粒子は血管外に漏出することが知られている。

腫瘍血管は、遠隔転移の経路になる一方、抗癌剤が送達される流路である。腫瘍血管の過剰な漏出性は、癌組織で薬剤濃度を高める作用がある。この効果を enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)と呼ぶ(Matsumura et al. *Cancer Res*

1986)。EPR 効果は、ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)の根幹を成す。

一方、癌間質を形成する細胞群は、transforming growth factor (TGF)- β を産生し、腫瘍血管に作用する。線維芽細胞が産生する TGF- β は壁細胞に作用し、細胞増殖を促す。さらに、腫瘍血管内皮細胞は platelet-derived growth factor を産生し、壁細胞の遊走を促す。この結果、間質形成が優位な腫瘍では、腫瘍血管は壁細胞に覆われ、癌組織への薬剤送達は阻まれる。従って、薬剤の送達は、癌細胞と間質によって形成される腫瘍血管の特性を見極め、多面的に検討しなければならない。

1 - 3. 癌リンパ管新生と薬剤クリアランス

皮膚悪性黒色種を始め、皮膚癌はリンパ管新生を伴う場合がある(Hirakawa et al. *J Exp Med* 2005; *Am J Pathol* 2009)。新生リンパ管は、センチネルリンパ節への転移経路になり、患者予後と負の相関を示す(Hirakawa et al. *Cancer Sci* 2009)。従って、リンパ管新生は極めて重要な生物像である。リンパ管は、組織液を吸収・運搬する働きがある。従って、腫瘍リンパ管は、抗癌剤の組織内貯留やクリアランスに関わる重要な因子である。腫瘍リンパ管の機能は、血管と同様、内皮細胞と壁細胞の特性に基づく。本研究に先立ち、ケラチン 14 プロモーターを用いて、表皮特異的に VEGF-A を産生するトランスジェニック・マウス(K14-VEGF-A TG)を用いて、リンパ管の病的変化を解析した。この VEGF-A 過剰発現モデルは、血管新生と共にリンパ管新生を来す。さらに K14-VEGF-A TG のリンパ管は、内皮細胞間が有窓化し、組織液が漏出することが推察された。このリンパ管ではリンパ流がうっ滞しており、組織液のクリアランスが低下している(Huggenberger et al. *J Exp Med* 2010)。従って、K14-VEGF-A TG から得た知見は、癌

微小環境におけるリンパ管機能を解明する上で極めて重要なものであり、癌化学療法の薬剤送達に関するモデルの一つである。

1 - 4 . FOXC2 とリンパ管：壁細胞の制御因子

FOXC2 はフォークヘッド遺伝子の 1 つであり、リンパ管形成を司る転写因子である。FOXC2 の突然変異は、先天性リンパ浮腫の 1 型である Lymphedema-distichiasis 症候群の原因である。Lymphedema-distichiasis 症候群は、常染色体性優性遺伝を示す。本遺伝子は三浦直行博士（浜松医大）により単離・同定された(Miura et al. *Genomics* 1997)。さらに、三浦らは FOXC2 ノックアウトマウスを作成し、リンパ浮腫の原因が毛細リンパ管の異常にあることを突き止めた(Petrova et al. *Nature Med* 2004)。

正常な皮膚リンパ管は、起始部リンパ管と集合リンパ管から成る。起始部リンパ管は盲端に始まり、リンパ管内皮細胞のみで構成され、壁細胞はない。このため、組織液を効率良く吸収することが出来る。一方、集合リンパ管には壁細胞が付着し、弁が形成される。この構造は、リンパ流を生み出し、効率良い運搬に役立つ。

FOXC2 ノックアウトマウスの研究から、FOXC2 は壁細胞に作用し、起始部リンパ管への凝集を抑制していることが明らかとなった。FOXC2 が発現低下すると、起始部リンパ管に壁細胞が凝集し、組織液の吸収が阻害される。この結果、FOXC2 ノックアウトマウス及び患者はリンパ浮腫に陥る。

癌微小環境において、新生血管には壁細胞が凝集することが知られている。しかし、新生リンパ管に壁細胞が凝集するかどうか、未だ全く知見がない。則ち、腫瘍リンパ管のクリアランスを評価するためには、リンパ管内皮細胞と壁細胞の局在と機能を詳細に検討する必要がある。さらに、癌組織における DDS

について、腫瘍リンパ管の機能を評価し、リンパ管内皮細胞と壁細胞の役割を明らかにすることもまた重要である。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、癌微小環境におけるリンパ管が、薬物送達とクリアランスに関わる重要な因子の一つであることを解明することである。癌血管新生が、内皮細胞と壁細胞の病的変化を伴い多様な血管構築を示す一方、癌リンパ管新生の構造と機能は、いまだ不明な点が多い。本研究に先立ち、研究者は癌を始めとする病的リンパ管新生の生物学的意義を解明し、一貫して病的リンパ管の構造と機能の解明に取り組んできた。癌微小環境における薬物送達と薬物クリアランスに関する知見は、より有効な癌化学療法を創出する基盤になるものである。そこで、本研究では表皮特異的 VEGF-A トランスジェニック・マウス及び FOXC2 ノックアウトマウスを用いて、病的リンパ管の機能解析を行う。

3 . 研究の方法

3 - 1 . ヒト悪性腫瘍における腫瘍リンパ管評価

ヒト各臓器に生じる癌腫は、発生臓器により血管新生に差異があることが指摘されている(Kano MR et al. *Cancer Sci* 2009)。一般に、結腸癌で生じる腫瘍血管は、内皮細胞間に有窓があり、EPR 効果が現れやすい。この血管形成は、過剰な VEGF-A が一因であることが示唆された。従って、抗 VEGF-A 抗体(ベバシズマブ)は、当初本邦では転移性結腸癌の治療へ使用することが承認された。一方、膵臓癌やスキルス胃癌は、間質形成が優位である。このため、腫瘍血管には壁細胞が凝集し、EPR 効果に乏しい(Kano MR. *Adv Drug Deliv Rev* 2103)。腫瘍血管における内皮細胞と壁細胞の病的変化が、薬物送達に及ぼす影響が詳細に解析されている。しかし、ヒト悪

性腫瘍における腫瘍リンパ管の差異については、未だほとんど検討されていない。

そこで、本研究では大腸癌及び膵癌のヒト病理標本を、リンパ管特異的抗体（抗 LYVE-1 抗体）を用いて狩野光伸博士（岡山大学）と準備実験を行った。起始部リンパ管は、lymphatic endothelial vessel hyaluronan receptor (LYVE)-1 に対する抗体で、リンパ管内皮細胞を特異的に標識することが出来る。そこで、この抗体と壁細胞のマーカーである α -smooth muscle actin 抗体を用いて、若干数の病理組織標本に対して蛍光二重染色を行った。

3 - 2 . *FOXC2* ノックアウトマウスの表現型解析

FOXC2 ノックアウトマウスは、皮膚にリンパ浮腫を伴う。従って、*FOXC2* ノックアウトマウスは、起始部リンパ管に壁細胞が凝集しているため、組織液の吸収が低下している。本研究では、遅延型接触過敏症のモデルを用いて皮膚に炎症を惹起する。具体的には、1% Oxazolone を用いて、*FOXC2*^{+/-}マウスと野生型の腹部に感作する。5 日後、耳介部に 0.2% Oxazolone を塗布し、炎症を惹起する。その後、炎症の度合いを皮膚の厚さとして測定し、皮内にインドシアニンググリーンを注射することにより、プローブを用いてリンパ管を可視化する。

3 - 3 . ライブ・イメージング

リンパ管特異的に蛍光蛋白を発現するトランスジェニック・マウスに対して、異なる吸収波長の蛍光色素で標識されたデキストランを静脈内注射し、血行性に蛍光デキストランを組織に送達することにより、リンパ管に吸収される蛍光デキストランを蛍光レーザー顕微鏡で観察する。

4 . 研究成果

4 - 1 . ヒト悪性腫瘍における腫瘍リンパ管評価

膵臓癌の腫瘍リンパ管では、起始部リンパ管に壁細胞が凝集する傾向が見られた。一方、この病的変化は、大腸癌では見られないものであった。以上の結果は、膵癌の間質では腫瘍血管と同様、腫瘍リンパ管は壁細胞の凝集を伴う場合があり、吸収能が低下している可能性を示唆するものである。

一方、大腸癌組織における病的リンパ管新生を、LYVE-1 染色を用いて詳細に観察すると、リンパ管内皮細胞が互いに重ならない部位があることを見出した。この結果は、大腸癌間質では腫瘍リンパ管に有窓が生じている可能性を示すものであり、大腸癌の間質における VEGF-A の役割を示唆するものである。

4 - 2 . *FOXC2* ノックアウトマウスの表現型解析

FOXC2^{+/-}マウスに遅延型接触過敏症を惹起すると、野生型に比べて浮腫が増強し、かつ遷延した。この結果は、*FOXC2*^{+/-}マウスのリンパ管機能が低下していることを示唆していた。次に *FOXC2* の機能を明らかにするために、インドシアニンググリーンを用いてリンパ流を可視化した。この結果、*FOXC2*^{+/-}マウスのリンパ流は野生型と有意差がないものであり、さらなる検討が必要であることが明らかとなった。

そこで、本研究では *FOXC2* コンディショナル・ノックアウトマウスを用いて、*FOXC2* がリンパ流に及ぼす検討を行うべく研究計画を立てた。具体的には、Oxazolone を用いた遅延型接触過敏症に関して、研究実績のある FVB/N background へマウスを戻し交配することにより、マウスの評価系を構築した。

4 - 3 . ライブ・イメージング

リンパ管特異的に蛍光蛋白を発現するトランスジェニック・マウスに対して、蛍光デ

キストランを投与し、経時的にリンパ管を観察した。この結果、毛細リンパ管に蛍光デキストランが吸収され、リンパ流を可視化することが出来た。この成果は、血管から投与した薬物が組織内に送達され、リンパ管へ排出される可能性を裏付けるものであり、今後のリンパ管機能評価に対して役立つものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishida-Fukuda H, Araki R, Shudou M, Okazaki H, Tomono Y, Nakayama H, Fukuda S, Sakaue T, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Detmar M, Higashiyama S, Hirakawa S. Ectodomain Shedding of Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1 (LYVE-1) is induced by VEGF-A. *J Biol Chem.* 2016 May 13;291(20):10490-500.
doi:10.1074/jbc.M115.683201.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 平川聡史、松崎典弥、西口昭広、明石 満。積層化を用いた培養リンパ管内皮細胞の VEGF-C シグナル伝達。第 47 回日本結合組織学会学術大会。2015 年 5 月
2. 平川聡史。三次元培養：癌リンパ行性転移を評価する実験系の構築。第 38 回日本リンパ学会総会。2014 年 6 月。

〔図書〕(計 1 件)

1. Detmar M, Hirakawa S. Vascular Biology. Bologna JL, Schaffer JV, Cerroni L, eds. *Dermatology* 4th edition, Elsevier, pp1775-1785, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：血管透過性亢進抑制作用の評価方法

発明者：山内豊彦、平川聡史、山下 豊、戸倉新樹

権利者：浜松ホトニクス、浜松医科大学

種類：特許

番号：第 6057333 号

取得年月日：2016 年 12 月 16 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 聡史 (HIRAKAWA, Satoshi)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50419511

(2) 研究分担者

三浦 直行 (MIURA, Naoyuki)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：40165965

青戸 一司 (Aoto, Kazushi)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：60360476

小川 美香子 (Ogawa, Mikako)
北海道大学・薬学部・教授
研究者番号：20344351

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし