

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461990

研究課題名(和文) 胃癌リンパ節内の免疫寛容とリンパ管内皮細胞との相関及び転移予測マーカーの同定

研究課題名(英文) Association of lymphatic endothelial cells with immuno tolerance and identification of predictive marker of metastasis in gastric cancer

研究代表者

田中 浩明 (Tanaka, Hiroaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90382168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転移のないリンパ節と転移のあるリンパ節よりLECを分離し、それぞれNLEC、TLECと名付けた。TLECは繊維芽細胞のような紡錘形の形態であり、通常の内皮細胞と異なる形態を示しNLECと比較し高い増殖能・遊走能を有していた。TLECでは炎症性サイトカインや好中球遊走性因子の遺伝子発現が顕著に増加し、TLECの培養上清では血管・リンパ管新生因子であるVEGF-A, VEGF-Cの上昇がみられた。胃癌所属リンパ節内には正常のLECとは異なる性質をもった腫瘍関連LEC(TLEC)が存在する。TLECはリンパ節微小環境内で炎症性環境の形成やECMリモデリングにより腫瘍進展に与ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine whether tumor-specific LECs inhabit the tumor microenvironment and examine their influence on this microenvironment. We isolated normal LECs (NLECs) from a non-metastatic lymph node and tumor-associated LECs (TLECs) from cancerous lymph nodes. When compared to NLEC, TLECs had an abnormal shape, high proliferative and migratory abilities, and elevated expression of genes associated with inflammation, cell growth, and cell migration. NLECs co-cultured with gastric cancer cells from the OCUM12 cell line acquired TLEC-like phenotypes. Also, OCUM12 cells co-cultured with TLECs expressed high levels of genes responsible for metastasis. Our results demonstrated that LECs interacted with tumor cells and obtained abnormal phenotypes that could play important roles in tumor progression

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

根治切除可能な胃癌に対して本邦で行われている標準術式は D2 リンパ節郭清を伴う胃切除術である。しかし、補助化学療法を施行してもリンパ節転移が高度に認められる Stage III 症例の治療成績は十分ではなく 3 割の症例に再発を認める。

胃癌においてリンパ節転移はもっとも重要な予後因子である。

現在のところ、リンパ節転移の機構は、原発巣からの VEGF-C 分泌により、リンパ管新生が誘導され、リンパ管に癌細胞が浸入し、リンパ節において増殖する。さらに、リンパ節で増殖した癌細胞は、血行性に遠隔転移をきたすと考えられている。

また、生体では癌に対する免疫反応が生じており、一般的には、癌抗原を取り込んだ樹状細胞 (Dendritic Cells :DC) やマクロファージが、リンパ節内でナイーブ T 細胞を刺激し、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) などのエフェクター T 細胞を増殖させ、抗腫瘍効果を誘導する。これまでに、多くの癌原発巣には多くの免疫細胞が浸潤していることが報告されている。CTL が多く浸潤する場合は、予後良好で、制御性 T 細胞 (Treg) や M2 マクロファージが多く浸潤する場合は予後が不良であると報告されている。

しかし、リンパ節内での癌に対する CTL 反応がどのように抑制されているかの検討は少ない。癌細胞が CTL を直接抑制するのか、抗腫瘍免疫が抑制されてから癌細胞が浸潤するかは不明である。

最近、マウスの皮膚癌モデルを用いた研究で所属リンパ節において、転移形成前にリンパ管新生が亢進していることが示された。また、大腸癌の検討では、転移の初期段階である脈管侵襲と、エフェクターメモリー T 細胞 (CD3CD8CD45ROCCR7CD28) の低下との関連が示されるなど、転移前、すなわち癌進展の早期より、局所の免疫反応が変化することが報告された。さらに、マウスでは、リンパ管内皮細胞 (Lymphatic Endothelial Cells: LEC) が、免疫寛容を含む多機能性を有することが報告されてきた。

このように、胃癌リンパ節内での免疫微小環境とリンパ節内皮細胞機能との関連について検討された報告はないと思われる。また、近年、宿主の全身炎症免疫反応と胃癌の進展との関連についても報告が増えており、血液中の CRP 値や modified Glasgow Prognostic Score、好中球リンパ球比 (NLR) が胃癌を含めた種々の癌において予後因子となることが知られている。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、リンパ節内における免

疫細胞分画の転移による変化や機能について検討し、リンパ節内の免疫寛容機構を解明する。また、リンパ節転移形成に深く関連するリンパ管新生と免疫寛容との関連について検討し、転移形成前のリンパ節内微小環境の詳細を解明する。続いて、これらに關係する分子を探索し、胃癌リンパ節転移予測のバイオマーカーを同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 胃所属リンパ節内における免疫担当細胞分画の検討

摘出リンパ節転移標本からの組織分離

リンパ節内の T 細胞サブセットの評価、分離、機能解析

リンパ節内 DC の phenotype、機能解析

(2) リンパ節内の癌関連リンパ管内皮細胞の分離、培養と機能解析

リンパ節内のリンパ管新生の亢進について

リンパ管内皮細胞の転移による影響について

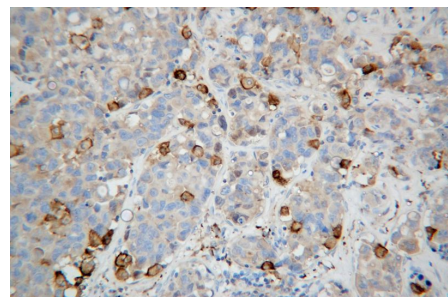
リンパ節内のマクロファージとリンパ管内皮細胞との関連性について

## 4. 研究成果

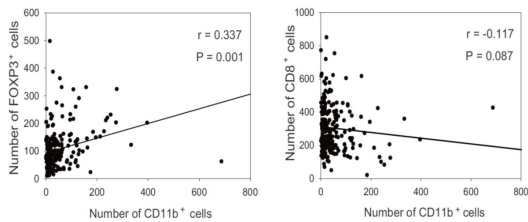
(1) 胃所属リンパ節内における免疫担当細胞分画の検討

CD11b 陽性 DC と FOXP3 陽性細胞の個数には、有意な正の相関関係を認めた。CD11b 高浸潤群は低浸潤群と比較して、腫瘍径、血管侵襲陽性例、リンパ節転移症例、Stage 進行症例と有意な相関を認め、高浸潤群は有意に予後不良であり、CD11b 高浸潤群は独立した予後予測因子となった。TGF- $\beta$  や IL-10 などの免疫抑制性サイトカインを含む胃癌細胞上清添加により、in vitro 培養 DC の CD11b、免疫抑制性の共刺激分子である PD-L2 発現が増強し、MHC class II 発現が低下した。

以上の結果より、胃癌細胞から産生された免疫抑制性サイトカインにより、DC の CD11b 発現が増強され、誘導された CD11b 陽性 DC により Treg が局所に誘導される可能性が示唆された。胃癌原発巣において CD11b 陽性 DC は局所の免疫寛容に關与することが示唆された。



転移リンパ節内では、非転移リンパ節と比べてエフェクターメモリーCD4T細胞(Tem)および、エフェクターT細胞(Te)の割合が減少していた。リンパ節内Temは原発巣内のCD4TおよびCD8T細胞数と相関関係を示した。リンパ節転移内Te分画において、TregおよびTh2細胞の増加、PD-1陽性細胞の増加、また好中球および、樹状細胞のCD11b発現の増強を認めた。さらに、リンパ節内のIFN-gammaのmRNA発現の増加を認めた。



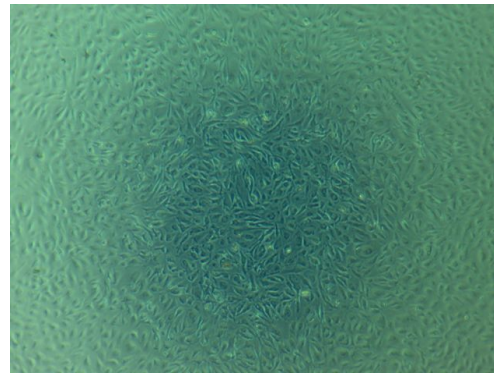
病理組織学的にリンパ節転移陰性の胃癌症例18例と、リンパ節転移陽性の31例に関して摘出リンパ節切片を用いて検討を行った。リンパ節転移陽性の標本はサイトケラチンAE1/AE3抗体を用いて腫瘍細胞の免疫組織染色を行い、転移巣の大きさ・分布を確認した。また抗CD163抗体を用いてM2Mの同定・計測を行った。さらに領域リンパ節は腫瘍からの位置とリンパ流を考慮して4つの領域に分類してマッピングを行い、領域毎にM2M数の解析を行った。胃癌所属リンパ節において、転移リンパ節内M2M数は正常リンパ節内M2M数に比べ有意に増加していた(p<0.0001)。病理組織学的因子の検討では病期とリンパ節転移個数においてM2M数と正相関を示した。転移の有無に関わらずM2Mの分布は、胃癌原発巣に最も近い領域に多く、さらにリンパ節転移が進行するとより遠位領域の正常リンパ節でもM2M数が増加していた。

## (2)リンパ節内の癌関連リンパ管内皮細胞の分離、培養と機能解析

転移リンパ節内では転移のないリンパ節より有意にリンパ管新生(LVD)が増加していた。リンパ節を転移巣の大きさで比較すると、転移巣の大きさに伴いLVDも増加した。

教室で切除した胃癌転移リンパ節よりLECを分離した。LECはIFN-gによる刺激下でPDL-1およびMHC-II分子を発現した。しかし、CD80などの共刺激分子の発現は認めなかった。AllogeneicなCD4T細胞と共培養したところ、T細胞の増殖は認めなかったが、CD4T細胞によるIL-2、IL-10、INF-gの産生は有意に低下した。一方、LECとCD4T細胞の共培養系に胃癌細胞株(OCUM-12)をダブルチャンパーに

加えたところ、LECのPDL-1およびindoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO)のmRNA発現、CD4T細胞のPD-1mRNA発現が有意に増加した。



胃癌所属リンパ節において、転移リンパ節内M2M数は正常リンパ節内M2M数に比べ有意に増加していた(p<0.0001)。病理組織学的因子の検討では病期とリンパ節転移個数においてM2M数と正相関を示した。転移の有無に関わらずM2Mの分布は、胃癌原発巣に最も近い領域に多く、さらに左胃動脈根部や胃大網動脈に沿ったリンパ節で増加していた。in vitroではM2M培養上清のVEGF-C濃度はコントロールに比べ有意に増加しており、リンパ管新生との関連が示唆された。

Mとの直接共培養でLECは紡錘状に変化し、管腔が多数形成されたが、間接培養では変化は認めなかった。管腔形成は、癌細胞を添加した直接共培養及び癌細胞処理後のMとの共培養で有意に増加した。M・LEC直接共培養後のLECでCD44、ICAM1、VCAM1、E-selectin、MMPs、Mでは炎症性サイトカインが増加した。胃癌細胞株共培養後のMではCD44、Integrin、Laminin、MMPs、HAS1、Versican、CXCL1、2、6、IL-1、-6、-8、VEGF-A、-C等のmRNA相対発現量が増加した。蛍光二重染色ではリンパ管を取り囲むMを認めた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Tumor-associated macrophages induce capillary morphogenesis of lymphatic endothelial cells derived from human gastric cancer. *Cancer Science* 107: 1101-1109, 2016. Tauchi Y, [Tanaka H](#), (Kumamoto K), Tokumoto M, Sakimura C, Sakurai K, Kimura K, Toyokawa T, Amano R, Kubo N, [Muguruma K](#), Yashiro M, Maeda K, [Ohira M](#), Hirakawa K (査読有)
2. Tumor-associated macrophages extend along lymphatic flow in the pre-metastatic lymph nodes of human gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology* 23: 230-235, 2016. Go Y, [Tanaka H](#),

Tokumoto M, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Muguruma K, Maeda K, Ohira M, Hirakawa K (査読有)

3. Identification of tumour-reactive lymphatic endothelial cells capable of inducing progression of gastric cancer. British Journal of Cancer 113: 1046-1054, 2015. Tokumoto M, Tanaka H, Tauchi Y, Kasashima H, Kurata K, Yashiro M, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Amano R, Kimura K, Muguruma K, Maeda K, Ohira M, Hirakawa K. (査読有)

4. Alteration of CD4 T cell subsets in metastatic lymph nodes of human gastric cancer. Oncology Reports 34: 639-647, 2015. Okita Y, Ohira M, Tanaka H, Tokumoto M, Go Y, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Muguruma K, Sawada T, Maeda K, Hirakawa K (査読有)

5. Programmed Death-1 Ligand-1 (PDL1) expression is associated with the prognosis of patients with stage II/III gastric cancer. Anticancer Research 35: 5369-5376, 2015. Tamura T, Ohira M, Tanaka H, Muguruma K, Toyokawa T, Kubo N, Sakurai K, Amano R, Kimura K, Shibutani M, Maeda K, Hirakawa K. (査読有)

6. Intranodal lymphangiogenesis precedes development of lymph node metastasis and accelerates progression of gastric cancer. Journal of Gastrointestinal Surgery 18: 481-490, 2014. Watanabe M, Tanaka H, Ohira M, Yoshii M, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Yamamoto A, Muguruma K, Yamashita Y, Maeda K, Sawada T, Hirakawa K (査読有)

7. A positive correlation between neutrophils in regional lymph nodes and progression of gastric cancer. Anticancer Research 34: 7129-7136, 2014. Tokumoto M, Tanaka H, Ohira M. (査読有)

8. Role of tumor-infiltrating CD11b+ antigen-presenting cells in the progression of gastric cancer. Journal of Surgical Research 186: 192-200, 2014. Okita Y, Tanaka H, Ohira M, Muguruma K, Kubo N, Watanabe M, Fukushima W, Hirakawa K (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 胃癌原発巣、転移リンパ節内の免疫微小環境の変化 第113回日本外科学会定期学術集会 大北仁裕、田中浩明、吉井真美、李友浩、櫻井克宣、木村健二郎、永原 央、野田英児、天野良亮、久保尚士、六車一哉、前田清、澤田鉄二、大平雅一、平川弘聖 2013.4.11 福岡市

2. 胃所属リンパ節内のリンパ管新生と転移の関係 第34回癌免疫外科研究会 渡邊真央、田中浩明、六車一哉、櫻井克宣、豊川貴弘、久保尚士、木村健二郎、永原 央、天野良亮、前田 清、八代正和、大平雅一、平川弘聖 2013.5.16 岡山市

3. 胃癌所属リンパ節内の微小環境と腫瘍進展との関連 第87回日本胃癌学会総会 徳

本真央、田中浩明、崎村千恵、田内幸枝、渋谷雅常、櫻井克宣、山添定明、永原 央、木村健二郎、豊川貴弘、天野良亮、久保尚士、六車一哉、大平雅一、平川弘聖 2015.3.6 広島市

4. 胃癌所属リンパ節における腫瘍関連リンパ管内皮細胞の同定 第36回癌免疫外科研究会 徳本真央、田中浩明、崎村千恵、田内幸枝、櫻井克宣、豊川貴弘、久保尚士、六車一哉、八代正和、大平雅一、平川弘聖 2015.5.15 奄美市

5. マクロファージの直接接触による胃癌関連リンパ管内皮細胞の形態的变化 第70回日本消化器外科学会総会 田内幸枝、田中浩明、崎村千恵、徳本真央、櫻井克宣、豊川貴弘、久保尚士、六車一哉、大平雅一、平川弘聖 2015.7.15 浜松市

6. Intratumoral tertiary lymphoid structures are associated with favorable prognosis of patients with gastric cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016 Sakimura C, Tanaka H, Tamura T, Ohira G, Shibutani M, Yamazoe S, Sakurai K, Nagahara H, Kimura K, Toyokawa T, Amano R, Kubo N, Muguruma K, Maeda K, Ohira M, Hirakawa K 2016.4.16 New Orleans, LA, USA

7. 胃癌組織内の免疫チェックポイント分子(PD-1/PD-L1)の発現と抗PD-1抗体治療の適応 第116回日本外科学会定期学術集会 田村達郎、田中浩明、大平 豪、渋谷雅常、櫻井克宣、山添定明、永原 央、木村健二郎、豊川貴弘、天野良亮、久保尚士、六車一哉、前田 清、大平雅一、平川弘聖 2016.4.14 大阪市

8. 胃癌における新しいリンパ節転移機構の解明と治療への応用の可能性 第71回日本消化器外科学会総会 田中浩明、田村達郎、櫻井克宣、山添定明、木村健二郎、豊川貴弘、天野良亮、六車一哉、大平雅一、平川弘聖 2016.7.14 徳島市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 浩明 (TANAKA Hiroaki)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：90382168

### (2) 研究分担者

大平 雅一 (OHIRA Masaichi)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90203926  
六車一哉 (MUGURUMA Kazuya)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10382045