

平成21年5月25日現在

研究種目：基礎研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591549
 研究課題名（和文） 癌リンパ節転移におけるリンパ管新生因子の機能解析と役割に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） Basic Research on the lymphangiogenic factors for the lymph node metastasis
 研究代表者
 夏越 祥次（NATSUGOE SHOJI）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：70237577

研究成果の概要：

動物および臨床検体を用いた実験の結果、悪性腫瘍の治療では腫瘍増大を抑えると同時に転移抑制を考慮した治療、つまり血管新生とリンパ管新生の両者を標的とした治療が必要であることが明らかになった。またリンパ節転移のみならず、微小転移にもリンパ管新生が関与していること、癌幹細胞マーカーや一部のケモカインもリンパ節転移と関連があることが示された。癌治療を行う上でリンパ管新生および血管新生を標的とすることは臨床上也現実的であり、標的分子として VEGF-D、VEGFR-2、VEGFR-3 が有用であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
年度			
年度			
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：リンパ管新生，血管新生

1. 研究開始当初の背景

消化器癌を含め多くの癌においてリンパ節転移は予後を規定する重要な因子となっている。特に食道癌では粘膜下層まで浸潤すると急速にリンパ節転移率が増加する。これらリンパ節転移を伴う食道進行癌においては過大な侵襲を伴う外科手術をはじめ、化学療法、放射線療法などが行われるが、未だに治

療成績は満足できるものではない。したがってリンパ節転移の制御は癌の治療戦略において最も重要な位置を占めるものと考えられる。

近年、分子生物学的手法および遺伝子解析の進歩によりリンパ節転移のメカニズム、制御機構が徐々に解明されつつある。特にリンパ節転移形成においてリンパ管新生 (lymphangiogenesis) という過程が重要な

役割を担っており、これまでにいくつかのリンパ管新生因子が同定された。VEGF-C, VEGF-D, さらにそのレセプターである VEGFR-2, VEGFR-3 はリンパ節転移の形成において最も重要な役割を果たしている。これまで臨床的には VEGF-C, VEGF-D 発現とリンパ節転移との関連性について胃, 大腸, 肺, 前立腺, 甲状腺などいくつかの癌で報告されている。われわれも臨床病理学的に VEGF-C, VEGF-D 発現とリンパ管侵襲, リンパ節転移とが相関することを報告した (*Clin Cancer Res*, 2004)。また消化器癌で顕在化したリンパ節転移の前段階病変である微小転移の存在意義についても術後再発, 予後と関連があることを報告してきた (*Cancer Lett*, 2000 ; *Surgery*, 2002)。さらに微小転移症例においても VEGF-C 発現が関連していることを報告している (*J Gastrointest Surg*, 2006)。その他, 同じチロシンキナーゼ・レセプターである Neuropilin-1, Neuropilin-2 がある種の固形腫瘍において VEGF-C や VEGF-D を介したリンパ管新生と関連しているとの報告がなされ (*FASEB J*, 2006), また Angiopoietin/Tie-2 もリンパ節転移を制御する上で重要な分子標的となりうる可能性を秘めており今後の展開が期待されている。

2. 研究の目的

リンパ管新生因子とリンパ節転移との関連についての報告はいくつかの消化器癌でも報告がみられる。しかし顕在化したリンパ節転移の前段階病変である微小転移におけるリンパ管新生因子の発現と役割についての検討, さらに *in vitro* から *in vivo* 実験, 臨床材料までを対象とした一連の研究は報告がみられない。癌細胞レベル, 微小転移レベルでその生物学的特性を明らかにするとともに, 転移形成に関わるリンパ管新生因子の機能および役割を解析することはまさに独創的であると考えられる。

また高度進行消化器癌の治療成績向上のためには新たな治療戦略の開発が必須である。その一つが分子標的治療であるが, リンパ節転移のみならず微小転移形成における VEGF-C, VEGF-D とそのレセプターである VEGFR-2, VEGFR-3 の一連の過程を抑制することでリンパ節転移の治療を一般化できる可能性が示唆される。

本研究では微小転移を含むリンパ節転移過程におけるリンパ管新生因子の役割について解析するとともに臨床応用のための基礎実験を行った。

3. 研究の方法

(1) VEGF-D を用いたリンパ管新生誘導実験

VEGF-D 導入マウスにおけるリンパ管新生, リンパ節転移形成を調べた。LYVE-1 でリンパ管新生, PECAM-1 で血管新生の発現を評価しコントロールマウスと比較, 腫瘍, リンパ節転移形成, リンパ管新生について検討した。

(2) 臨床検体におけるリンパ管新生因子, 関連蛋白発現の解析

消化器癌患者から得られた外科切除サンプルを用いて腫瘍および間質組織におけるリンパ管新生因子, 関連蛋白の発現を遺伝子レベル, 蛋白レベルで調べた。

(3) リンパ管新生因子を応用した分子標的治療への展開

リンパ管新生因子で誘導された腫瘍に対する各種抗体(抗 VEGF-D 抗体, 抗 VEGFR-2, 抗 VEGFR-3 抗体)の治療効果(腫瘍縮小, リンパ節転移抑制)を調べた。

4. 研究成果

(1) VEGF-D を用いたリンパ管新生誘導実験

VEGF-D 導入により腫瘍組織の血管新生, リンパ管新生が誘導され, リンパ節転移が促進された。

(2) 臨床検体におけるリンパ管新生因子, 関連蛋白発現の解析

さまざまな腫瘍において遠隔転移形成と関連する CXCL12 とその受容体である CXCR4 の発現を食道癌症例で解析を行ったところ CXCL12, CXCR4 は微小血管密度との関連を認めなかったが, CXCL12 は微小転移を含むリンパ節転移と有意な相関を認めた。また微小血管密度, CXCL12 はリンパ節転移を伴う食道癌原発巣で有意に多く確認され, CXCL12 と CXCR4 が共発現している症例では微小転移を含むリンパ節転移が多いことが確認された。癌幹細胞マーカーである CD133 陽性腫瘍ではリンパ管侵襲, リンパ節転移が高頻度にみられ, リンパ管新生因子 VEGF-C 発現は CD133 発現との関連が認められた。

(3) リンパ管新生因子を応用した分子標的治療への展開

抗 VEGFR-3 抗体あるいは抗 VEGF-D 抗体による治療では腫瘍の縮小効果は不十分であったが, リンパ管新生, リンパ節転移は抑制された。また抗 VEGFR-2 抗体による治療では腫

瘍増大を抑制できたが、リンパ節転移に対する効果は乏しかった。一方、抗 VEGFR-3 抗体と抗 VEGFR-2 抗体の併用では腫瘍増大およびリンパ節転移の両方が十分に抑制された。以上の結果より悪性腫瘍の治療では腫瘍増大を抑えると同時に転移抑制を考慮した治療、つまり血管新生とリンパ管新生の両者を標的とした治療が必要であることが証明された。

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 17 件)

1. Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* (2008) 98:1389-1397 (査読有) .
2. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Arima H, Kozono T, Funasako Y, Ehi K, Nakajo A, Ishigami S, Aikou T. Detection of micrometastases in sentinel node navigation surgery for gastric cancer. *Surgical Oncology* (2008) 17:203-210 (査読有) .
3. Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Okumura H, Setoyama T, Uchikado Y, Kita Y, Tamotsu K, Sakurai T, Owaki T, Aikou T. Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 correlates with lymph node metastasis in submucosal esophageal cancer. *Journal of Surgical Oncology* (2008) 97:433-438 (査読有) .
4. Ishigami S, Sakamoto A, Uenosono Y, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M, Setoyama T, Arigami T, Uchikado Y, Arima H, Natsugoe S, Aikou T. Carcinoembryonic antigen messenger RNA expression in blood can predict relapse in gastric cancer. *Journal of Surgical Research* (2008) 148:205-209 (査読有) .
5. Natsugoe S, Mori M. Isolated tumor cells in esophageal cancer. *Esophagus* (2007) 4:1-5 (査読有) .
6. 松本正隆, 夏越祥次, 石神純也, 奥村 浩, 上之園芳一, 宮菌太志, 大脇哲洋, 帆北修一, 愛甲 孝, 食道浸潤を伴う胃上部胃癌の病理像からみた外科治療: 消化器外科, 30(5), 561-567, 2007 (査読無) .
7. 夏越祥次, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 花園幸一, 大脇哲洋, 石神純也, 愛甲 孝: 食道癌の術前化学療法はここまで来た: 成人病と生活習慣病, 第 37 巻, 643-647, 2007 (査読無) .
8. Natsugoe S, Uchikado Y, Okumura H, Matsumoto M, Setoyama T, Tamotsu K, Kita Y, Sakamoto A, Owaki T, Ishigami S, Aikou T. Snail plays a key role in E-cadherin-preserved esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Report* (2007) 17:517-523 (査読有) .
9. Ishigami S, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Nakajo A, Uenosono Y, Arigami T, Uchikado Y, Setoyama T, Arima H, Hokita S, Aikou T. Clinical implication of CXCL12 expression in gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology* (2007) 14:3154-3158 (査読有) .
10. Ishigami S, Natsugoe S, Nakajo A, Tokuda K, Uenosono Y, Arigami T, Matsumoto M, Okumura H, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of CCR7 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* (2007) 54(76):1025-1028 (査読有) .
11. Ishigami S, Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Matsumoto M, Okumura H, Uchikado Y, Arigami T, Arima H, Setoyama T, Aikou T. Usefulness of sentinel node biopsy in laparoscopic partial gastrectomy for early gastric cancer. *Hepatogastroenterology* (2007) 54(79):2164-2166 (査読有) .
12. 石神純也, 中条哲浩, 上之園芳一, 奥村浩, 松本正隆, 有上貴明, 内門泰斗, 瀬戸山徹郎, 帆北修一, 夏越祥次, 愛甲 孝. 肝転移陽性進行胃癌に対する隔週 Paclitaxel+S-1 療法の治療成績について: 癌と化学療法, 34, 569-572, 2007 (査読有) .
13. Setoyama T, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Aikou T. Isolated tumour cells in blood and E-cadherin expression in oesophageal squamous cell cancer. *British Journal of Surgery* (2007) 94(8):984-991 (査読有) .
14. Setoyama T, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Yokomakura N, Ishigami S, Aikou T. Alpha-catenin is a significant prognostic factor than E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* (2007) 95(2):148-155 (査読有) .
15. Setoyama T, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Ishigami S, Owaki T, Hanazono K, Aikou T. Circulating tumor cells in blood of esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* (2007) 4(1):23-27 (査読有) .
16. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, Arima H, Ishigami

S, Aikou T. Sentinel node micrometastases have high proliferative potential in gastric cancer. *Journal of Surgical Research* (2007) 145(2):238-243 (査読有) .
17. Ishigami S, Natsugoe S, Nakajo A, Arigami T, Kitazono M, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Sasaki K, Aikou T. HLA-class I expression in gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology* (2007) 97:605-608 (査読有) .

[学会発表] (計 32 件)

1. Matsumoto M, Natsugoe S, Aikou T, Marc G. Achen, Steven A. Stacker: Cancer therapy targeting for angiogenesis and lymphangiogenesis. The 6th International Symposium on Cancer Research and Therapy, Tokyo (2008.11.22)
2. 前田真一, Ding Qiang, 蔵原 弘, 新地洋之, 夏越祥次, 愛甲 孝, 高尾尊身: CD133 expression is correlated with lymph node metastasis in pancreatic cancer. 第 67 回日本癌学会, 名古屋市 (2008.10.28)
3. Natsugoe S, Uchikado Y, Matsumoto M, Okumura H, Setoyama T, Hanazono K, Owaki T, Uenosono Y, Ishigami S, Aikou T: Is neoadjuvant chemoradiation therapy effective for lymph node micrometastasis in advanced esophageal cancer?. 11th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, Budapest (2008.9.11)
4. 有上貴明, 夏越祥次, 柳田茂寛, 上之園芳一, 有馬豪男, 平田宗嗣, 小園 勉, 船迫和, 衣斐勝彦, 石神純也, 愛甲 孝: 早期胃癌におけるリンパ節郭清の微小転移からみた臨床的意義. 第 63 回日本消化器外科学会総会, 札幌市 (2008.7.16)
5. Natsugoe S, Setoyama T, Yanagita S, Uchikado Y, Matsumoto M, Okumura H, Sasaki K, Sakurai T, Uenosono Y, Ishigami S, Owaki T, Aikou T: Isolated tumor cells in esophageal cancer. 第 62 回日本食道学会学術集会, 東京都 (2008.6.21)
6. 佐々木健, 夏越祥次, 石神純也, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 喜多芳昭, 保 清和, 櫻井俊秀, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道粘膜下層癌の微小転移を含めたリンパ節転移に対する CXCL12 と CXCR4 の発現意義. 第 32 回日本リンパ学会総会, 東京都 (2008.6.7)
7. 前田真一, 新地洋之, 蔵原 弘, 又木雄弘, 野間秀蔵, 前村公成, 夏越祥次, 愛甲 孝, 高尾尊身: 腭頭部癌における癌幹細胞マーカー, CD133 の発現と臨床的意義. 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 長崎市 (2008.5.16)

8. 佐々木健, 夏越祥次, 石神純也, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 喜多芳昭, 保 清和, 櫻井俊秀, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道粘膜下層癌の微小転移を含めたリンパ節転移に対する CXCL12 と CXCR4 の発現意義. 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 長崎市 (2008.5.16)

9. Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Funasako Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T: Clinical application of sentinel node concept in esophageal cancer. 6th Biennial International Sentinel Node Society Meeting, Sydney (2008.2.18)

10. 石神純也, 中条哲浩, 上之園芳一, 柳田茂寛, 松本正隆, 瀬戸山徹郎, 有上貴明, 内門泰斗, 有馬豪男, 有留邦明, 宮菌太志, 奥村 浩, 帆北修一, 夏越祥次, 愛甲 孝: 胃癌における HLA-Class I の発現と臨床的意義. 第 69 回日本臨床外科学会総会, 横浜市 (2007.11.29)

11. 柳田茂寛, 夏越祥次, 上之園芳一, 小園勉, 船迫 和, 衣斐勝彦, 有上貴明, 有馬豪男, 中条哲浩, 石神純也, 帆北修一, 愛甲 孝: 胃癌センチネルリンパ節における術中迅速 RT-PCR での微小転移診断の有用性. 第 18 回日本消化器癌発生学会総会, 札幌市 (2007.11.8)

12. 夏越祥次, 松本正隆, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 上之園芳一, 佐々木健, 櫻井俊秀, 奥村 浩, 石神純也, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道癌の微小転移診断と臨床応用. 第 59 回日本気管食道科学会総会ならびに学術集会, 前橋市 (2007.11.2)

13. 松本正隆, 夏越祥次, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 佐々木健, 櫻井俊秀, 大脇哲洋, 石神純也, 愛甲 孝: 食道癌非切除症例に対する化学放射線療法の治療成績と予後因子. 第 59 回日本気管食道科学会総会ならびに学術集会, 前橋市 (2007.11.2)

14. 石神純也, 中条哲浩, 上之園芳一, 有上貴明, 有馬豪男, 内門泰斗, 奥村 浩, 夏越祥次, 愛甲 孝: 胃癌における CXCL12 の発現と臨床的意義. 第 45 回日本癌治療学会総会, 京都市 (2007.10.26)

15. 佐々木健, 夏越祥次, 石神純也, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 喜多芳昭, 保 清和, 櫻井俊秀, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道粘膜下層癌の微小転移を含めたリンパ節転移に対する CXCL12 と CXCR4 の発現意義. 第 39 回癌とリンパ節研究会, 京都市 (2007.10.25)

16. Uenosono Y, Aikou T, Natsugoe S, Yanagita S, Funasako Y, Kozono T, Arigami T, Arima H, Ehi K: Identification of micrometastases in sentinel nodes using immunohistochemical staining and RT-PCR

for gastric cancer. 16th Asian Congress of Surgery, Beijing (2007.10.20)

17. 夏越祥次, : 食道癌のリンパ節転移巢の他臓器浸潤に対する手術. 第 49 回日本胸部外科学会九州地方会, 久留米市 (2007.7.26)

18. 瀬戸山徹郎, 夏越祥次, 松本正隆, 奥村浩, 内門泰斗, 佐々木健, 櫻井俊秀, 喜多芳昭, 保 清和, 花園幸一, 石神純也, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道癌血中遊離癌細胞の存在と原発巣 E-cadherin 発現の関連性, 臨床病理学的因子の検討. 第 62 回日本消化器外科学会総会, 東京都 (2007.7.20)

19. 松本正隆, Marc G. Achen, Steven A. Stacker, 瀬戸山徹郎, 花園幸一, 奥村 浩, 大脇哲洋, 夏越祥次, 愛甲 孝: 腫瘍の血管新生・リンパ管新生を標的とした治療戦略. 第 62 回日本消化器外科学会総会, 東京都 (2007.7.19)

20. 佐々木健, 夏越祥次, 石神純也, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 保 清和, 花園幸一, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道扁平上皮癌における CXCL12 の発現意義. 第 62 回日本消化器外科学会総会, 東京都 (2007.7.19)

21. 上之園芳一, 夏越祥次, 柳田茂寛, 小園勉, 船迫 和, 有馬豪男, 有上貴明, 衣斐勝彦, 石神純也, 愛甲 孝: 微小転移診断による胃癌 SNNS の臨床応用の可能性. 第 62 回日本消化器外科学会総会, 東京都 (2007.7.18)

22. 松本正隆, Marc G. Achen, Steven A. Stacker, 夏越祥次, 愛甲 孝: 血管新生・リンパ管新生を標的とした癌転移の制御. 第 16 回日本がん転移学会総会, 富山市 (2007.7.10)

23. 佐々木健, 夏越祥次, 石神純也, 松本正隆, 愛甲 孝: 食道扁平上皮癌における CXCL12 と CXCR4 の発現意義. 第 16 回日本がん転移学会総会, 富山市 (2007.7.10)

24. 松本正隆, 夏越祥次, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 内門泰斗, 花園幸一, 大脇哲洋, 愛甲 孝: Barrett 食道癌 3 例の検討. 鹿児島 GERD 研究会第 2 回学術講演会, 鹿児島市 (2007.7.6)

25. 松本正隆, 夏越祥次, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 花園幸一, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道癌の内視鏡的切除術後再発症例の検討. 第 35 回九州食道癌合併療法談話会, 福岡市 (2007.6.30)

26. 夏越祥次, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 花園幸一, 内門泰斗, 保 清和, 佐々木健, 上之園芳一, 石神純也, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道癌の再発に対する外科治療の役割. 第 61 回日本食道学会学術集会, 横浜市 (2007.6.22)

27. 松本正隆, 夏越祥次, 奥村 浩, 内門泰斗, 瀬戸山徹郎, 花園幸一, 大脇哲洋, 石神純也, 愛甲 孝: 切除可能食道癌に対する術前化学放射線療法群と手術単独群の無作為

化比較試験. 第 61 回日本食道学会学術集会, 横浜市 (2007.6.22)

28. 佐々木健, 夏越祥次, 石神純也, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 保 清和, 花園幸一, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 食道扁平上皮癌における CXCL12 と CXCR4 の発現意義. 第 61 回日本食道学会学術集会, 横浜市 (2007.6.22)

29. 夏越祥次, 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 花園幸一, 大脇哲洋, 上之園芳一, 石神純也, 愛甲 孝: 術前補助療法は進行食道癌のリンパ節微小転移の制御に有効か? 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 大阪市 (2007.4.12)

30. 石神純也, 柳田茂寛, 上之園芳一, 中条哲浩, 宮薮太志, 有留邦明, 帆北修一, 奥村浩, 松本正隆, 上木原貴仁, 小園 勉, 夏越祥次, 愛甲 孝: 分子生物学的評価による術後再発リスク症例の予測とグリベックの使用. 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 大阪市 (2007.4.12)

31. 瀬戸山徹郎, 夏越祥次, 奥村 浩, 松本正隆, 花園幸一, 内門泰斗, 喜多芳昭, 保 清和, 石神純也, 大脇哲洋, 愛甲 孝: 血中 isolated tumor cell の検出は食道癌の腫瘍マーカーとして有用か? 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 大阪市 (2007.4.12)

32. 柳田茂寛, 夏越祥次, 上之園芳一, 小園勉, 船迫 和, 衣斐勝彦, 有上貴明, 有馬豪男, 中条哲浩, 石神純也, 帆北修一, 愛甲 孝: Multiple primer を用いたリアルタイム RT-PCR による胃癌の迅速リンパ節転移診断. 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 大阪市 (2007.4.12)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 70237577

(2) 研究分担者

石神 純也 (ISHIGAMI SUMIYA)
鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・助教
研究者番号: 90325803

愛甲 孝 (AIKOU TAKASHI)
鹿児島大学・理事
研究者番号: 60117471

高尾 尊身 (TAKAO SONSHIN)
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授
研究者番号: 80171411

(3)連携研究者
該当者なし