

## 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 6 月 3 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22591446
研究課題名（和文）	分泌型 CEACAM-1 はマウス移植乳癌の血管とリンパ管新生を促進する
研究課題名（英文）	CEACAM-1 promotes lymphangiogenesis and angiogenesis in the inoculated mouse mammary carcinomas.
研究代表者	
	伊藤 裕子 (Ito Yuko)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	40148432

研究成果の概要（和文）：リンパ管内皮増殖因子 VEGF-C の発現が強く転移性の高い移植乳癌では接着因子 CEACAM-1 が血管新生とリンパ管新生を促進する。また、血管に発現した CEACAM-1 は血管をリンパ管へとリモデリングすることが示唆された。さらには CEACAM-1 はマウス乳癌細胞から microvesicles (shedding vesicles) に包まれて放出され、血管内皮細胞に取り込まれることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In a highly metastatic mouse mammary carcinoma model which express VEGF-C strongly, CEACAM-1 promotes angiogenesis and lymphangiogenesis. It was suggested that the blood capillaries which expressed CEACAM-1 on the endothelium were remodeled into lymphatic capillaries. Moreover, shedding vesicles containing CEACAM-1 were released from mouse mammary carcinoma cells and may be engulfed by endothelial cells of blood capillaries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、乳腺外科学

キーワード：乳癌、リンパ管新生、血管新生、CEACAM-1、Microvesicles、癌治療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍細胞の遠隔転移には、腫瘍に血管およびリンパ管が形成されることが必須である。血管新生は内皮細胞増殖因子(VEGFs)の関与のもと、既存の血管より形成されるのみならず全身循環する血管内皮前駆細胞に

より再生されることが明らかとなっている(Asahara, T et al., Science, 1997, 275:964)。一方、リンパ管新生のメカニズムとして、既存のリンパ管からの内皮細胞の萌出により形成されるという報告(He Y et al., Cancer Res., 2004, 64:3737)と、胎生期のようにリン

パ管内皮前駆細胞 (CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VEGFR-3<sup>+</sup>) から発生するという報告 (Salven P et al., Blood, 2003:101, 伊藤裕子他, リンパ学, 2006, 2:65, 平成19~20年度科学研究費補助金基盤C) がある。2008年、Kilic等は、正常組織のリンパ管では発現していないが、精上皮腫、膀胱癌でリンパ管新生因子として Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM-1) を報告した (Kilic N et. al., Blood., 2007, 110:4223)。CEACAM-1 はラット肝臓の毛細管形成に関わる接着因子として発見された BGP, CD66a と同一で、正常上皮、創傷部の毛細血管、胎盤などの母体組織、ある種の白血球に発現している。Kilic N et. al. は腫瘍細胞から分泌される VEGF-C, -D が血管内皮に CEACAM-1 の発現を亢進すると、血管内皮にリンパ管内皮転写因子である prox-1 と VEGF-C のレセプター VEGFR-3 の発現を誘導し、腫瘍血管からリンパ管へのリプログラミングが起こることを示唆している。しかしながら、リンパ管内皮のリプログラミングの誘導についての詳細はわかっていない。

(2) 腫瘍細胞が発現する CEACAM-1 は精上皮腫、膀胱癌、前立腺癌で増殖および腫瘍形成を抑制し、腫瘍細胞における VEGF-C, -D の発現をも抑制すると報告され (Kunath T et al., Oncogene, 1995 11:2375, Hsieh JT et al., Cancer Res, 1995, 55:190)、ヒト乳癌では悪性度が増すに従い CEACAM-1 の発現が低下すると報告されてきた (Riethdorf L et al., J Histochem Cytochem, 1997, 45:957, Huabg J et al., Anticancer Res, 1998, 18:3203)。しかし、これに反する報告 (Dango S et al., Lung Cancer, 2008, 60:426, ) が相次ぎ結論に至っていない。われわれは CEACAM-1 を高発現している乳癌細胞株と発現が見られない乳癌細胞株を有しており、CEACAM-1 を高発現しているのは高率でリンパ節・肺に転移する。また、CEACAM-1-s についての研究は少なく、乳汁中の lipid vesicles・alveolar cell の lipid drop 膜に発現が認められている (Kirshner J et al., 2004, J Mol Histol, 35:287)、働きについては不明である。

## 2. 研究の目的

われわれは乳癌細胞が乳汁とともに分泌する Carcinoembryonic antigen-related cell

adhesion molecule-1 (CEACAM-1-s) は腫瘍細胞の生存・増殖、血管新生だけでなく、リンパ管新生にも関与していると考え、包括的な抗癌剤療法への応用を目的とした。

1) 移植腫瘍で血管内皮からリンパ管内皮へのリプログラミングが起こっているかを明らかにする

2) リプログラミングが VEGF-C とそのレセプター VEGFR-3, リンパ管内皮転写因子 prox-1 を介して起こっているかを明らかにする

3) 両腫瘍細胞における分泌型の CEACAM-1-s の合成能を明らかにする。

4) 分泌型の CEACAM-1-s が血管新生を亢進するかを明らかにする

5) 分泌型の CEACAM-1-s が血管内皮からリンパ管内皮へのリプログラミングを誘導することを明らかにする

6) 高転移性の乳癌細胞の CEACAM-1 を siRNA によりノックダウンした細胞を移植して、増殖、血管新生、リンパ管新生が減少することを明らかにする

## 3. 研究の方法

1) 移植マウス乳癌の作製：低転移性の BJMC338 と高転移性の BJMC3879 を各々、BALB/c マウスの鼠径部皮下に移植し、2週間ごとに腫瘍を採取試料とする。

2) 腫瘍リンパ管・血管の組織細胞化学的検索、超微形態学的検討：移植腫瘍径が 0.2 cm になった時点から 2、4、6、8 週後にマウスを屠殺し腫瘍、肺、腋窩リンパ節を摘出する。DNA 合成の解析のために、屠殺 1 時間前に 100mg/Kg の容量で BrdU を腹腔内に投与する。顕微鏡用には 25mM CaCl<sub>2</sub> 添加

4% paraformaldehyde で固定し、パラフィンに包埋、4~5μm の切片を作製、H. E. 染色で腫瘍型、転移の有無について組織学的な検討を行う。電顕用には 2% paraformaldehyde・

2.5% glutaraldehyde の混合液で固定し、エポキシ樹脂に包埋、60~70μm の超薄切片を作製 (Ultramicrotome MT-600、現有装置)、電子染色の後、電顕観察する (Hitachi-7650、現有装置)。パラフィン切片で①BrdU の取り込みによる DNA 合成の解析、②リンパ管内皮特異的マーカー：LYVE-1 ③血管内皮特異的マーカー：CD31 について免疫染色を行う。④LYVE-1/CEACAM-1, CD31/CEACAM-1 について二重免疫染色を行う。⑤リプログラミングが

実行されているかは、VEGFR-3, prox-1、phospho-VEGFR-3 と CEACAM-1 について二重免疫染色を行う。CEACAM-1 については免疫電顕法を施行し、微細構造とあわせて検討する。

3) 発現因子の定量的・定性的解析：腫瘍細胞・移植腫瘍をホモジナイザーで破碎し蛋白を抽出、CEACAM-1 の発現の両腫瘍での差について、Western blot 法で検討する。また、パラフィン切片にて in situ hybridation を施行する。

4) CEACAM-1 が in vitro で血管内皮からリンパ管内皮へのリプログラミングを誘導するかを明らかにする：株化されたマウス血管内皮細胞に CEACAM-1 を遺伝子導入し、リンパ管内皮マーカーの発現を検討した。理研セルバンクより供与されたマウス血管内皮腫瘍細胞株、UV2 細胞 (BALB/c X C57BL/6 のマウス血管腫から樹立されており、われわれが用いているマウス乳癌細胞と同系) に GFP-CEACAM-1 を cDNA として 4 $\mu$ g を liposome 法で遺伝子導入した。導入 24 時間後に、蛍光免疫染色を行った。

5) 乳癌細胞が CEACAM-1 を分泌しているか検討する。

①透過型電顕で培養および移植乳癌細胞が microvesicles (MVs) を放出するか観察する。

②CEACAM-1 の免疫電顕を行う。

③MVs を細胞培養液から filter にて分離・精製して走査電顕観察する。

④細胞培養液から filter にて分離・精製した MVs について CEACAM-1 の western blot を行う。

6) microvesicles に含まれた CEACAM-1 がリンパ管、血管内皮に作用するか検討する。

①細胞培養液から遠沈法で分離した MVs が血管及びリンパ管内皮に伝播するか検討。

②MVs が伝播した後の内皮細胞の変化について検討。スクラッチアッセイにて内皮細胞の活性化を評価する。

#### 4. 研究成果

1) VEGF-C を高発現している腫瘍内において血管内皮マーカー CD31 とリンパ管内皮マーカー podoplanin を部分的に両発現している脈管が観察され、リモデリングが起こっていることが示唆された。CEACAM-1 は血管およびリンパ管に発現していた。CEACAM-1 はリンパ管内皮細胞転写因子 Prox-1 とともに共局在しており、Prox-1 とリンパ管内皮増殖因子のレセ

プター VEGFR-3 が共局在していた。また、VEGFR-3 はリン酸化しており、リンパ管新生が実行されていると示唆された。すなわち、CEACAM-1 を発現した毛細血管において Prox-1 が発現、ついで VEGFR-3 が発現しリンパ管内皮増殖因子 VEGF-C により毛細血管からリンパ管へのリモデリングが亢進したと考えられた。

2) 遺伝子導入していない UV2 細胞は CD31 (血管内皮マーカー) を発現するのみであった。遺伝子導入すると、UV2 細胞は Prox-1 (リンパ管内皮転写因子), VEGFR-3 (リンパ管内皮増殖因子 VEGF-C レセプター) を強く発現した。LYVE-1 (リンパ管内皮マーカー) の発現が弱いため、リコンビナントの VEGF-C を添加すると発現が増強した。以上から、CEACAM-1 がリンパ管内皮転写因子を誘導、リンパ管内皮増殖因子 VEGF-C レセプターも誘導されることからリンパ管へとリモデリングされることが明らかとなった。

3) 培養および移植乳癌細胞は径 50-100nm の exosomes、径の大きい shedding body を放出している。shedding body に CEACAM-1 が含まれている。MVs は血管およびリンパ管内皮に伝播することがわかった。

#### 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 6 件)

①Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Ito Y, Otsuki Y, Naoe T. Microvesicle-mediated RNA Molecule Delivery System Using Monocytes/Macrophages. Mol. Ther. 査読有, 19: 395-399, 2011.

②Yuko Ito, Masa-Aki Shibata, Nabil Eid, Junji Morimoto and Yoshinori Otsuki, Lymphangiogenesis and Axillary Lymph Node Metastases Correlated with VEGF-C Expression in Two Immunocompetent

Mouse Mammary Carcinoma Models. International Journal of Breast Cancer, 査読有, 2011:1-10, 2011 doi:10.4061/2011/867152, .

③Masa-Aki Shibata, Jayakrishna Ambati, Eiko Shibata, Romulo JC Albuquerque, Junji Morimoto, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer

model. BMC Medicine, 査読有, 8: 69 – 81, 2010.

〔学会発表〕 (計 9 件)

① 伊藤 裕子, マウス乳癌細胞は Microvesicles(MVs)を放出する. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月28日, 高松

② 伊藤 裕子, マウス移植乳癌における CEACAM-1 の発現とリンパ管新生に対する役割について. 第52回日本組織細胞化学会, 2011年9月24日, 金沢大学医学部キャンパス

③ Yuko Ito, CEACAM1 expression and its effects on lymphangiogenesis in the inoculated mice mammary carcinomas. 第116回日本解剖学会・第88回日本生理学会合同総会, 2011年3月28日, パンフィコ横浜

〔図書〕 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 裕子 (Ito Yuko)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40148432

### (2) 研究分担者

大槻 勝紀 (Otsuki Yoshinori)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50140166

柴田 雅朗 (Shibata Masa-Aki)  
大阪保健医療大学・保健医療部・教授  
研究者番号: 10319543

森本 純司 (Morimoto Junji)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90145889