

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22591450

研究課題名(和文) 微小転移モデル確立による食道癌の転移メカニズムと各転移過程における細胞動態の解明

研究課題名(英文) Breakthrough of mechanism in micrometastasis using micrometastatic model of esophageal cancer

研究代表者

宮崎 達也 (Miyazaki, Tatsuya)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70372349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルの作成において同所移植モデルの作成が困難であったため、腹腔内の微小転移モデルを作成し微小転移巣を可視化する手技を確立した。colon26-luc細胞をマウス腹腔内投与することで腹膜播種モデルを作成した。7週齢 雌 BALB/cマウスを用いてイソフルレン麻酔下にルシフェリンを腹腔内投与し発光を観察した。肉眼的に不可視であるday10の時点で微小腹膜播種病変の描出が可能であった。播種病巣の定量に用いられる腹膜の重量は発光強度と相関し、腫瘍の定量を発光量で評価できることが証明された。マウスの腹膜播種モデルを用いて犠牲させることなく腹腔内の病勢を評価することが可能な実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We have established mice model to evaluate peritoneal micro metastatic nest, because we could not establish orthotopic transplantation model. We used colon-26-luc cell line and 7-week-old female Balb-c mice. We could visualize micro peritoneal cancer nest as a light of luciferase. We also measured the weight of peritoneal tissue to quantify tumor volume, that related luminescence intensity. We establish the method to evaluate disease progression without sacrifice of mice.

研究分野：外科学

キーワード：微小転移

1. 研究開始当初の背景

現在、国民の死因の約 30% を占め年々増加傾向にある悪性腫瘍の進展及び転移能の獲得のメカニズムを解明することは、我々の生活の向上、及び年々増加の一途を遂げている医療費の削減においても重要な課題と言える。悪性腫瘍の予後に関与する最も大きな因子のひとつはその腫瘍の転移能と考えられる。

我々は、食道癌において、発癌のメカニズム、その悪性度を規定する因子、集学的治療における感受性予測等、食道癌治療について研究を進めてきた。食道癌の予後を規定する因子として非常に大きな因子としてリンパ節転移および遠隔転移があげられる。食道癌はその解剖学的特徴から一般的な消化器癌のなかで最も早い段階からリンパ節転移や遠隔転移を引き起こすことが知られている。また、遠隔転移症例に対しては治療法が限定され集学的治療においてもその予後は非常に不良である。しかしながら、悪性腫瘍の転移のメカニズムはいまだ解明されておらず実際の臨床の場においてもその転移能の評価法はまったくなされていないのが現状である。治療前にその腫瘍の転移能を評価するためには基礎的・基盤的な分野の取り組みが重要であるとともに、その成果をタイムリーに臨床にフィードバックすることが必要である。

今回我々は、食道癌の同所移植モデルの作成および微小転移の解析についての研究を立案した。微小転移については数多くの研究がなされ、報告されている。しかしながら、その意義が問われることが多く、例えば、シングルセルの微小転移については予後にほとんど差がないのに対し複数の腫瘍細胞でクラスターを形成したものは予後不良である。このいわば転移の始まりを発見しその時点でのメカニズムを解析することで、転移を防止する治療につなげる可能

性がある。

今回の検討では、臨床的には食道癌微小リンパ節転移の現況の把握、見張りリンパ節と微小リンパ節転移との関連、微小リンパ節転移が発現する転移関連蛋白の解析を行う。

基礎研究として食道癌微小転移モデルの開発を行い、培養細胞を用いて食道癌の微小転移細胞の特質を解析する。

食道癌微小転移については、臨床検体を用いた検討がなされているが、動物モデルとして確立されているものはなく、実験系としても高度な技術が要求される。しかしながら完成されれば癌としての特質の研究のみならず抗癌剤治療や、放射線治療などの実験系としても有効であり有意義なモデルとなりうる。本研究はモデル作成およびモデルを用いてその信憑性の確認を行った上で基礎実験を行い確立した上で転移実験を中心とした研究を行う。

食道癌治療に関しては国内では世界的に通用する外科治療、放射線治療、薬物治療が行われ、研究面も含めて日本は世界でもトップレベルといえる。

国内外で微小転移研究は積極的に行われているが、食道癌については臨床検体を用いた検討が多く、いまだ、基礎的な裏づけに乏しい状態と言わざるを得ない。当研究は臨床面をもう一度再考しつつ基礎研究を臨床展開に結びつける独創的な研究といえる。

2. 研究の目的

癌細胞の転移のメカニズム（特に微小転移について）について、その転移能の獲得についての解明を目的とする。「研究方法」複数の複雑なメカニズムが予想されるが、臨床的に転移が比較的早期から頻回に認められる食道癌をモデルに、動物実験モデルおよび臨床検体を用いて検討する。具体的には動物モデルの作成、リンパ節微小転移

の際の発現蛋白の解析、および病理学的な検討。血行性転移時の細胞動態の解析を行う。癌細胞の転移のメカニズム（特に微小転移について）について、その転移能の獲得についての解明を目的とする。複数の複雑なメカニズムが予想されるが、臨床的に転移が比較的早期から頻回に認められる食道癌をモデルに、動物実験モデルおよび臨床検体を用いて検討する。具体的には動物モデルの作成、リンパ節微小転移の際の発現蛋白の解析、および病理学的な検討。血行性転移時の細胞動態の解析を行う。

3. 研究の方法

実験動物(ヌードマウス・ヌードラット)を用いてヒト食道癌細胞株 TE-13 に GFP で標識した細胞を接種し食道癌同所移植転移モデルを作成する。同モデルも用いて病理学的、免疫組織学的に腫瘍細胞及び周囲環境における蛋白発現を検索してその発現様式と状態を観察する。さらに、発現蛋白の転移におけるメカニズムの解析を行う。

臨床手術切除標本を用いて免疫組織学的検討を行う。まずは主病巣及び周囲組織と郭清リンパ節を中心に検討を行う。微小転移を検索して発現蛋白の解析を行う。臨床検体（末梢血および奇静脈血）を用いて血中を循環する細胞の検索を行う。

4. 研究成果

マウスモデルの作成において同所移植モデルの作成が困難であった。縦隔内の腫瘍の生着、リンパ節転移の作成が困難であったため、腹腔内の微小転移モデルを作成し微小転移巣を可視化する手技およびモデルを作成した。colon26-luc, mouse colorectal carcinoma cell lines transfected pMSCV-luciferase を使用した。colon26-luc 細胞を 1×10^6 個をマウス腹腔内投与することで腹膜播種モデルを作成した。6-7 週齢 雌 BALB/c マウスを用いて行

った。マウスはイソフルレン麻酔下にルシフェリンを腹腔内投与し OptimaShot CL-420 を使用し発光を観察した。肉眼的に不可視である day10 の時点で微小腹膜播種病変を描出することが可能であった。播種病巣の定量に用いられる腹膜の重量は発光強度と相関し、腫瘍の定量を発光量で評価できることが証明された。また、同モデルを用いて抗癌剤（シスプラチン及び Gemcitabin）の治療効果判定が可能であった。これらのことから、マウスの腹膜播種モデルを用いて犠死させることなく腹腔内の病勢を評価することが可能な実験系を確立した。

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 8 件)

下記すべて査読あり

Miyazaki T, Ojima H, Fukuchi M, Sakai M, Sohda M, Tanaka N, Suzuki S, Ieta K, Saito K, Sano A, Yokobori T, Inose T, Nakajima M, Kato H, Kuwano H. Phase II Study of Docetaxel, Nedaplatin, and 5-Fluorouracil Combined Chemotherapy for Advanced Esophageal Cancer. Ann Surg Oncol. 2015 Feb 18. [Epub ahead of print]

Yokobori T, Suzuki S, Miyazaki T, Sohda M, Sakai M, Tanaka N, Ozawa D, Hara K, Honjo H, Altan B, Fukuchi M, Ishii H, Iwatsuki M, Sugimachi K, Sudo T, Iwaya T, Nishida N, Mimori K, Kuwano H, Mori M. Intestinal epithelial culture under an air-liquid interface: a tool for studying human and mouse esophagi. Dis Esophagus. 2015 Mar 23. doi: 10.1111/dote.12346. [Epub ahead of print]

Miyazaki T, Sohda M, Tanaka N, Suzuki S, Ieta K, Sakai M, Sano A, Yokobori T, Inose T, Nakajima M, Fukuchi M, Ojima H, Kato H, Kuwano H. Phase I/II study of docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil combination chemoradiotherapy in patients with advanced esophageal cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2015 Mar;75(3):449-55.

Ozawa D, Yokobori T, Sohda M, Sakai M, Hara K, Honjo H, Kato H, Miyazaki T, Kuwano H. TGFBI Expression in Cancer Stromal Cells is Associated with Poor Prognosis and Hematogenous Recurrence

in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2014 Dec 2. [Epub ahead of print]

Sohda M, Miyazaki T, Honjyo H, Hara K, Ozawa D, Suzuki S, Tanaka N, Sano A, Sakai M, Yokobori T, Nakajima M, Fukuchi M, Kato H, Higuchi T, Tsushima Y, Kuwano H. L-[3-¹⁸F]-α-methyltyrosine uptake by lymph node metastasis is a predictor of complete response to CRT in esophageal cancer. Anticancer Res. 2014 Dec;34(12):7473-7.

Muroi H, Nakajima M, Satomura H, Takahashi M, Yamaguchi S, Sasaki K, Yokobori T, Miyazaki T, Kuwano H, Kato H. Low PHLDA3 expression in oesophageal squamous cell carcinomas is associated with poor prognosis. Anticancer Res. 2015 Feb;35(2):949-54.

Nakajima M, Domeki Y, Satomura H, Takahashi M, Sugawara A, Muroi H, Sasaki K, Yamaguchi S, Miyazaki T, Kuwano H, Kato H. Salvage lymphadenectomy for recurrent esophageal cancer after chemoradiotherapy. Int Surg. 2014 Jul-Aug;99(4):452-7.

Sohda M, Sakai M, Honjyo H, Hara K, Ozawa D, Suzuki S, Tanaka N, Yokobori T, Miyazaki T, Fukuchi M, Higuchi T, Tsushima Y, Kuwano H. Use of pre-treatment 18F-FAMT PET to predict patient survival in squamous cell carcinoma of the esophagus treated by curative surgery. Anticancer Res. 2014 Jul;34(7):3623-8.

〔学会発表〕(計 2件)

横堀武彦、高橋遼、金泉、浅尾高行、桑野博行 ルシフェラーゼアッセイを利用した肉眼的に認識できない微小腹膜播種マウスモデルの確立 第115回日本外科学会学術集会 2015年4月16～18日名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Yokobori T, Takahashi R, Kumakura Y, Honjyo H, Hara K, Sakai M, Sohda M, Miyazaki T, Asao T, Kuwano H. A new low-cost and high quality device for in vivo luciferase assay in peritoneal dissemination mouse model. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2014年9月25～27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0件)

〔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 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 達也 (MIYAZAKI, Tatsuya) 群馬大学 医学部附属病院 助教
研究者番号: 70372349

(2) 研究分担者

横堀 武彦 (YOKOBORI, Takehiko) 群馬大学 医学系研究科 助教
研究者番号: 60420098

酒井 真 (SAKAI Makoto) 群馬大学 医学部附属病院 助教
研究者番号: 70420099

宗田 真 (SOHDA Makoto) 群馬大学 医学部附属病院 助教
研究者番号: 70507326

桑野 博行 (KUWANO, Hiroyuki) 群馬大学 医学系研究科 教授
研究者番号: 90186560

(3) 連携研究者

()

研究者番号: