

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15011

研究課題名(和文) 癌浸潤病巣における「血管リンパ管新生」の提唱と腫瘍組織学的意義

研究課題名(英文) Functional analysis of "angio-lymphatic vessels" in the neoplastic lesions - its histopathological significance

研究代表者

鬼島 宏 (Kijima, Hiroshi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：90204859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織が発育進展する際には、間質浸潤とともに血管新生が重要である。腫瘍組織および腫瘍周囲において、血管マーカー (factor related antigen) ・リンパ管マーカー (podoplanin) 両者が陽性の「血管リンパ管」の病理組織学的特徴を明らかにすることができた。血管リンパ管は、腫瘍組織内のみならず、腫瘍近傍の組織にも認められ、癌の初期進展に重要な役割を演じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis and stromal invasion play important roles in tumor growth/extension. We have identified angio-lymphatic vessels positive for both vascular marker (factor VIII) and lymphatic marker (D2-40). We examined histopathological characteristics of the angio-lymphatic vessels in the tumors. The angio-lymphatic vessels are found not only tumor tissues, but also their surrounding tissues, and thought to play a significant role in early tumor invasion and neoangiogenesis.

研究分野：病理組織学

キーワード：血管新生 腫瘍細胞 浸潤性増殖 血行性転移 リンパ行性転移

### 1. 研究開始当初の背景

癌増殖とともに形成される腫瘍血管は、腫瘍組織の代謝を担い、血行性転移経路としても重要であり、種々の研究が行われている。一方、臨床的に癌のリンパ節転移はしばしば認められるにも拘わらず、腫瘍リンパ管新生に関する研究は相対的に遅れている。

病理組織学的に癌病巣を丹念に観察すると、癌の初期浸潤病巣では、血管マーカー (CD31 ないし factor related antigen) 陽性内皮細胞を有する血管が形成され、次いで、リンパ管マーカー (podoplanin) 陽性内皮細胞を有するリンパ管が形成されることが確認される。我々は、このような浸潤病巣で CD31 および podoplanin の両者を発現する脈管が「血管とリンパ管との間を介在している」と理解するに至っている。また、臨床病理学的検討では、リンパ管侵襲陰性・静脈侵襲陽性の癌症例でリンパ行性にリンパ節転移が認められたり、静脈侵襲陰性・リンパ管侵襲陽性の癌症例で血行性に遠隔臓器転移が認められたりする奇異な病態が示されている。

CD31/podoplanin 陽性の「血管リンパ管」が形成されることは、国内外を含め過去の報告には全く無く、本研究の独創性は極めて高い。予想される結果としては、癌初期浸潤部において、血管リンパ管の存在は極めて重要であり、これを基盤として腫瘍血管・腫瘍リンパ管が発達してゆくものと示唆される。本研究成果は、新たな転移経路が証明されるという腫瘍組織学的意義となる。

### 2. 研究の目的

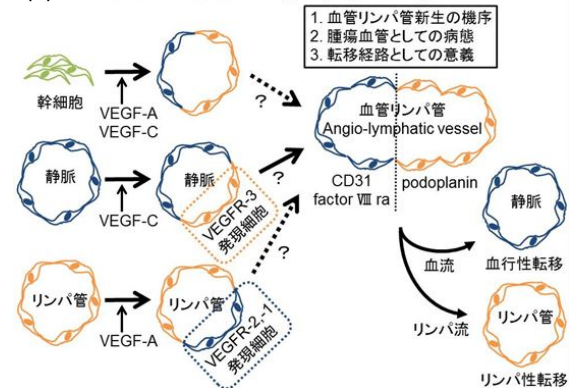
本研究の目的は、癌浸潤病巣において CD31/podoplanin の両マーカーを発現する脈管 (血管リンパ管 angio-lymphatic vessel) の形成機序と意義を明らかにすることである。癌における「血管リンパ管新生 angio-lymphatic genesis」を新たに提唱して、その病態を解明する (図 1)。

- (1) ヒト消化器癌の切除材料を用いて、癌浸潤の程度と血管リンパ管新生の関連を探索し、三次元画像解析を行う。
- (2) 培養ヒト内皮細胞・ヒト間葉系幹細胞を用いて、各種血管新生因子を投与することにより、CD31 (血管)/podoplanin (リンパ管) の両マーカーを有する細胞に分化誘導し、その特性および血管リンパ管新生能を解析する。
- (3) ヒト癌培養細胞株をマウスモデルに異種移植し、癌浸潤と血管リンパ管新生の関連を探索しつつ、継時的に遺伝子発現的解析・組織形態学的解析を行う。

血管リンパ管新生の病態が解明され、「血管リンパ管」がリンパ節転移および遠隔臓器転移に重要な役割を演じていることが証明されれば、腫瘍病理学における新たな病態として意義深い位置づけとなる。現在、癌取り扱い規約では、癌の静脈侵襲・リンパ管侵襲の

程度が記載され、転移リスクの評価項目となっている。本研究が成果を上げた場合には、血管リンパ管侵襲 (angio-lymphatic invasion) の程度も転移リスクとして評価項目に加わる可能性がある。

図 1. 血管リンパ管新生 angio-lymphatic genesis



### 3. 研究の方法

ヒト消化器癌の切除材料用いて、癌浸潤と血管リンパ管新生との関連を探索し、三次元画像解析を行う。培養内皮細胞・間葉系幹細胞を用いて CD31/podoplanin の両マーカーを有する細胞を分化誘導し、その特性を解析する。その後は、CD31/podoplanin の両マーカーを有する培養細胞から血管リンパ管が形成される実験系を確立する。また、ヒト癌培養細胞株をマウスモデルに異種移植し、癌浸潤と血管リンパ管新生の関連を個体レベルで解析する。

- (1) ヒト消化器癌における血管リンパ管の病理組織学的解析：内視鏡的・外科的に切除された早期胃癌・早期大腸癌を用いて、血管マーカー (CD31 ないし factor related antigen) およびリンパ管マーカー (podoplanin) の二重免疫染色を行い、癌初期浸潤と血管リンパ管の関連を組織学的に解析する。染色標本をデジタル化 (バーチャルスライド) して、血管リンパ管の構造・分布を三次元画像で構築・解析を行う。
- (2) 培養ヒト内皮細胞の血管リンパ管への分化誘導
  - (2)-1. 単層培養による血管リンパ管マーカーの誘導：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト肺微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-LLy)、ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-dLy) に対して、血管新生因子 (VEGF-A など) およびリンパ管新生因子 (VEGF-C など) を投与し、CD31/podoplanin の両マーカーを有する細胞を分化誘導することで、その特性を解析する。
  - (2)-2. 三次元培養による血管リンパ管のモデル作成：三次元培養法を用いて、血管内皮細胞と線維芽細胞とを細胞積層による共培養を行い、三次元組織を作成する。さらに前述の血管新生因子・リンパ管新生因子を投与して、血管リンパ管を誘導

し、組織学的に解析をする。必要に応じて、ヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell, hMSC) もしくは癌細胞を加え、上記 (1) のヒト切除材料の結果と比較検討する。

- (3) 培養ヒト間葉系幹細胞の血管リンパ管への分化誘導：血管リンパ管新生は、内皮細胞よりも未分化な間葉系幹細胞から発生・分化して形成される可能性がある。このため、前年度からの継続として各種の血管新生因子や癌細胞培地上清を用いて、培養ヒト間葉系幹細胞に対して CD31/podoplanin の両マーカーを有する細胞への分化誘導し、その特性を解析する。
- (4) マウスモデルにおける血管リンパ管新生の経時的三次元解析：Matrigel plug assay を用いて、それぞれのヒト内皮細胞 (HUVEC, HMVEC-LLy, HMVEC-dLy) ・間葉系幹細胞、および各種の血管新生因子をふくむマトリジェルをマウス皮下に移植し、CD31/podoplanin 陽性の血管リンパ管 (angio-lymphatic vessel) の形成を経時的に解析する。観察は、二重免疫染色/光学顕微鏡に加え、蛍光染色/共焦点レーザー顕微鏡を用いる。
- (5) ヒト癌細胞マウス異種移植腫瘍における血管リンパ管の解析：培養ヒト癌細胞株をマウス皮下に異種移植し、各種の血管新生因子を投与しつつ癌浸潤先進部に形成される血管リンパ管を二重免疫染色・蛍光染色を用いて観察する。観察画像はデジタル化して、血管リンパ管の構造・分布および癌細胞との関連を三次元構築して解析を行う。

#### 4. 研究成果

ヒト消化器癌切除材料を用いて、腫瘍組織および腫瘍周囲における「血管リンパ管」の病理組織学的特徴を明らかにすることができた。また、血管新生因子と脈管形成との関連も証明することが出来た。一方、個体レベルでの解析では、モデル動物において胆管癌組織の *in vivo* 解析系を作製し、腫瘍組織の特徴を解明するにいたったが、血管リンパ管形成の病態に迫る成果は十分にあげることができず、今後の課題となった。

- (1) ヒト切除材料を用いた病理組織学的解析では、血管マーカー (factor related antigen) およびリンパ管マーカー (podoplanin) の二重免疫染色を行い、癌初期浸潤と血管リンパ管の関連を組織学的に証明することができた。染色標本をデジタル化(バーチャルスライド)して、血管リンパ管の構造を三次元画像で再構築し、その存在を証明できた(図2)。
- (2) 血管リンパ管は、腫瘍組織内のみならず、腫瘍近傍の組織にも認められたが、通常のリンパ管・静脈に比べ少数であること

が示された。リンパ管は粘膜下層癌で形成され、リンパ管浸潤は粘膜下層浸潤を契機に増加していた。また、粘膜内癌であっても、腫瘍直下および腫瘍周囲粘膜下層で比較的大型の血管が見られる傾向が示された(図3、図4)。

- (3) 血管(特に微小血管)新生には、VEGFのみならず、thymidine phosphorylaseの関与が示唆される結果がえられた。
- (4) 実験動物による解析系では、ハムスターの膵・胆道合流異常モデルで胆道癌を発生させることにより、*in vivo* で血管を含む腫瘍組織を詳細に観察することに成功した(図5)。しかしながら、*vivo* 解析系を用いての血管リンパ管形成の病態に迫る成果は十分にあげることができず、今後の課題となった。

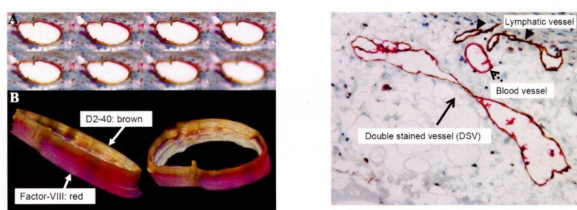


図2. 血管マーカー (factor related antigen) / リンパ管マーカー (podoplanin) 二重免疫染色による血管リンパ管の三次元構造解析。

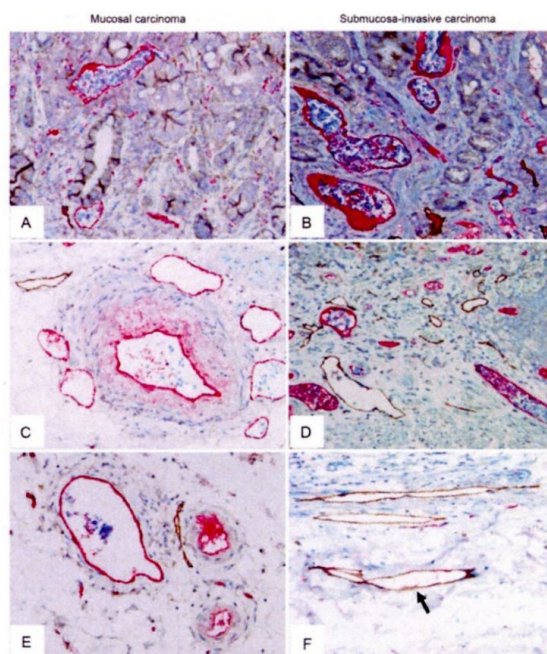


図3. 胃癌切除材料における血管リンパ管 (factor related antigen / podoplanin 二重免疫染色) の形成。粘膜内癌症例の粘膜内 (A), 腫瘍下粘膜下層 (B), および腫瘍周囲粘膜下層 (C) での分布。粘膜下層浸潤癌症例の粘膜内 (B), 腫瘍下粘膜下層 (D), および腫瘍周囲粘膜下層 (F)。



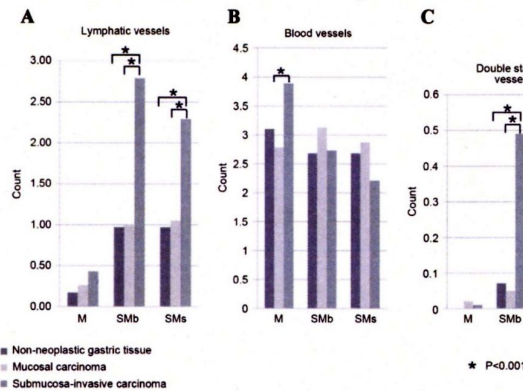


図4. 胃癌切除材料における脈管新生。リンパ管 (A), 静脈 (B), および血管リンパ管 (C) の分布。3 連続バーは、左より非腫瘍性粘膜、粘膜内癌、粘膜下層浸潤癌を示す。

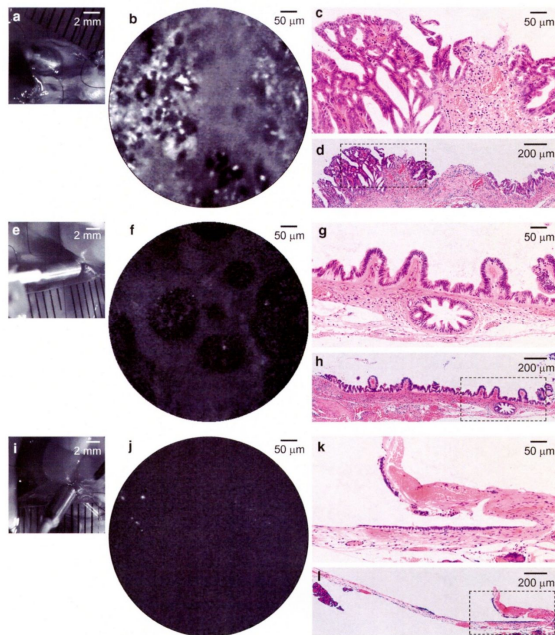


図5. 膵・胆道合流異常モデルでの胆道癌観察。乳頭管状腺癌 (a-d), 上皮内癌-dysplasia 成分 (e-h), 非腫瘍性上皮 (i-l)。

## 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24件: 全て査読有り)

- Sato H, Wu Y, Kato Y, Liu Q, Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Watanabe J, Kijima H. DEC2 expression antagonizes cisplatin-induced apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2017; 16: 43-48.
- Masuda R, Kijima H, Nito M, Wada A, Matsuzaki T, Ikoma Y, Nakazato K, Masuda D, Tanaka M, Kobayashi H, Inokuchi S, Iwazaki M. Lymphatic invasion is a significant indicator of poor patient prognosis in lung squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2017; 15: 2067-2073.
- Igarashi G, Endo T, Mikami K, Sawada N, Satake R, Ohta R, Sakamoto J, Yoshimura T, Kurose A, Kijima H, Fukuda S. Two Cases of Primary Sclerosing Cholangitis Overlapping with Autoimmune Hepatitis in Adults. *Intern Med.* 2017; 56: 509-515.
- Miki Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino Y, Kijima H, Shoji M, Mori A, Yamashita C, Hatano T, Hattori N, Wakabayashi K. Neuropathology of PARK14 is identical to idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2017 17. doi: 10.1002/mds.26952.
- Miura T, Yoshizawa T, Hirai H, Seino H, Morohashi S, Wu Y, Wakiya T, Kimura N, Kudo D, Ishido K, Toyoki Y, Kijima H, Hakamada K. Prognostic Impact of CD163+ Macrophages in Tumor Stroma and CD8+ T-Cells in Cancer Cell Nests in Invasive Extrahepatic Bile Duct Cancer. *Anticancer Res.* 2017; 37: 183-190.
- Liu Q, Wu Y, Yoshizawa T, Yan X, Morohashi S, Seino H, Kato Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 functions as an anti-apoptotic factor during paclitaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Mol Med.* 2016; 38: 1727-1733.
- Takatsuna M, Morohashi S, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Ota R, Saito K, Wu Y, Seino H, Aoyagi Y, Terai S, Kijima H. Myofibroblast distribution is associated with invasive growth types of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2016; 36: 3154-3160.
- Takatsuna M, Morohashi S, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Ota R, Wu Y, Morohashi H, Hakamada K, Terai S, Kijima H. Myofibroblasts of the muscle layer stimulate the malignant potential of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2016; 36: 1251-1257.
- Morohashi S, Morohashi H, Yoshizawa T, Tanaka M, Mikami T, Kagiya T, Saito T, Hirai H, Haga T, Wu Y, Hakamada K, Kijima H. Morphological Analysis of the Residual Rectal Mucosa in 12 Postoperative Ulcerative Colitis Patients. *Hirosaki Med J.* 2016; 67: 92-101.
- Haga T, Yoshizawa T, Morohashi S, Hirai H, Saitou K, Ota R, Takatsuna M, Wu Y, Fukuda S, Kijima H.

- Phenotypic Characterization of Early Biliary Tract Carcinomas Proposes Two Carcinogenesis Pathways. *Hirosaki Med J.* 2016; 67: 28-38.
11. Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Haga T, Wu Y, Ota R, Takatsuna M, Akasaka H, Hakamada K, Kijima H. Clinicopathological significance of gastric poorly differentiated medullary carcinoma. *Biomed Res.* 2016; 37: 77-84.
  12. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Tanaka M, Inokuchi S, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. *Int J Oncol.* 2016; 48: 2310-2320.
  13. Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H. Hypoxia is important in F 18 FDG accumulation in thecoma fibroma tumors on F-18 FDG PET/CT scans. *Mol Med Rep.* 2016; 13: 3821-3827.
  14. Tone K, Kojima K, Hoshiai K, Kumagai N, Kijima H, Kurose A. An ancillary method in urine cytology: Nucleolar/nuclear volume ratio for discrimination between benign and malignant urothelial cells. *Diagn Cytopathol.* 2016; 44: 483-491.
  15. Morohashi S, Yoshizawa T, Seino H, Hirai H, Haga T, Ota R, Wu Y, Yoshida E, Hakamada K, Kijima H. A new histological therapeutic classification system to predict eradicated and residual lymph nodes in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Rep.* 2016; 35: 2592-2598.
  16. Yokoyama H, Sasaki A, Yoshizawa T, Kijima H, Hakamada K, Yamada K. Imaging hamster model of bile duct cancer in vivo using fluorescent L-glucose derivatives. *Hum Cell.* 2016; 29: 111-121.
  17. Ikoma Y, Kijima H, Masuda R, Tanaka M, Inokuchi S, Iwazaki M. Podoplanin expression is correlated with the prognosis of lung squamous cell carcinoma. *Biomed Res.* 2015; 36: 393-402.
  18. Kimura Y, Morohashi S, Yoshizawa T, Suzuki T, Morohashi H, Sakamoto Y, Koyama M, Murata A, Kijima H, Hakamada K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer. *Mol Med Rep.* 2016; 13: 1551-1557.
  19. Masuda D, Masuda R, Matsuzaki T, Imamura N, Aruga N, Tanaka M, Inokuchi S, Kijima H, Iwazaki M. Ki-67 labeling index affects tumor infiltration patterns of lung squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2015; 12:7303-7309.
  20. Tanaka M, Kijima H, Shimada H, Makuuchi H, Ozawa S, Inokuchi S. Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2015; 12: 4029-4036.
  21. Seino H, Wu Y, Morohashi S, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Takai Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 regulates the cisplatin-induced apoptotic pathway of human esophageal cancer cells. *Biomed Res.* 2015; 36: 89-96.
  22. Miyazaki M, Yoshitomi H, Miyakawa S, Uesaka K, Unno M, Endo I, Ota T, Ohtsuka M, Kinoshita H, Shimada K, Shimizu H, Tabata M, Chijiwa K, Nagino M, Hirano S, Wakai T, Wada K, Iasayama H, Okusaka T, Tsuyuguchi T, Fujita N, Furuse J, Yamao K, Murakami K, Yamazaki H, Kijima H, Nakanuma Y, Yoshida M, Takayashiki T, Takada T. Clinical practice guidelines for the management of biliary tract cancers 2015: the 2nd English edition. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015; 22:249-273.
  23. Sawano T, Shimizu T, Yamada T, Nanashima N, Miura T, Morohashi S, Kudo D, Hui FM, Kijima H, Hakamada K, Tsuchida S. Fatty acid synthase-positive hepatocytes and subsequent steatosis in rat livers by irinotecan. *Oncol Rep.* 2015; 33: 2151-2160.
  24. Miyazaki M, Ohtsuka M, Miyakawa S, Nagino M, Yamamoto M, Kokudo N, Sano K, Endo I, Unno M, Chijiwa K, Horiguchi A, Kinoshita H, Oka M, Kubota K, Sugiyama M, Uemoto S, Shimada M, Suzuki Y, Inui K, Tazuma S, Furuse J, Yanagisawa A, Nakanuma Y, Kijima H, Takada T. Classification of biliary tract cancers established by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery: 3(rd) English edition. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015; 22: 181-196.
- 〔学会発表〕(計12件)
1. 吉澤忠司、諸橋聡子、羽賀敏博、清野浩子、吳雲燕、鬼島宏. Dedifferentiated

- liposarcoma of the pancreas: A case report. 第106回日本病理学会総会. 2017年4月28日(東京).
2. 劉 強、今泉忠淳、田中 完、吳 雲燕、吉澤忠司、諸橋聡子、清野浩子、鬼島 宏. DEC1 はヒトメサンギウム細胞においてポリイノシン誘導免疫炎症を制御する. 第106回日本病理学会総会. 2017年4月27日(東京).
  3. 諸橋聡子、田中正則、吉澤忠司、清野浩子、吳 雲燕、鬼島 宏. 潰瘍性大腸炎術後の残存直腸粘膜12例の解析. 第106回日本病理学会総会. 2017年4月27日(東京).
  4. Kijima H, Wu Y, Yoshizawa T, Seino H, Goto S, Haga T, Morohashi S. The bHLH transcription factor DEC plays an important role in epithelial-mesenchymal transition (EMT). 21st World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine. 2016年10月6日(Athens, Greece).
  5. 鬼島 宏. 胆道癌の発育伸展と病理診断. 第52回日本胆道学会学術集会. 2016年9月29日(横浜). 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日(仙台).
  6. 長澤美幸、諸橋聡子、吉澤忠司、平井秀明、羽賀敏博、佐々木花恵、村上圭秀、後藤慎太郎、吳 雲燕、鬼島 宏. 予防的甲状腺切除を試行したMEN2Aの1例. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月14日(仙台).
  7. 平井秀明、齋藤絢介、劉 強、太田理恵、高綱将史、羽賀敏博、吉澤忠司、吳 雲燕、諸橋聡子、鬼島 宏. 低分化髄様胃癌の臨床病理学的特徴. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月14日(仙台).
  8. 吉澤忠司、諸橋聡子、平井秀明、羽賀敏博、吳 雲燕、鬼島 宏. Two cases of synchronous intraductal papillary-mucinous carcinoma and bile duct carcinoma. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日(仙台).
  9. 吳 雲燕、劉 強、平井秀明、吉澤忠司、加藤幸夫、諸橋聡子、鬼島 宏. Podoplanin mediated TGF-beta-induced EMT in human esophageal carcinoma TE-11 cells. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日(仙台).
  10. 劉 強、吳 雲燕、加藤幸夫、吉澤忠司、諸橋聡子、平井秀明、高綱将史、羽賀敏博、鬼島 宏. DEC1 と DEC2 は、前立腺癌細胞においてパクリタキセル誘導アポトーシスを制御する. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日(仙台).
  11. 鬼島 宏、吳 雲燕、吉澤忠司、諸橋聡子. 腫瘍における時計遺伝子の機能解析. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日(仙台).
  12. 諸橋聡子、吉澤忠司、清野浩子、平井秀明、

羽賀敏博、吳 雲燕、鬼島 宏. 乳癌における術前化学療法後の残存腫瘍パターン  
の有用性. 第105回日本病理学会総会.  
2016年5月12日(仙台).

〔図書〕(計1件)

1. 鬼島 宏、福嶋敬宜(編著). 腫瘍鑑別アトラス 胆道癌・痔瘻(文光堂)ISBN: 978-4-8306-2247-2. 2015年, p.2~p.7 (鬼島 宏), p.56~p.65 (羽賀敏博、吉澤忠司、鬼島 宏), p.86~p.93 (吉澤忠司、諸橋聡子、鬼島 宏), p.245~p.250 (平井秀明、刀稱亀代志、鬼島 宏), p.300~p.303 (鬼島 宏).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~patho2/>  
(弘前大学大学院医学研究科病理生命科学講座)

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
鬼島 宏 (KIJIMA HIROSHI)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90204859
- (2)研究分担者  
下田 浩 (SHIMODA HIROSHI)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 2027478
- (3)連携研究者  
諸橋 聡子 (MOROHASHI SATOKO)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 90569592  
  
吳 雲燕 (WU YUNYAN)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 40636586
- (4)研究協力者  
なし