

令和元年6月2日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20522

研究課題名（和文）細胞間接着複合体に着眼した転移リンパ節内微小リンパ管網の特質性の解明

研究課題名（英文）Analysis of characteristics of lymphatic microcirculation within metastatic lymph nodes focusing on endothelial cell junctional complex

研究代表者

明石 昌也（Akashi, Masaya）

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：40597168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：癌の制御とリンパ管との関わりについて理解を深めるため、リンパ管内皮細胞に対する放射線照射の影響を、細胞間接着複合体の形態（morphology of cell junctions）や強度（integrity）、透過性（permeability）、直線性（linearity）を指標に評価した。その結果、放射線照射の影響によりリンパ管内皮細胞の変化が明らかとなり、癌のリンパ節転移や放射線照射後のリンパ浮腫等の合併症の発症メカニズムへの理解に寄与することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりリンパ浮腫発症因子や増悪因子がリンパ管内皮細胞間接着に対しどのような構造的変化を及ぼすかが解明され、さらに、この構造的変化をリバースさせ得る薬剤を網羅的に検討することで、今後リンパ浮腫の根治療法確立に向け大きく前進することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The effects of radiation on morphology, cell integrity, and permeability of lymphatic endothelial cells were analyzed for a better understanding of relationship between cancer and lymphatic vessels. As a result, changes in lymphatic endothelium were found under the influence of radiation, which could contribute to an understanding of the onset mechanism of complications such as lymph node metastasis of cancer and lymphedema after radiation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 リンパ管 放射線治療 リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の所属リンパ節転移は患者の予後に係る最重要因子であるが、そのメカニズム解明はいまだ十全ではない。近年、腫瘍が産生するサイトカインにより腫瘍内に血管/リンパ管新生 (tumor angio/lymphangiogenesis) が生じると同様、所属リンパ節内においてもリンパ管新生 (lymph node lymphangiogenesis) が転移に先んじて生じており、これがリンパ節転移促進のkey stepであると考えられている。従来の口腔癌研究は原発腫瘍そのものに注目した研究が多くを占める一方、転移リンパ節内の微小リンパ管網 (lymphatic microcirculation) の変化に着眼した研究は極めて希少であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、バリア機能や組織の恒常性維持に関与する細胞間接着複合体に注目し、転移リンパ節内の微小脈管構造の特質性を解明することを目的とした。

また並行して、現今の癌治療において欠かすことのできない治療法の一つである放射線治療における癌制御のメカニズム解明や、放射線治療の治療後の有害事象であるリンパ浮腫の治療法開発を目的とし、リンパ管内皮細胞に対する放射線照射の影響を、細胞間接着複合体の形態 (morphology of cell junctions) や強度 (integrity)、透過性 (permeability)、直線性 (linearity) を指標に評価した。

## 3. 研究の方法

細胞間接着複合体に注目し、口腔癌転移リンパ節と病理組織学的に転移を認めなかったリンパ節で免疫組織染色を行い、転移の有無や被膜外浸潤の有無でどのような変化がリンパ節内に起こっているかを観察・評価した。

放射線照射のリンパ管に対する影響を評価した研究では、ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC細胞) は、5%ウシ胎児血清、1%内皮細胞増殖因子を含有した推奨培地を用い、フィブロネクチンをコートした培養皿上で培養した。放射線は、実験用X線照射装置を用いて5または20Gyを細胞に照射した。VE-cad・Cx43・Actin・DAPIについて蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞間透過性は、単層のHDLEC細胞を透過する蛍光標識したデキストランを蛍光プレートリーダーで測定することにより解析した。細胞生存率は、MTT試験に準じ、生細胞により生成されるホルマザン色素を蛍光プレートリーダーで測定することにより解析した。放射線非照射、5Gy照射、20Gy照射のHDLEC細胞について、Tukeyの多重比較検定を行い、有意水準を5%とした。

## 4. 研究成果

細胞密度が高い条件で培養したHDLEC細胞をVE-cadとActinで蛍光免疫二重染色した。VE-cadは、放射線非照射の細胞では細胞辺縁にブロード状に局在していたが、5Gy、20Gyと放射線照射量が増えるに従ってVE-cadのブロード状の局在は減少した。Actinは、放射線非照射の細胞では、細胞の辺縁にVE-cadと共局在していた。一方で、5Gy、20Gyと放射線照射量が増えるに従って、細胞の辺縁においてVE-cadと共局在するActinは減少した。以上の結果は、以前に当科で確認した炎症性サイトカイン刺激を与えた場合の局在パターンと類似していたが、Actinに関しては炎症性サイトカインにより惹起されるストレスファイバー様の構造は呈しなかった。同様に、細胞密度が低い条件で培養したHDLEC細胞をVE-cadとActinで蛍光免疫二重染色した。VE-cadは、細胞密度が高い条件下と同様に細胞の辺縁に局在していたが、ブロード状ではなくジグザグ状に局在していた。5Gy、20Gyと放射線照射量が増えるに従ってジグザグ状に局在す

るVE-cadは減少した。Actinの変化は、細胞密度が高い条件下と同様であった。

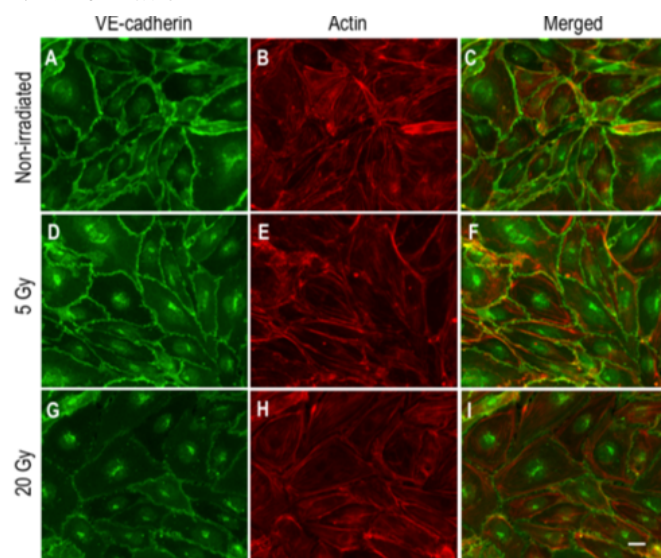
次に、細胞密度が高い条件で培養したHDLEC細胞を観察し、細胞間接着の総数およびVE-cad がブロード状に局在する細胞辺縁数を計測した。放射線非照射と比較して5 Gy、20 Gyと放射線照射量が増えるに従い、VE-cad がブロード状に局在する細胞辺縁数の割合は有意に減少した。これは蛍光免疫染色の結果と一致した。

さらに、単層のHDLEC細胞を透過する蛍光標識したデキストランについて解析した。デキストランは、放射線非照射の細胞では約15%しか透過しなかったのに対し、5 Gy照射の細胞では約30%、20 Gy照射の細胞では約35%透過し、放射線照射量が増えるに従って細胞間を透過するデキストランは有意に増加した。

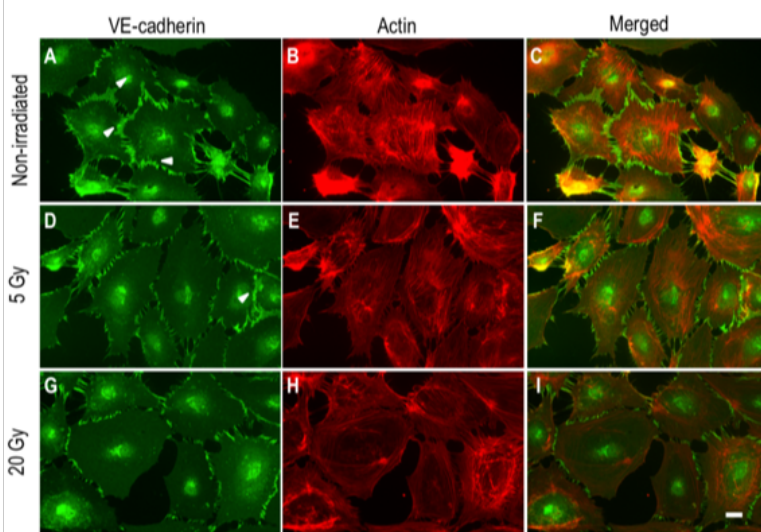
最後に、細胞密度が高い条件で培養したHDLEC細胞をVE-cadとCx43で蛍光免疫二重染色した。放射線非照射および5 Gy照射の細胞では、Cx43はブロード状のVE-cadherinと共局在していた。一方で、20 Gy照射の細胞では、VE-cadと同様に細胞の辺縁において局在するCx43は減少した。

なお、細胞生存率については、蛍光顕微鏡下での観察とMTT試験により解析したが、放射線非照射、5 Gy照射、20 Gy照射の間で有意差は認めなかった。

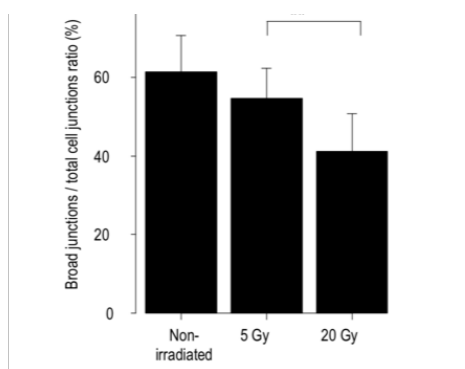
### 細胞密度が高い条件下でのVEカドヘリンとアクチンの二重蛍光免疫染色結果



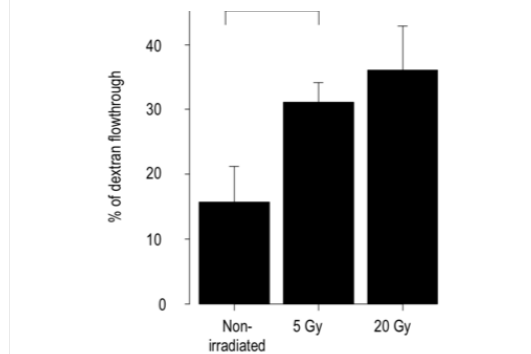
### 細胞密度が低い条件下でのVEカドヘリンとアクチンの二重蛍光免疫染色結果



### ブロード状細胞辺縁は放射線照射量依存的に減少する



### リンパ管内皮細胞間透過性は放射線照射量依存的に増加する



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

①Kishimoto M, Akashi M, Kakei Y, Kusumoto J, Sakakibara A, Hasegawa T, Furudo S, Sasaki R, Komori T. Ionizing Radiation Enhances Paracellular Permeability Through Alteration of Intercellular Junctions in Cultured Human Lymphatic Endothelial Cells. *Lymphat Res Biol.* (査読あり) 2018 Aug;16(4):390-396. doi: 10.1089/lrb.2017.0072. Epub 2018 Jun 4.  
PMID: 29862914

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。