

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15287

研究課題名(和文)リンパ節転移癌細胞とストローマ細胞の相互作用による転移支援微小環境形成

研究課題名(英文)Fetastasis-supportive microenvironment induced by the interaction between metastatic tumor cells and stromal cells in the lymph node

研究代表者

片貝 智哉 (Katakai, Tomoya)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00324682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌のリンパ節転移は病態を左右する重要事象であるが、メカニズムはほとんど分かっていない。本研究は、リンパ節内における転移癌細胞の挙動と免疫細胞を含む組織細胞との相互作用に焦点を当てた詳細な観察を行い、転移の成立機序解明を目指した。マウス乳癌細胞の皮下投与により数週間後に転移したリンパ節では、辺縁洞内に癌細胞が定着し転移巣を形成、これが拡大していった。転移巣内部には特徴的な間質(ストローマ)細胞や血管網が形成されるとともに、マクロファージやT細胞の浸潤が認められた。共培養において乳癌細胞はストローマ細胞に選択的に接着したことから、生体内においてもストローマ細胞を足場とする転移の進行が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Cancer metastasis to the lymph node is crucial issue in disease pathophysiology, although the underlying mechanisms are largely unclear. This study aimed to reveal the cellular and molecular processes in lymph node metastasis through the detailed examinations focusing on the behavior of metastatic tumor cells within lymph node tissue structures and interactions between tumor cells and immune cells or stromal cells. Subcutaneously injected mouse mammary tumor cells metastasized to draining lymph node until around 4 weeks and first settled in the subcapsular lymphatic sinus followed by expanding into tissue parenchyma. Inside the growing tumor, stromal network and blood vessels with unique features seemed to be formed and the infiltration of macrophages and T cells was also observed. In a coculture system, tumor cells selectively adhered to stromal cells, suggesting that metastatic tumor cells are likely to use stromal cells as scaffold for further invasion into the tissue in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ節転 ストローマ細胞 組織微小環境 生体イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

様々な癌で見られるリンパ節転移は一般的にも関心が高く、病態を左右する重要な事象である。しかし、その具体的な過程やメカニズムはほとんど明らかにされていない。特にリンパ節に到達した癌細胞が組織環境内においてどのように振る舞い、その後リンパ行性の遠隔転移に至るのか、あるいは免疫細胞を含むその場の組織細胞とどのような相互作用を行っているのかなどに関しては明確になっておらず、免疫システムの局所的な変容を含む病態の理解や治療・予後の改善に繋げるためにも、転移過程の各段階と成立機序の解明が待たれる。

近年、リンパ節内部の構造や免疫細胞の局在・機能に関する理解が進み、その基盤となる間葉系由来の細網細胞やリンパ管・血管内皮細胞などの非血球系ストローマ細胞が免疫系の恒常性維持と免疫応答制御に重要な役割を担うことが明らかになっている。特に細網細胞は緻密な三次元ネットワークを形成し、ケモカインやサイトカインなどの様々な因子を産生することで免疫細胞を多面的に支持していることが明確になりつつある。

研究代表者はこれまでにリンパ節ストローマ細胞の性状や免疫細胞動態の究明に取り組んできたが、この分野の最新知見が癌のリンパ節転移と密接に関連し、その理解に繋がる可能性を強く感じてきた。リンパ節への浸潤過程で癌細胞は各ストローマ細胞と順次接触すると考えられるが、これらの正常細胞が癌細胞の定着、生存・増殖を支援し、遠隔転移を増長する担い手となっている可能性がある。すなわち、直接・間接接触により癌細胞とストローマ細胞が相互に影響を及ぼし合い、双方の性質が変化することで、ストローマ細胞からの支援因子の産生亢進や局所的な免疫応答の抑制、癌細胞自体の悪性度増加など、癌に有利な環境(転移支援微小環境)が作り出されている状況を想定できる。このような観点からの検討はこれまでに Rowe らが行われておらず、文字通り手付かずの状況にあるといえる。

### 2. 研究の目的

本研究では、リンパ節のストローマ細胞と転移癌細胞の相互作用に注目し、両者の性状変化が免疫系の変容と遠隔転移を促進する可能性を想定して、独自の解析システムを構築することを目指す。マウス上皮性癌のリンパ節転移モデルを用いて、転移癌細胞とリンパ節構造の関連・ストローマ細胞との接触経過を明確にするとともに、イメージングによりストローマ細胞を基盤とした癌細胞動態を観察し、組織内挙動の全容把握を試みる。また、正常・担癌リンパ節のストローマ細胞、および原発巣、一次・二次転移リンパ節の転移癌細胞の性状を比較し、転移支援微

小環境の形成、遠隔転移に繋がる癌細胞や免疫系の変容を検討する。さらに、リンパ節転移の成立・遠隔転移に関わる分子の同定を目指し、機能阻害や遺伝子改変などによる影響を検討する。これらの解析により、リンパ節における特異な癌微小環境の形成メカニズムおよび免疫学的な観点からのリンパ節転移の意義を再検討し、その克服に向けた治療標的の究明への足掛かりとなる成果を目指す。

これまでの動物実験モデルを用いた癌リンパ節転移に関する研究の多くは、ヒト由来の様々な癌細胞株をヌードマウスや SCID マウスなどの免疫不全動物に移入する異種移植系によるものである。しかし、リンパ球がほとんど存在しないような異常なリンパ節への転移を観察しても、本来の状況とはかけ離れていると言わざるを得ない。本研究では、免疫研究に限らず多くの分野で最も使用され、様々な遺伝子改変系統が樹立されている C57BL/6 系統マウスの皮下に、同系由来でリンパ節転移性を有する乳癌細胞株 E0771 を移植するモデル系を用い、本来の原発部位を反映するとともに、正常なリンパ節組織環境が存在する条件下でリンパ行性転移を再現してことが大きな利点である。

### 3. 研究の方法

(1) リンパ節転移能を有する C57BL/6 マウス系統由来の乳癌細胞株 E0771 に哺乳類細胞強制発現ベクターを用いて EGFP, EYFP, tdTomato などの蛍光タンパク質を導入し、安定発現させる。同系マウスの腹部側乳腺皮下に癌細胞を移植・成長させ、腋・鼠径リンパ節への転移を誘導する。癌細胞が浸潤した一次転移(センチネル)リンパ節、二次転移リンパ節を経時的に回収し、組織切片やホルマウント法を用いた各種蛍光標識抗体により染色、共焦点レーザー顕微鏡もしくは多光子励起レーザー顕微鏡(Zeiss LSM710 NLO)を用いて観察し、癌細胞とリンパ節組織微細構造との空間的な位置関係を明らかにする。輸入リンパ管からリンパ節に進入した微小転移癌細胞はまず被膜下および髄質のリンパ洞に進入・定着し、その後リンパ球が集積する間質に浸潤していくと推測されるが、この各過程において、リンパ管内皮細胞、細網細胞、血管内皮細胞などの非血球系ストローマ細胞および細胞外マトリクス、各種免疫細胞サブセットと順次接触するはずである。これらに注目した画像を取得し、転移経過の詳細な把握を試みる。

(2) 乳癌細胞株 E0771 をマウスリンパ節由来ストローマ細胞株 BLS4, BLS12 と共培養し、両者の接着過程や形態変化、増殖などを検討する。モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより、双方に発現する接着分子、ケモカイン等を検討し、相互作用に関与する分子を検索する。

(3) リンパ節の組織構造に異常がある遺伝子改変マウスやケモカイン遺伝子欠損マウスにおいて癌リンパ節転移を誘導し、その影響を検討する。

#### 4. 研究成果

C57BL/6 由来の乳癌細胞株 E0771 をマウス乳腺皮下組織に  $2 \times 10^5$  および  $5 \times 10^5$  個投与した結果、原発巣の大きさは図1のように推移した。 $2 \times 10^5$  個の投与群では約半数で原発巣の消失が認められた。おそらくこれは宿主免疫系の活性化による癌細胞排除の結果であり、この応答に打ち勝つために十分な初期細胞数の投与が必要であると考えられる。したがって、以降は  $5 \times 10^5$  個の投与により実験を進めた。

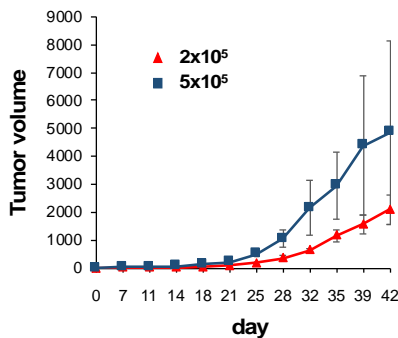


図1) E0771 乳癌細胞原発巣腫瘍の成長経過

マウス下腹部の第4乳腺皮下脂肪組織にE0771細胞を投与し、原発巣からのリンパ節への転移を経時的に観察したところ、投与後4週から鼠径リンパ節もしくは腋窩リンパ節への転移が認められた。一方、第5乳腺皮下組織に癌細胞を投与した場合には直近の鼠径リンパ節への転移確認時に下流の腋窩リンパ節では転移が認められないことが多かった。したがって、下流リンパ節への転移拡大はある程度の期間、最上流(センチネル)リンパ節で食い止められていると推測される。

転移リンパ節における組織観察の結果から、転移癌細胞は輸入リンパ管を經由してリンパ節に侵入し、まず辺縁洞(SCS)内に定着、その場で増殖して転移巣を形成すると考えられる。RANKL や CD169 染色の結果から、SCS 内で増殖した転移巣は辺縁細網細胞(MRC)やSCSマクロファージが作るSCS底面構造を破壊し、濾胞や傍皮質領域に浸潤するように拡大していくと推測される。

転移リンパ節内で癌細胞は拡散するような小腫瘍塊を形成するわけではなく、初期転移巣がまとまって肥大していくことにより組織全体に拡大していくと考えられる(図2)。これにより、通常のスโตรーマ細胞のネットワーク構造は次第に転移巣周辺へと押し出されてしまうと考えられる。一方、転移癌巣内部には形態の異なるスโตรーマ細胞

のネットワークが新たに形成されているように見えるが、既存のスโตรーマ細胞が性質を変えて腫瘍内に留まっている可能性もある(図2、laminin染色)。また、原発巣と同様にF4/80<sup>+</sup>マクロファージの浸潤が多数見られ、T細胞も所々に進入している様子が観察された。B細胞は転移巣辺縁部において小規模な濾胞様構造を形成していたものの、転移巣内部には稀であった。

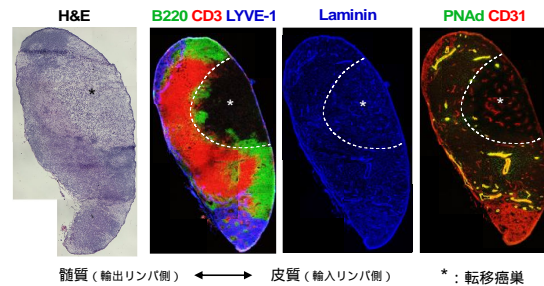


図2) 癌転移リンパ節の組織微細構造

本来、リンパ節の傍皮質領域には高内皮細胞静脈(HEV)が存在するが、この領域で肥大した腫瘍の中心部分にはHEV構造は認められなかった(図2、PNAf染色)。しかし、新たに密な血管構造が構築されていることが確認された(図2、CD31染色)。

E0771細胞とマウスリンパ節由来スโตรーマ細胞株BLS4およびBLS12を共培養すると、E0771細胞が選択的にスโตรーマ細胞に接着する傾向が認められた(図3)。このことは生体内のリンパ節転移においても転移癌細胞がスโตรーマ細胞を足場として利用していることを示唆する。

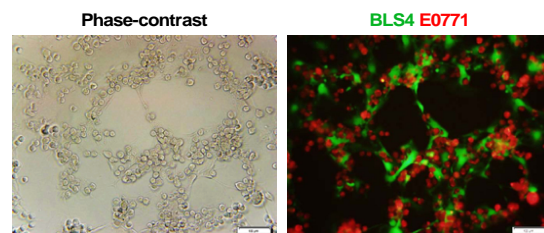


図3) E0771 乳癌細胞と BLS4 スโตรーマ細胞の共培養で見られる選択的接着

フローサイトメトリーによりE0771細胞が発現する細胞表面の接着分子を検索した結果、インテグリン5および1が発現していることが確認された。51は主に細胞外マトリックスであるフィブロネクチン分子のRDG配列に結合することが知られている。そこで、BLS4細胞との接着に過程において阻害剤GRGDSを添加し、51とフィブロネクチンの結合阻害の影響を評価した。その結果、BLS4へのE0771細胞の未接着細胞数は阻害剤の有無で有意差はなく、51を介する結合阻害のみではスโตรーマ細胞への接着性に変化は認められなかった。

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 8件)

1. Katakai T. Live Imaging of Interstitial T Cell Migration Using Lymph Node Slices. *Methods Mol Biol.* 1763:29-42. (2018). doi: 10.1007/978-1-4939-7762-8\_4.
2. Kurosawa Y., Ozawa M., Kanda Y., Takeuchi A., Kawamura T., Narita I., Katakai T. Extensively reorganized systemic lymph nodes provide a feasible environment for self-reactivity in lupus-prone NZB/NZW F1 mice. *Int Immunol.* 29:567-579. (2017). 査読あり doi: 10.1093/intimm/dxx066.
3. Kozai M., Kubo Y., Katakai T., Kondo H., Kiyonari H., Schaeuble K., Luther S.A., Ishimaru N., Ohigashi I., Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. *J Exp Med.* 214:1925-1935. (2017). 査読あり doi: 10.1084/jem.20161864.
4. Katakai T., Kinashi T. Microenvironmental control of high-speed interstitial T cell migration in the lymph node. *Front Immunol.* 7:Article 194, (2016). 査読あり doi: 10.3389/fimmu.2016.00194.
5. Takeuchi A., Badr Mel S., Miyauchi K., Ishihara C., Onishi R., Guo Z., Sasaki Y., Ike H., Takumi A., Tsuji N.M., Murakami Y., Katakai T., Kubo M., Saito T. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J Exp Med.* 213:123-138. (2016). 査読あり doi: 10.1084/jem.20150519.
6. 片貝智哉 「蛍光イメージングで探るリンパ節の動的細密構造」  
臨床免疫・アレルギー科 69:326-332、(2018)
7. 片貝智哉 「リンパ節の組織微小環境に制御されるT細胞の高速遊走」  
生化学 88:615-620、(2016)
8. 片貝智哉 「リンパ節におけるTリンパ球の動態制御機構」

新潟医学会雑誌 130:269-274、  
(2016)

[学会発表](計 7件)

1. Katakai T. Fine structure of multi-layered lymph node subcompartments and fibroblastic stromal cell subsets. CIML/Japan joint symposium for immunology. 2018年3月22日 Centre d'Immunologie de Marseille Luminy (CIML), (フランス・マルセイユ)
2. 片貝智哉 「二次リンパ器官の発達とストローマ細胞分化におけるNF-κBシグナルの意義」  
第5回先進イメージング医学研究会  
2018年1月12日 有馬グランドホテル (兵庫県・神戸市)
3. 片貝智哉 「リンパ節のストローマ構造とリンパ球動態」  
第41回日本リンパ学会総会 リンポジウム3 S3-1  
2017年6月3日 鹿児島県医師会館 (鹿児島県・鹿児島市)
4. 片貝智哉 「リンパ節におけるストローマ細胞サブセット層状亜区画構造」  
第4回先進イメージング医学研究会  
2017年2月20日 有馬グランドホテル (兵庫県・神戸市)
5. Takeuchi A., Ozawa M., Kanda Y., Ohigashi I., Kawamura T., Umemoto E., Miyasaka M., Ludewig B., Takahama Y., Nagasawa T., Katakai T. Six different types of mesenchymal stromal cells provide the framework of multi-layered sub compartments in lymph node. 第46回日本免疫学会学術集会  
2017年12月12日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
6. Kanda Y., Takeuchi A., Ozawa M., Matsuno K., Kinashi T., Katakai T. Live imaging of the allogeneic T cell elimination in secondary lymphoid organs. 第46回日本免疫学会学術集会  
2017年12月12日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
7. Kanda Y., Takeuchi A., Ozawa M., Kawamura T., Matsuno K., Kinashi T., Katakai T. Visualizing the rapid and dynamic elimination of allogeneic T cells in the secondary lymphoid organs. 第45回日本免疫学会学術集会

2016年12月7日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

〔図書〕(計 4件)

1. Katakai T. Stromal cells in secondary lymphoid organs. Elsevier Ltd. *Encyclopedia of Immunobiology*. pp473. (2016) ISBN: 978-0-08-092152-5
2. 片貝智哉 「Q89:リンパ組織のストローマ細胞はどのように調製すればよいでしょうか？」  
実験医学別冊「フローサイトメトリーQ&A」(戸村道夫編)  
第8章 p268-271、(2017)
3. 片貝智哉 「からだの中を動きまわる免疫細胞」  
生命誌 年間号 vol.88-91 ゆらぐ、新曜社 p114-116. (2017)
4. 片貝智哉 「からだの中を動きまわる免疫細胞」  
生命誌 89号 (2016)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/zoo/welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

片貝 智哉 (KATAKAI, Tomoya)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：00324682

### (2)研究分担者

( )

### (3)連携研究者

神田 泰洋 (KANDA, Yasuhiro)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：00436768

竹内 新 (TAKEUCHI, Arata)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：00360579

### (4)研究協力者

( )