

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32643  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2016～2019  
 課題番号：16K19088  
 研究課題名（和文）胃癌リンパ節辺縁洞を起点とする転移性ニッチの段階的形成と癌間質細胞相互作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of stepwise formation of metastatic niche originating from lymph node marginal sinus of gastric cancer and cancer stromal cell interaction

研究代表者  
 菊地 良直（Kikuchi, Yoshinao）  
 帝京大学・医学部・講師

研究者番号：90512260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌の転移には血行性・リンパ行性・播種の3経路があり、本研究ではリンパ行性転移初期段階の癌細胞を取り巻く環境（癌微小環境）に着目した。胃癌微小環境から放出される分泌タンパクの1種ペリオスチンおよびマイクロRNAの1種miR-21の発現レベルは、リンパ節転移の有無に関連していた。これらの因子の機能解析により、初期リンパ節転移からの進行に重要な役割を果たすことが示された。さらにリンパ節転移の初期段階と体腔内に広がる播種の類似性にも着目したところ、ペリオスチンとmiR-21が癌微小環境を構成するリンパ管内皮細胞や中皮細胞に作用することで、癌促進的に働くことが明らかとなった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで十分に研究が進んでいなかったリンパ節転移初期段階における癌細胞を取り巻く環境で、ペリオスチンとmiR-21という因子が重要な役割を担っていることを示した。また、これまでリンパ節転移の初期段階と播種の類似性に着目する研究はあまり知られていないが、一見異なった転移経路においても、これらの因子が癌細胞の環境を構成するリンパ管内皮細胞や中皮細胞に同様に作用する事が示された。本研究の成果により、ペリオスチンやmiR-21が転移を予測するマーカーとして応用されることが期待されるだけでなく、転移治療の標的因子となる可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：There are three pathways of cancer metastasis: hematogenous, lymphatic, and dissemination. In this study, we focused on the environment (cancer microenvironment) surrounding cancer cells in the early stage of lymphatic metastasis. The expression levels of periostin, a secreted protein, and miR-21, a microRNA, released from the gastric cancer microenvironment, are related to the presence of lymph node metastasis. Analysis of these function showed that they play an important role in progression from early lymph node metastasis. In addition, we focused on the similarity between the early stage of lymph node metastasis and the dissemination pathway that spreads in the body cavity. It was clarified that periostin and miR-21 act as a cancer promoter by acting on lymphatic endothelial cells and mesothelial cells that compose the cancer microenvironment.

研究分野：癌微小環境

キーワード：癌微小環境 癌間質相互作用 癌関連線維芽細胞 中皮間葉転換 ペリオスチン microRNA-21

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の生物学的態度を規定する微小環境：癌細胞の宿主組織内での生物学的態度には、癌細胞自身の遺伝子変異に加えて、癌細胞周囲の非腫瘍性組織が構成する癌微小環境が非常に大きな影響を与えている。癌微小環境には細胞外マトリックス、増殖因子やサイトカインなどの他に、炎症細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞など間葉系組織をなすあらゆる種類の細胞が構成要素に含まれている。我々は骨芽細胞特異的タンパクとして同定されたペリオスチンが、腫瘍間質線維芽細胞(cancer associated fibroblasts, 以下 CAFs)によって癌微小環境に過剰に発現していることを見出し、癌の促進に関与するメカニズムを研究してきた。大腸癌間質では CAFs によりペリオスチンが過剰に発現し腫瘍促進的に作用するが、正常大腸粘膜でも陰窩周囲にペリオスチンは発現しており、もともと粘膜上皮の増殖を制御している分泌タンパクであることも明らかにした(Kikuchi et al. J Histochem Cytochem 2008)。またペリオスチン欠損型マウスを用いたスキルス胃癌細胞株の胃壁同所移植実験により、宿主由来の CAFs が分泌するペリオスチンが ERK のリン酸化を介して癌細胞の増殖を促すメカニズムを報告した(Kikuchi et al. Am J Pathol 2014)。その他の癌間質因子としては microRNA-21(miR-21)が癌関連 microRNA の一種として知られており、当研究室では胃癌間質の microRNA-21 の発現がリンパ節転移を含む各種臨床病理学的因子と相関することを報告した(Uozaki et al. Histopathology 2014)。

(2) リンパ行性転移における metastatic niche の形成：腫瘍の転移経路は、血行性転移・リンパ行性転移・播種に分類されるが、いずれも癌微小環境は極めて重要な役割を担っている。血行性転移では特に研究が進んでおり、癌細胞の転移に先駆けて転移臓器に niche が形成される pre-metastatic niche の概念が提唱され、その機序にも前述のペリオスチンが重要な役割を担っていることが明らかにされた(Malanchi et al. Nature 2012)。リンパ行性転移の metastatic niche の形成を示唆する研究も報告されており、リンパ節転移をきたす前段階でリンパ節にもリンパ管新生がおこることから、リンパ行性転移でも pre-metastatic niche の機序が存在する可能性が示されている(Garmy-Susini et al. PNAS 2013)。血行性転移では、血管内浸潤・血管内輸送・転移巣生着の各ステップで研究が進んでいるが、リンパ行性転移における生着に関しては未解明な部分が多い。病理診断学的には、初期のリンパ節転移巣ではまず辺縁洞を埋めるように癌細胞が増殖していることから、申請者は初期段階の metastatic niche の形成はリンパ節辺縁洞で起こり、ここからリンパ節内に侵入して占拠病変を形成する過程で、新たな metastatic niche の形成が起きていると考えている。

(3) リンパ行性転移と播種性転移の関連性：漿膜腔は中皮細胞で囲まれた閉鎖腔で、リンパ管もリンパ管内皮細胞で囲まれた閉鎖腔であるが、腹膜腔・胸膜腔・心膜腔・髄膜腔などの全ての漿膜腔は前リンパ管腔あるいはリンパ管前腔だといえる(小谷, リンパ学 2012)。漿膜腔を裏打ちする中皮細胞は、漿膜内の毛細リンパ管を構成するリンパ管内皮に直接移行しており、リンパ行性転移および播種性転移を考える際には、中皮細胞とリンパ管内皮細胞の関連性は重要である。近年、腹膜播種巣の metastatic niche の形成機序において、microRNA・DNA・タンパク質などを内包する直径 40-150nm の細胞外分泌小胞の1つであるエクソソームが注目を集めている。内包物は、体液中の RNase やプロテアーゼによる分解を逃れることができ、安定した状態で存在している。播種巣の微小環境では、中皮細胞が中皮間葉転換によって癌間質に動員され、CAFs として機能することが報告されている(Sandoval et al. J Pathol 2013)。これまでにリンパ節転移と播種性転移の類似性に関する研究は知られていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、胃癌のリンパ節転移の各段階で、metastatic niche の形成に関与する腫瘍間質細胞の同定と機能を解析し、それらの相互作用を明らかにすることが目的である。これまでの知見から、リンパ節の metastatic niche 形成は、癌細胞の 辺縁洞到達、 辺縁洞からリンパ節内部への進展、 リンパ節内占拠病変の形成、 上流リンパ節への転移のそれぞれの段階で起きていることが予想される。これらの相互作用には、ペリオスチンなどの分泌タンパクをはじめ、各種サイトカインやケモカイン、microRNA などが重要な役割を担っていることが予想される。はじめに metastatic niche 形成に関与する間質細胞を病理組織学的・組織化学的に特定し、リンパ節中の CAFs の存在やリンパ管新生の状況を明らかにする。続いてこれらの相互作用を担う因子を探索し、治療標的となる可能性も踏まえて評価することが目標である。

### 3. 研究の方法

(1) 胃癌手術材料の病理組織学的解析：帝京大学医学部附属病院で切除された胃癌症例の Tissue Microarray (TMA) および所属リンパ節の組織標本を用いて免疫染色および in situ hybridization (ISH) による組織化学的解析を行う。リンパ節転移陰性例では、 原発巣リンパ管侵襲(-)の所属リンパ節、 原発巣リンパ管侵襲(+)の所属リンパ節。リンパ節転移陽性例では、 転移リンパ節と同一領域内の転移(-)の所属リンパ節、 辺縁洞にのみ癌細胞が侵入した転移リンパ節、 癌細胞がリンパ節内を占拠した転移リンパ節に細分類する。CAFs の機能的因子としてペリオスチンや miR-21 に着目し、細分類したリンパ節間で比較検討を行う。

(2) リンパ節転移巣における CAFs 機能因子の細胞培養実験による解析：CAF の機能的因子としてペリオスチンや miR-21 を解析する。初代培養リンパ管内皮細胞やこれと発生学的に類似性の高い細胞として中皮細胞の細胞株を用いて、ペリオスチンや miR-21 の機能解析を行う。

(3) リンパ節転移辺縁洞と胸腔播種の癌微小環境の相同性の解析：初期リンパ節転移におけるリンパ節辺縁洞を漿膜腔と見立てた場合に、ここに形成される癌微小環境と胸腔播種の微小環境に相同性が存在するかを解析する。具体的には、肺癌手術時の胸腔洗浄液中に含まれるエクソソーム内因子を解析し、ここに含まれるリンパ節転移相関因子が中皮細胞やリンパ管内皮細胞に中皮間葉転換を誘導するかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 胃癌微小環境におけるペリオスチン発現とリンパ節転移との相関：Cancer Genome Atlas (TCGA) で公開されているデータを用いた *in silico* の解析を行った。ペリオスチンの発現は採取サンプルの間質で補正する必要があるため、vimentin の発現量で補正した (Kikuchi et al. Am J Pathol 2014)。この結果、diffuse type の胃癌では間質のペリオスチン発現がリンパ節転移に相関することが明らかとなった。TMA を用いたペリオスチンの免疫染色による半定量的解析においても、早期癌では間質ペリオスチンの発現がリンパ節転移に相関する結果が得られた。

(2) 胃癌リンパ節転移におけるリンパ節内リンパ管新生とペリオスチンの発現：胃癌手術材料を用いて、D2-40 の免疫染色によるリンパ節内リンパ管新生の程度を、前述の各段階において評価した。この結果リンパ節内部のリンパ管新生は、癌細胞が辺縁洞に到達してから有意な上昇がみられた (図 1)。リンパ節転移巣のペリオスチンの免疫染色では、胃癌細胞を辺縁洞にのみ認めるリンパ節では、ペリオスチンの発現は癌細胞が接する辺縁洞に局限して認められた。ペリオスチンは分泌タンパクであるため、これを産生している細胞を正確に評価するために、ISH 法によるペリオスチン mRNA の検出を試みたところ、辺縁洞癌細胞に接するリンパ節被膜でペリオスチン mRNA のシグナルを検出した (図 2)。初期リンパ節転移では原発巣間質のペリオスチンがリンパ管経由で所属リンパ節に作用している可能性が考えられるが、特に癌細胞が辺縁洞に到達した段階ではリンパ節被膜からもペリオスチンが産生され、これがリンパ節内リンパ管新生に作用している可能性が示唆された。癌細胞がリンパ節内に広く浸潤したリンパ節転移巣では、高度な間質の線維化がみられ、SMA 陽性の CAFs が多数認められた。同部では免疫組織化学的にペリオスチンの過剰発現が認められ、CAFs がペリオスチンを発現していた。この段階では、高度なリンパ節内リンパ管新生が起こっており (図 1)、間質ペリオスチンの過剰発現により誘導されていることが考えられた。

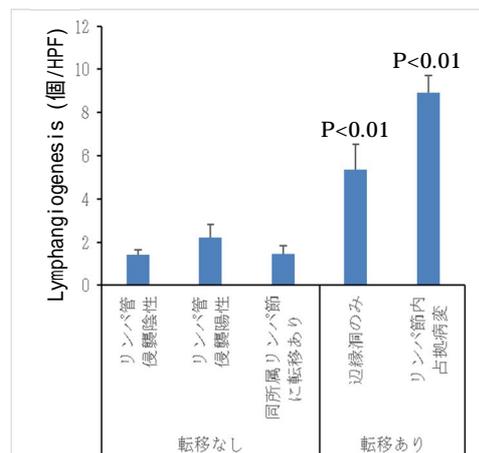


図 1：リンパ節内リンパ管新生

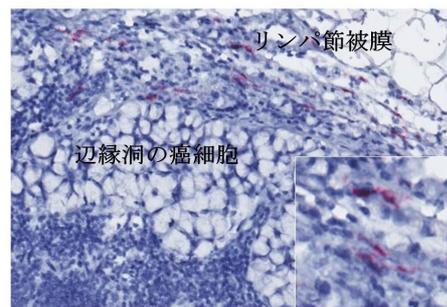


図 2：リンパ節辺縁洞のペリオスチン発現

(3) ペリオスチンおよび miR-21 のリンパ管内皮および中皮細胞への作用：ここまでの研究結果および過去の当研究室の研究結果と合わせて、ペリオスチンと miR-21 はリンパ節転移に相関することが明らかとなったため、培養細胞実験によるこれらの因子の機能解析を行った。リンパ管内皮細胞は初代培養細胞を用いたが、リンパ管内皮の細胞株が存在しないため、miR-21 の解析ではリンパ管内皮と発生学的にも相同性あるいは類似性がある中皮細胞の細胞株 (Met-5A) も用いた。ペリオスチンを過剰発現させた線維芽細胞株 (NIH3T3) の培養上清を初代培養リンパ管内皮細胞に作用させ、増殖能アッセイ (MTT assay) を行ったところ、リンパ管内皮細胞の増殖能の亢進が確認された。in vitro の解析においても、ペリオスチンがリンパ節内リンパ管新生を誘導している可能性が示唆された。miR-21 の機能解析では、内在する microRNA が安定であるエクソソームに着目し、エクソソーム内 miR-21 の機能を解析した。エクソソーム内 miR-21 が過剰発現となる NIH3T3 を作製し、エクソソーム内 miR-21 を作用させる実験を行ったが増殖能亢進作用は明らかではなかった。一方で、エクソソーム内 miR-21 を作用させたリンパ管内皮細胞や中皮細胞株では、SMA の発現上昇や

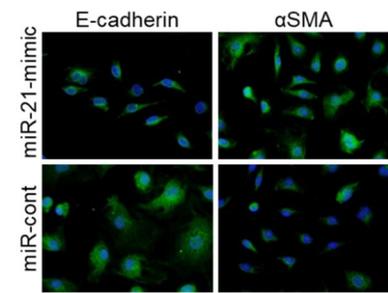


図 3：リンパ管内皮への miR-21 の作用

E-cadherin の発現減少が確認された(図 3)。これらは、播種巣微小環境における中皮間葉転換マーカーとして知られており、リンパ節転移巣においても同様の変化が起きている可能性が考えられた。

(4) リンパ節転移辺縁洞と播種性転移巣における癌微小環境の相同性：リンパ節辺縁洞および播種性転移におけるエクソソーム内 miR-21 の機能を解析するため、肺腺癌の胸腔播種に関して解析を行った。まず、肺腺癌における miR-21 の機能解析の妥当性を検証するために、TCGA で公開されているデータを用いた insilico の解析を行った結果、肺腺癌組織中の miR-21 の高発現群では予後不良となる結果が得られた。また肺腺癌 TMA を用いた miR-21 の ISH による半定量的解析の結果、肺腺癌間質の miR-21 の高発現群が予後不良となった(図 4)。続いて、リンパ節辺縁洞を胸腔に見立てた場合の腔内因子として、エクソソーム内 miR-21 に着目し、肺癌手術時胸腔洗浄液からエクソソームの抽出を試みた。抽出されたエクソソーム内の miR-21 コピー数をデジタル PCR で計測したところ、胸腔内に癌細胞が存在する症例では高い値になり、さらに胸腔内に癌細胞が存在しない症例においても、胸膜に癌細胞が浸潤している症例では、胸膜浸潤が認められない症例と比べて有意に高い値となった(図 5)。肺腺癌の胸膜播種においても、これまで腹膜播種巣で知られていた中皮間葉転換が誘導されているかを確かめるために、胸膜播種巣の組織学的解析を行ったところ、播種巣の間質にみられる CAFs は中皮細胞マーカーが陽性であり、これらは中皮間葉転換によって誘導された中皮細胞由来の細胞であることが示唆された。また ISH 法の解析ではこのような胸膜播種巣間質には miR-21 の高発現が確認された。前述の細胞実験で、エクソソーム内 miR-21 の作用によってリンパ管内皮細胞や中皮細胞株に中皮間葉転換マーカーの発現が誘導されたことと合わせて、胸腔内のエクソソーム内 miR-21 が中皮間葉転換を誘導している可能性が考えられた。エクソソーム内 miR-21 の中皮細胞あるいはリンパ管内皮細胞への作用を検討するために、中皮細胞株(Met-5A)に miR-21 を遺伝子導入して過剰発現させ、機能解析を行った。これまでの我々の研究で、ペリオスチンを線維芽細胞に過剰発現させた場合は、活性型の線維芽細胞つまり筋線維芽細胞に形質が変わり、CAF の機能として特徴的な遊走能亢進や、コラーゲンゲルの収縮能亢進が起ることを確認していた。そのため、miR-21 を遺伝子導入した中皮細胞株が同様に CAFs としての機能を獲得しているかを確認するために、wound healing assay およびコラーゲンゲルの contraction assay を行った。この結果、miR-21 を過剰発現している中皮細胞株の遊走能亢進およびコラーゲンゲルの収縮能亢進が確認され、miR-21 が単に中皮間葉転換マーカーを誘導するのみでなく、機能的にも CAFs に相当する細胞に形質を変化させることが証明された(図 7)。中皮細胞とリンパ管内皮細胞は D2-40 など同じ発現マーカーを有し、近縁の細胞である。つまり播種巣における中皮間葉転換と同様の現象が、リンパ節転移巣の特に辺縁洞からリンパ節内に癌細胞が進展する際にも起こっている可能性がある。現在、リンパ節転移巣の癌間質にみられる CAFs の由来を探索するため、リンパ管内皮マーカーを初めとする各種マーカーで組織学的解析を継続している。

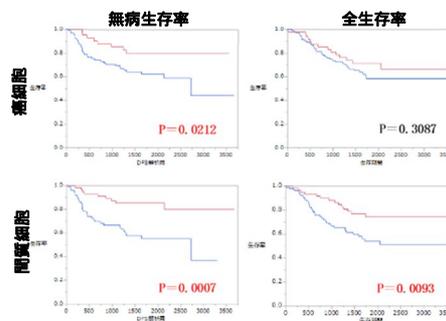


図 4：肺腺癌の miR-21 発現と予後

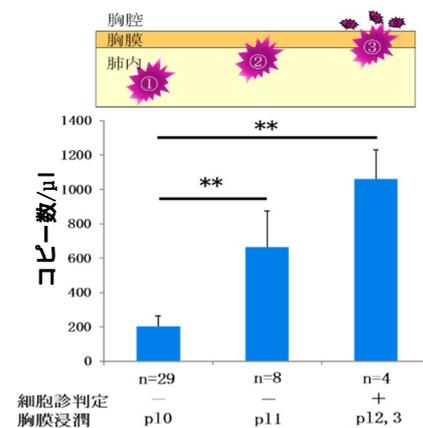


図 5：胸腔洗浄液エクソソーム内 miR-21 発現

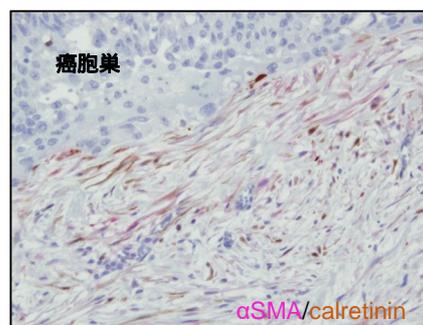


図 6：播種巣における中皮間葉転換

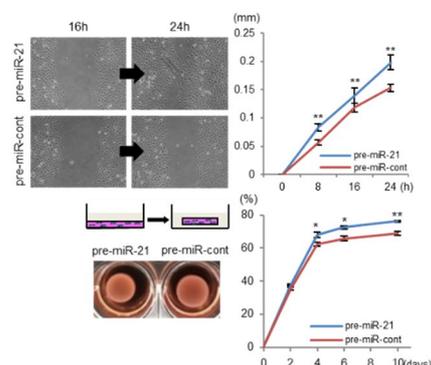


図 7：中皮細胞の遊走能および収縮能

<引用文献>

Kikuchi Y, Kashima GT, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M, et al. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem Cytochem* 2008;56:753-764.

Kikuchi Y, Kunita A, Iwata C, Komura D, Nishiyama T, Shimazu K, et al. Periostin, a niche component, is produced by cancer-associated fibroblasts, supporting growth of gastric cancer through ERK activation. *Am J Pathol* 2014;184:859-870.

Uozaki H, Morita S, Kumagai A, Aso T, Soejima Y, Takahashi Y, et al. Stromal miR-21 is more important than miR-21 of tumour cells for the progression of gastric cancer. *Histopathology* 2014;65:775-783.

Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2011;481:85-89.

Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Desgrosellier JS, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, et al. PI3K Activates Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  to Establish a Metastatic Niche in Lymph Nodes *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9042-9047.

小谷正彦. リンパ管の不思議. *リンパ学* 2012;35:66-80.

Sandoval P, Jimenez-Heffernan JA, Rynne-Vidal A, Perez-Lozano ML, Gilsanz A, Ruiz-Carpio V, et al. Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J Pathol* 2013;231:517-531.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watabe Shiori, Kikuchi Yoshinao, Morita Shigeki, Komura Daisuke, Numakura Satoe, Kumagai Togashi Arisa, Watanabe Masato, Matsutani Noriyuki, Kawamura Masafumi, Yasuda Masanori, Uozaki Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinicopathological significance of microRNA 21 in extracellular vesicles of pleural lavage fluid of lung adenocarcinoma and its functions inducing the mesothelial to mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2879 ~ 2890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1002/cam4.2928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直, 森田茂樹, 富樫有紗, 渡邊雅人, 松谷哲行, 河村雅文, 安田政実, 宇於崎宏
2. 発表標題 肺癌胸腔洗浄液中のエクソソーム内miR-21発現量は細胞診判定と胸膜浸潤を判定する
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼倉里枝, 西東瑠璃, 富樫有紗, 渡部朱織, 渡邊雅人, 菊地良直, 宇於崎宏
2. 発表標題 胃癌間質におけるCD90発現の意義
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直, 富樫有紗, 渡邊雅人, 松谷哲行, 河村雅文, 安田政実, 宇於崎宏
2. 発表標題 肺腺癌組織および術前胸腔洗浄液中細胞外分泌小胞に含まれるmiR-21の発現は胸膜浸潤と相関する
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷有紗, 渡部朱織, 渡邊雅人, 菊地良直, 宇於崎宏
2. 発表標題 尿路上皮癌間質におけるCD10、Periostin、Podoplaninの発現
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直, 富樫有紗, 渡邊雅人, 松谷哲行, 河村雅文, 安田政実, 宇於崎宏
2. 発表標題 肺腺癌組織および術前胸腔洗浄液中細胞外分泌小胞に含まれるmiR-21の発現は胸膜浸潤と相関する
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直
2. 発表標題 胸腔洗浄液中エクソソーム内microRNA-21の臨床病理学的有用性
3. 学会等名 第56回首都圏支部・関甲信支部医学検査学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宇於崎 宏  (Uozaki Hiroshi)  (10296246)		

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松谷 哲行 (Matsutani Noriyuki) (60621943)		
研究協力者	森田 茂樹 (Morita Shigeki)		
研究協力者	河村 大輔 (Komura Daisuke) (10776082)		
研究協力者	渡部 朱織 (Watabe Shiori) (50749760)		