

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014047

研究課題名（和文） がん組織におけるリンパ管新生の分子機構

研究課題名（英文） Lymphangiogenesis in cancer

研究代表者

久保 肇 (KUBO HAJIME)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50362520

研究成果の概要（和文）：がんの治療において、転移の制御は重要である。我々は、転移の新しいメカニズムとして、1) がん組織におけるリンパ管新生機構、2) 転移巣におけるがん幹細胞の誘導、という新規概念を提唱した。リンパ管新生は、がん細胞がリンパ節へ転移することを促進するので、それを抑制する治療法が転移を阻止することを示した。また、転移の詳細な機構として、がん幹細胞自身はリンパ管新生能がないことを示した。転移巣での間質細胞との相互作用によって、がん幹細胞は誘導されることを示し、新規治療標的を提示することに繋がった。

研究成果の概要（英文）：To find the way of the inhibition of metastasis is important for cancer therapy. We found 2 important mechanisms in metastasis; 1) the role of lymphangiogenesis, 2) the induction of cancer stem cells from non-cancer stem cells. Lymphangiogenesis promotes the metastasis. We succeeded the inhibition of metastasis by anti-lymphangiogenesis therapy in mouse model. However, we found that cancer stem cells don't have the potential of lymphangiogenesis. To inhibit the metastasis, it could be important to target the induction of cancer stem cells in the metastatic sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,400,000	0	8,400,000
2006 年度	9,800,000	0	9,800,000
2007 年度	9,800,000	0	9,800,000
2008 年度	8,700,000	0	8,700,000
2009 年度	8,700,000	0	8,700,000
総計	45,400,000	0	45,400,000

キーワード：リンパ管新生、転移、がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がんの治療において、転移の制御は重要である。しかし、研究開始当初は、転移そのものを標的とした研究自体がほとんど見られなかった。血管新生の基礎研究は隆盛だったが、リンパ管新生の研究は黎明期であった。また、

当時は、「がん幹細胞」の概念そのものが懐疑的であり、さらに転移と関連づけた研究は皆無であった。その中で、我々は、以下の目的に示すような2つの新しい仮説をもって研究を始めた。

2. 研究の目的

我々は、がん細胞がリンパ管新生因子 VEGF-C を分泌することで腫瘍リンパ管新生を誘導し、結果リンパ節転移を促進する過程を解析し、治療に結び付けたいと考えている。一方で、「がんの転移が成立するためには『がん幹細胞』が転移する必要がある」という仮説がある。がん幹細胞を分離し、がん幹細胞とリンパ管新生の関連を解析し、がん幹細胞とリンパ管新生いずれも標的とする、がん転移に対する新規の治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

E S細胞を用いたリンパ管内皮細胞の文化誘導実験

FACSを用いて podoplanin 陽性細胞の分離・培養、その移植実験。

prox1 cKO マウスの作成と解析

リンパ節転移マウスモデルの作成

炎症におけるリンパ管新生の役割

がん幹細胞の分離・培養とマイクロアレイ

がん間質細胞の分離・培養

転移モデルにおけるがん幹細胞、がん間質細胞の役割とリンパ管新生能力の評価

心臓リンパ管を対象とした基礎実験

4. 研究成果

がんリンパ管新生

(1) リンパ管内皮細胞の発生・分化

ES細胞から LIF を除くと、VEGFR2+の血管前駆細胞が分化誘導される。我々は、VEGFR2+細胞を FACS によって分離し、OP9 ストローマ細胞上で再培養した。結果、VEGFR3+LYVE1+prox1-VEcad+細胞を経て、prox1+VEcad+のリンパ管内皮細胞が分化誘導された。この系を用いて、リンパ管内皮細胞分化に VEGF-C, angiopoietin1 が必須であること、Notch1 は分化を阻害することなどを明らかにした。この系は、動・静脈・リンパ管の分化を詳細に研究するよい系となる可能性がある。

(2) リンパ管関連分子 prox1, podoplanin の解析

a. ホメオボックス遺伝子 prox1 はリンパ管内皮細胞分化のマスター遺伝子として知られる一方、Drosophila のホモログ Prospero は、神経幹細胞の非対称分裂に必須の遺伝子であることがわかってきた。我々は、prox1 がリンパ管のみならず、肝がん・膵がん・大腸がんなど多くのがん細胞に発現することを示した。Tet system を用いた gain-of-function および siRNA によって、prox1 はがん細胞のトランスフォーメーシ

ンと増殖を抑制した。臨床症例における prox1 の発現はがん細胞の分化度と相関し、prox1 は新規のがん抑制遺伝子と示唆された。ゲノム解析から、prox1 には DNA 変異は認められなかったが、mRNA のレベルでの変異がみられた。変異型 prox1 は正常 prox1 の機能をもたず、loss-of-function 変異であった。ゲノム変異なく、RNA の編集による新しいがん進展機構の可能性がある。

b. 抗 podoplanin 抗体を作成した。これを用いて、多様な種類のがん細胞に podoplanin が発現することがわかった。組織アレイを使って、数百例の臨床サンプルを評価すると、肺がんなどで podoplanin の発現とリンパ節転移が相関することがわかった。

(3) 炎症におけるリンパ管の役割と、抗リンパ管新生療法の効果

a. 炎症および免疫とリンパ節の関連は多く研究されているが、その際のリンパ管(新生)の役割はよくわかっていない。そこで、心筋炎モデルマウスを用いて炎症とリンパ管新生の関連について調べた。心筋は免疫組織学的にはリンパ管マーカー陽性のリンパ管が存在しない組織であり、リンパ管新生を評価する上でよいモデルと考えた。マウスに EMC virus を感染させると 14 日間の炎症期を経て、慢性期に入ってゆき、90 日頃には拡張型心筋症になる。90 日のマウスでは、心筋に高度のリンパ管新生が誘導された。このモデルで、抗リンパ管新生療法として、Ad-VEGFR3-Fc を投与し、Ad-LacZ と比較した。結果、Ad-VEGFR3-Fc 群では、リンパ管新生を抑制し、炎症も緩和された。また、マウスカテーテル法による心機能検査でも、機能の保持が確認された。

b. 一方、虚血性心疾患では、リンパ管新生を促進することで心筋浮腫を抑制し、結果的に急性期の左室機能を改善するのではないかという仮説をたてて実験中である。

(4) 新しいリンパ節転移モデルの作成と治療法の検討

我々の研究室では、多くのリンパ節転移モデルを作成し、より臨床に近い実験を目指している。我々は、AJ マウス皮下およびリンパ節で継代した高頻度リンパ節転移 neuroblastoma 細胞株を確立した。このマウスモデルでは、原発巣を切除後にリンパ節転移が顕在化するため、より臨床に近いモデルである。現在、この細胞株の遺伝学的検討を行うとともに、新しいリンパ節転移治療として、alpha-galactosylceramide(GalCer)の効

果を調べた。結果、alpha-GalCer 投与群は、有意にリンパ節転移を阻止した。現在、NKT 活性、リンパ管新生などこの薬剤効果の機構を検討している。

がん幹細胞とリンパ管新生

． がん幹細胞の分離・培養とリンパ管新生の評価

1) 大腸がんのがん幹細胞の分離・培養

細胞株HCT116のうちCD133+細胞とCD133-細胞を分離・培養し、CD133+細胞ががん幹細胞の能力を有することを証明した。肝臓の間質細胞によって、CD133-細胞からCD133+癌幹細胞が誘導できることを示した。一方で、その他の間質細胞では、同様の結果が得られないことがわかった。

2) リンパ管新生の評価

CD133+細胞とCD133-細胞をマイクロアレイで比較し、CD133+細胞に有意にVEGF-Cなどのリンパ管新生因子の発現が高くないことがわかった。つまり、がん幹細胞は、VEGF-Cを産生するがん細胞を生み出す多様性を保証するが、リンパ管新生を誘導する細胞ではないことがわかった。

． その他のがん腫で同様のことが見られるか？

乳癌および膀胱がん、前立腺がん株で同様の実験をいったが、肝臓の間質細胞は、同様の結果を誘導しなかった。以上の結果は、大腸がんが肝臓に転移するという”seed and soil”の概念を説明するものかもしれない。今後、肺および脳、骨髄の間質細胞の効果を調べる予定である。

． その他の疾患におけるリンパ管新生の役割

1) マウスにおける心臓疾患モデル（心筋梗塞、心筋炎、高血圧負荷）において、リンパ管新生を調べた結果、急性期にリンパ管新生が誘導されていることがわかった。それら、疾患モデルにおいて、adeno-VEGFR3-Fcによる「抗リンパ管新生」あるいはadeno-VEGF-Cによる「リンパ管新生」の処理をした。結果、それぞれにおいて、心不全が改善されることがわかった。

2) ヒトのサンプルにおいても、心筋層にリンパ管新生が誘導されていることを示した。

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 17 件)

すべて査読有

1. Matsusue R, * Kubo H, Hisamori S, Okoshi K, Takagi H, Hida K, Nakano K, Itami A, Kawada K, Nagayama S, Sakai Y. Hepatic Stellate Cells Promote Liver Metastasis of Colon Cancer Cells by the Action of SDF-1/CXCR4 Axis. Ann Surg Oncol. 16(9):2645-53, 2009.
2. Nagayama S, Yamada E, Kohno Y, Aoyama T, Fukukawa C, Kubo H, Watanabe G, Katagiri T, Nakamura Y, Sakai Y, Toguchida J.: Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors. Cancer Sci. 2009 Mar;100(3):405-12. Epub 2008 Dec 24.
3. Kae Okoshi, * Hajime Kubo, Satoshi Nagayama, Chiharu Tabata, Yoshio Kadokawa, Shigeo Hisamori, Yoshikuni Yonenaga, Akihisa Fujimoto, Akira Mori, Hisashi Onodera, Go Watanabe, Yoshiharu Sakai: All-trans-retinoic acid attenuates radiation-induced intestinal fibrosis in mice. J Surg Res. 150: 53-59, 2008.
4. Shigeo Hisamori, Chiharu Tabata, Yoshio Kadokawa, Kae Okoshi, Rie Tabata, Akira Mori, Satoshi Nagayama, Go Watanabe, * Hajime Kubo, Yoshiharu Sakai: All-trans-retinoic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through modulating cytokine production. Liver Int. 28: 1217-1225, 2008.
5. Kono T, Shimoda M, Takahashi M, Matsumoto K, Yoshimoto T, Mizutani M, Tabata C, Okoshi K, Wada H and * Kubo H: Immunohistochemical detection of the lymphatic marker podoplanin in diverse types of human cancer cells using a novel antibody. Int J Oncol. 31(3):501-8, 2007
6. Yoshimoto T, Takahashi M, Nagayama S, Watanabe G, Shimada Y, Sakai Y and * Kubo H: RNA mutations of prox1 detected in human esophageal cancer cells by the shifted termination assay. BBRC 359(2):258-62, 2007
7. Mori M, Itoi M, Taukamoto N, Kubo H and Amagai T: The Perivascular space as a path of Hematopoietic progenitor cells and Mature T cells between the blood circulation and the Thymic parenchyma. Int Immunol. 19(6):745-53, 2007
8. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, Nakano T and Kubo H: Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. J Immunol. 179(1):708-14, 2007
9. Mishima K, Watabe T, Saito A, Yoshimatsu Y, Imaizumi N, Masui S, Hirashima M,

- Morisada T, Oike Y, Araie M, Niwa H, Kubo H, Suda T and Miyazono K: Prox1 Induces Lymphatic Endothelial Differentiation via Integrin {alpha}9 and Other Signaling Cascades. Mol Biol Cell. 18(4):1421-9, 2007
10. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, *Kubo H and Ikai I: Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate the in vitro maturation of hepatic progenitor cells. Am J Physiol Gastr Liver Physiol. 292: G526-534, 2007.
 11. Takahashi M, Yoshimoto T, Shimoda M, Kono T, Koizumi M, Yazumi S, Shimada Y, Doi R, Chiba T and *Kubo H: Loss of function of the candidate tumor suppressor prox1 by RNA mutation in human cancer cells. Neoplasia 8: 1003-1010, 2006.
 12. Tabata C, Kadokawa Y, Tabata R, Takahashi M, Okoshi K, Sakai Y, Mishima M and Kubo H: All-trans-retinoic acid prevents radiation- or bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 174:1352-60, 2006.
 13. Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, Kono T, Ikai I and *Kubo H: A homeobox protein prox1 is involved in the differentiation, proliferation and prognosis in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 12:6005-11, 2006.
 14. Tabata C, Kubo H, Tabata R, Wada M, Sakuma K, Ichikawa M, Fujita S, Mio T and Mishima M: All-trans retinoic acid modulates proliferation of lung fibroblasts via IL-6/IL-6R system. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 290: L597-L606, 2006.
 15. Kono T, *Kubo H (equally first author), Shimazu C, Ueda Y, Takahashi M, Yanagi K, Fujita N, Tsuruo T, Wada H and Yamashita JK: Differentiation of lymphatic endothelial cells from Embryonic Stem cells on OP9 stromal cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26: 2070-2076, 2006.
 16. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG: Vascular endothelial growth factor-D is dispensable for development of the lymphatic system. Mol Cell Biol. 25:2441-9, 2005.
 17. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, Sato T, Kubo H, Gomi K, Shibuya K, Fukuchi Y, Suda K: Lymphangiogenesis-Mediated Shedding of LAM Cell Clusters as a Mechanism for Dissemination in Lymphangioliomyomatosis. Am J Surg Pathol. 29:1356-1366, 2005.
- 〔学会発表〕(計15件)
1. 久保肇: 大腸がんの肝転移における星細胞による誘導がん幹細胞(iCSC)の役割、第18回がん転移学会学術集会、シンポジウム(2009年7月23日、旭川)
 2. 久保肇: 消化器癌転移の新しい分子機構と新規治療法:リンパ管新生および癌幹細胞の研究、第62回日本消化器外科学会総会、シンポジウム(2007年7月18-20日、福岡)
 3. 久保肇: リンパ管新生とがん転移、第30回日本リンパ学会、シンポジウム(2006年6月1-3日、東京)
 4. 久保肇: リンパ管新生と癌、第2回 Summer Vascular Conference(2006年9月2日、軽井沢)
 5. 久保肇: リンパ管新生の分子機構とがんリンパ節転移、第8回 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会学術集会、サテライトシンポジウム(2006年11月17-18日、東京)
 6. Kubo, H.: Lymphangiogenesis and cancer, The 11th International Congress of Metastasis Research Society, Plenary Sessions, (Sep, 3-6, 2006, Tokushima)
 7. 久保肇: リンパ管新生の分子機構の解明とがんリンパ節転移制御、第78回日本薬理学会年会、シンポジウム(2005年3月22-24日、横浜)
 8. 河野朋哉、久保肇: Differentiation of Lymphatic endothelial cells from ES cells, AIM meeting, ポスター(2005年5月19-21日、熊本)
 9. 久保肇: リンパ管内皮細胞分化にかかわる分子、第29回日本リンパ学会、シンポジウム(2005年7月15-17日、宇部)
 10. 久保肇: がんとリンパ管;そしてリンパ管関連分子とがんについて、第1回先端がん転移研究交流会(2005年8月19-20日、鳴門)
 11. 高橋めい子、吉本貴宣、久保肇: ヒト癌細胞におけるホメオボックス遺伝子のRNA編集、第64回日本癌学会、ポスター(2005年9月14日16日、札幌)
 12. 久保肇: リンパ管新生の分子機構とがんリンパ節転移、第64回日本癌学会、シンポジウム(2005年9月14日16日、札幌)
 13. 久保肇: リンパ管新生研究の新しい知見、第28回日本分子生物学会、シンポジウム(2005年12月7-10日、福岡)
 14. Kubo, H.: Lymphangiogenesis and cancer, International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, Symposium (Jan, 20, 2005,

- Kanazawa)
15. Kubo, H.: Recent progress in lymphangiogenesis research, Korea-Japan Joint Symposium Vascular Biology, Symposium (Aug, 10-12, 2005, Chuncheon)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久保 肇 (KUBO HAJIME)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 5 0 3 6 2 5 2 0