

平成 22 年 3 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590394
 研究課題名（和文）：GFP 遺伝子導入胃癌・大腸癌細胞株を用いたリンパ節転移機構の解析
 研究課題名
 （英文）：Mechanistic analysis of lymph node metastasis using gastric and
 colonic cancer cell lines tagged with GFP
 研究代表者：
 中西 速夫（NAKANISHI HAYAO）
 愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍病理学部・室長
 研究者番号：20207830

研究成果の概要：

胃がん、大腸がんの予後を規定する最も重要な因子であるリンパ節転移の機構を解明するため、臨床病理学的ならびに実験的に腫瘍リンパ管新生について検討し、以下の諸点を明らかにした。1) 消化器がんにおける腫瘍リンパ管新生の *in vivo* における実態を明らかにするためにリンパ管内皮特異抗体D2-40を用いて胃癌50例、大腸癌61例のリンパ管新生を免疫組織学的に検討した。その結果、いずれの腫瘍においてもリンパ管新生は血管新生のように腫瘍組織内では殆ど起こらず、主として腫瘍周囲で起こることを明らかにした。VEGF-Cの発現はこれとよく一致して周囲正常上皮に比べ腫瘍細胞でむしろ減少傾向が認められたことから、リンパ管新生はVEGF-Cが既存のリンパ管に作用して誘導される可能性が示唆された。2) 次にこれら臨床例の腫瘍リンパ管新生に関する観察結果を実験的に検証するために GFP 遺伝子を導入した胃癌、大腸癌リンパ節転移細胞株と *microlymphangiography* を組み合わせて腫瘍リンパ管新生をヌードマウス皮下移植系で実験的に解析した。その結果、上記臨床例の観察結果とよく一致して、リンパ管新生は腫瘍組織内ではなくむしろ腫瘍周囲の既存のリンパ管で起こり、腫瘍細胞のリンパ管侵襲も腫瘍辺縁部で起きている可能性が示唆された。3) VEGF-Cのリンパ節転移における役割を明らかにするため、リンパ節非転移性で、VEGF-C低発現ヒト大腸癌細胞株にVEGF-Cを強制発現させた安定発現株ではリンパ節転移の有意な促進は見られなかった。一方、リンパ節転移能を有し、VEGF-Cを高発現するヒト大腸癌細胞株にVEGFC ShRNA plasmidベクターを導入した安定発現株ではリンパ管密度ならびにリンパ節転移能が軽度ながら抑制されたことから、リンパ節転移能の獲得にはVEGF-Cを介したリンパ管新生だけではなく、腫瘍のリンパ管侵襲能も関与している可能性が示唆された。4) 腫瘍細胞とリンパ管との相互作用を解析するためにHPVE6、E7およびhTERT遺伝子を導入して作成したヒト不死化リンパ管内皮細胞株(HuTLEC)および上記大腸癌リンパ節転移細胞株(COLM-5)を組み合わせて構築した *in vitro* 解析システムを用いて、COLM-5細胞の培地中にVEGF-C刺激に比べ数倍高い転写活性を *luciferase assay* で検出し、VEGF-C以外の新しい管腔形成促進因子が存在する可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：腫瘍、転移

1. 研究開始当初の背景

癌のリンパ行性転移は転移のなかでも最も早期から出現し、頻度も高く癌患者の生存予後を決定する最も重要な因子の一つである。近年、VEGF-C/VEGFR3 システムを介したリンパ管新生の分子機構の解析が急速に進み、また podoplanin などのリンパ管内皮特異マーカーも明らかにされ、それらの抗体を用いた腫瘍リンパ管新生とリンパ節転移の関連も数多く報告がなされるようになってきた。このように生理的な条件下におけるリンパ管新生の分子機構や腫瘍リンパ管の組織レベルでの理解は確実に進んだが、リンパ行性転移機構そのものの研究は血行性転移や播種性転移に比べ依然として立ち遅れているのが現状である。その理由としてマウスにおいて再現性よくリンパ節に転移するヒト癌細胞モデルの数が限られており、*in vivo* におけるリンパ節転移機構の解析が困難であったこと、また血行性転移における血管内皮細胞のように、リンパ管内皮細胞の培養株がこれまで殆ど存在せず、*in vitro* における癌細胞とリンパ管内皮細胞との相互作用の研究が困難であったことなどが挙げられる。申請者らは高いリンパ行性転移能を有するヒト胃癌・大腸癌細胞株を樹立し、それらに GFP や DsRed 遺伝子を導入することにより *in vivo* においてリンパ節転移をリアルタイムにあるいは組織染色なしに可視化できる転移モデルを複数株樹立しつつある。これらの *in vivo* モデルを用いてリンパ節微小転移の発育と進展過程の解析、薬剤によるその修飾、リンパ節転移と腫瘍リンパ管新生との関連の解析が可能となってきた。さらに申請者らはリンパ管内皮細胞の初代培養からヒトパピローマウイルス 16 (HPV16) E6、E7 遺伝子およびヒト TERT 遺伝子を導入することにより不死化細胞株を樹立している。これを用いることによりリンパ行性転移能を有するヒト胃癌・大腸癌細胞株との接着、管腔形成などの相互作用に関する *in vitro* 解析系を構築でき、そのシステムを用いて新規腫瘍リンパ管新生促進物質ある

いは阻害物質の探索が可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下のとおりである。

- a) 近年開発されたリンパ管内皮特異抗体、D2-40 や VEGF-C 抗体を用いて大腸癌、胃癌の臨床例における腫瘍リンパ管新生とリンパ管侵襲の *in vivo* における実態を明らかにする。
- b) 高いリンパ節転移能を有する VEGF-C 産生性ヒト大腸癌細胞株、胃癌細胞株に GFP 遺伝子を導入し、微小リンパ節転移の発育と進展過程を詳細に検討する。また本モデルに VEGF-C の強制発現させた細胞株とノックダウンした細胞株を分離し、リンパ管新生ならびにリンパ節転移への影響を検討し、VEGF-C のリンパ節転移における役割を明らかにする。
- c) 世界に先駆けてヒト胸管から樹立した不死化リンパ管内皮細胞株 (HuTLEC) を用いてリンパ管内皮としての分化形質発現や VEGF-C に対する管腔形成能、増殖応答能、シグナル応答能などを詳細に検討し、生物学的、機能的特性を明らかにする。また不死化リンパ管内皮細胞株とリンパ節転移性癌細胞株を用いて両者の相互作用を *in vitro* で解析する系を構築し、大腸癌細胞株から分泌されていると考えられる増殖促進因子や管腔形成誘導因子あるいは阻害因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

- a) 臨床材料 (ホルマリンパラフィン包埋手術標本) を用いた Podoplanin, VEGF-C 発現の免疫組織学的検討
- b) GFP 遺伝子導入リンパ節微小転移モデルを用いたリンパ節微小転移の発育・進展過程の *in vivo* 解析
本モデル系では蛍光イメージング装置 (マクロならびに実体顕微鏡) を用いることによりリンパ節の微小転移の検出が可能であり、これを用いてリンパ節転移の発育・進展過程を詳細に解析する。
- c) VEGF-C 強制発現ならびにノックダウンのヒト大腸癌細胞株のリンパ管新生および転移に及ぼす影響の解析
申請者らはリンパ節転移性大腸癌細胞株 (COLM-5) が mRNA レベルでも、蛋白レベルでも VEGF-C を高発現していることを明らかにしているが、これが本細胞株の主たるリンパ管新生因子か否か、またリンパ節転移に真に関与しているか否かを確認するため、VEGF-C の

発現ベクターならびに ShRNA プラスミド発現ベクターに組み込んで COLM-5 細胞にトランスフェクションし、安定発現株を選別、リンパ管新生およびリンパ節転移に及ぼす影響を *in vivo* で検討する。

d) 不死化リンパ管内皮細胞 (HuTLEC) の生物学的、機能的特性の解析

申請者らはヒト胸管から不死化リンパ管内皮細胞株 (HuTLEC) を世界に先駆けて樹立している。この HuTLEC 細胞のシグナル伝達に VEGF-C 受容体 (FLT-4) が関与しているか否かを明らかにするために HuTLEC 細胞を *in vitro* で VEGF-C で刺激後、リポーター assay により転写活性化を調べることにより HuTLEC 細胞が VEGF-C 受容体 (FLT-4) シグナル伝達機構を保持し、機能的にもリンパ管内皮としての特性を維持しているか否かを明らかにする。

e) ヒト大腸癌細胞株 (COLM-5) 由来リンパ管内皮管腔形成促進・阻害因子の同定の試み

上記 HuTLEC 細胞と大腸癌細胞株から成る *in vitro* 培養システムを用いて各種大腸癌細胞株の培養上清の管腔形成誘導活性を検討する。また最近、PDGF-BB など VEGF-C 以外のリンパ管新生促進因子が報告されており、上記、*in vitro* 培養系を用いてこの点についても検討する。

4. 研究成果

a) 胃癌、大腸癌における腫瘍リンパ管新生の *in vivo* における実態を明らかにするためにリンパ管内皮特異抗体、D2-40 (エピトープは Podoplanin) を用いて臨床例のリンパ管新生の検討をおこなった。その結果、リンパ管新生は血管新生とは異なり腫瘍周囲で起こり、繊維性間質の豊富な腫瘍組織内ではむしろ正常組織に比べ減少していることが明らかとなった。また大腸がん細胞のリンパ管侵襲は腫瘍先進部の芽出 (budding) 部位の新生リンパ管で起きていることを示唆する所見を得たが、胃癌ではそのような所見は少なく、胃癌と大腸がんではリンパ管侵襲の機構が異なり、大腸がんにおいては budding が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

b) 次にこれら臨床例の腫瘍リンパ管新生に関する観察結果を実験的に検証するために DsRed 遺伝子を導入した大腸癌リンパ節転移細胞株 (COLM-5) と FITC-Dextran を用いた micro-lymphangiography を組み合わせてヒト大腸がんの腫瘍リンパ管新

生をヌードマウスの系で解析した。その結果、臨床材料の観察結果と同様に、腫瘍リンパ管は腫瘍組織内ではなく腫瘍周囲の既存のリンパ管から新生され、実験モデルでも腫瘍細胞のリンパ管侵襲は腫瘍辺縁部で起きることを示唆する所見を得た。

c) VEGF-C のリンパ節転移における役割を明らかにするため、リンパ節転移能を有さず、VEGF-C 低発現ヒト大腸癌細胞株に VEGF-C を強制発現させた安定発現株を分離した。同細胞では VEGF-C の発現増強を認めたものの、リンパ節転移の有意な促進は見られなかった。一方、リンパ節転移能を有し、VEGF-C を高発現するヒト大腸癌細胞株に VEGFC の ShRNA plasmid ベクターを導入した安定発現株を分離した。ウエスタンブロットで VEGF-C 発現低下が確認された株では、リンパ管密度の軽度の減少ならびにリンパ節転移の低下傾向が認められた。以上のことから、リンパ節転移能の獲得にはリンパ管新生のみならず、腫瘍のリンパ管侵襲能が関与している可能性が示唆された。

d) 腫瘍細胞とリンパ管との相互作用を解析するために作成したヒト不死化リンパ管内皮細胞株 (HuTLEC) がリンパ管内皮マーカーであるポドプランニンおよび FLT-4 を蛋白、mRNA レベルで発現していることを確認、さらにリンパ管内皮に特異性が高いとされるヒアルロン酸結合タンパクである LYVE-1 についてもその発現を確認し、リンパ管内皮としての分化形質を保持していることを確認した。今後、FLT-4 の細胞質内ドメインを欠失した Dominant negative 変異体を作成し、これを用いて VEGF-C 刺激で FLT-4 を介したシグナルが細胞内でブロックされるか否かを調べ、HuTLEC 細胞における VEGF-C/FLT-4 経路を介したシグナル伝達について解析してゆく予定である。

上記、HuTLEC 細胞と大腸癌リンパ節転移細胞株、COLM-5 を組み合わせた *in vitro* 解析システムを用いてリンパ節高転移性の COLM-5 細胞の培地中に VEGF-C 刺激に比べ AP1, Sre などの転写因子の数倍高い転写活性を luciferase assay で検出し、VEGF-C 以外の新しい管腔形成促進因子が存在する可能性を示唆した。今後、さらに詳しい解析を続けてゆく予定である。

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 12 件)

1. Yokoyama ,H., Nakanishi, H., Kodera ,Y., Ikehara, Y., Ohashi, N., Ito, Y., Koike, M., Fujiwara, M., Tatematsu ,M., Nakao ,A. Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line.Clin. Cancer Res. 12(2); 361-68 .2006 .
2. Yokoyama, H., Ikehara, Y., Kodera, Y., Ikehara, S., Yatabe, Y., Mochizuki, Y., Koike, M., Fujiwara, M., Nakao, A., Tatematsu, M.,Nakanishi, H.Molecular basis for sensitivity and acquired resistance to gefitinib in HER2 overexpressing human gastric cancer cell lines derived from liver metastasis. Br J Cancer. 95: 1504-1513, 2006 .
3. Nakanishi, H., Hara, H., Ikehara, Y., Tatematsu, M. Non-invasive and real-time monitoring of molecular targeting therapy for lymph node and peritoneal metastasis in nude mice bearing xenografts of human colorectal cancer cells tagged with GFP and DsRed, Proceeding of SPIE, 6449; 644910-1-9, 2007
4. Hara, M., Hirai, T., Nakanishi, H., Kanemitsu, K., Komori, K., Tatematsu, M., Kato, T. Isolated tumor cell in lateral lymph node has no influences on the prognosis of rectal cancer patients, Int. J. Colorectal Dis. 22(8); 911-7, 2007
5. Ohno, F., Nakanishi, H., Abe, A., Seki, Y., Kinoshita, A., Hasegawa, Y., Tatematsu, M., Kurita, K. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody. An analysis in comparison with angiogenesis. J. Oral Pathol. Med. 36(5); 281-9, 2007
6. Hara, M., Nakanishi, H., Jun, Q., Hirai, T., Kanemitsu, K., Ito, S., Mochizuki, Y., Kodera, Y., Tatematsu, M., Yamamura, Y., Kato, T. Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR. Possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer. Clin. Exp. Metastasis, 24(3); 179-189, 2007
7. Hara M, Nakanishi, H., Tsujimura, K., Matsui, M., Yatabe, Y., Manabe, T. Tatematsu, M. Interleukin-2 potentiation of cetuximab anti-tumor activity for EGFR overexpressing gastric cancer xenografts via antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cancer Sci. 99(7):1471-8, 2008
8. Eguchi, T., Kodera, Y., Nakanishi, H., Yokoyama, H., Ohashi, N., Ito, Y., Nakayama, G., Koike, M., Fujiwara, M., Nakao, A. The effect of chemotherapy against micrometastases and isolated tumor cells in lymph nodes: an in vivo study. In Vivo. 22(6):707-12. 2008
9. Iwatsuki, M., Fukagawa, T., Mimori, K., Nakanishi, H., Ito, S., Ishii, H., Yokobori, T., Sasako, M., Baba, H., Mori, M. Bone Marrow and Peripheral Blood Expression of ID1 in Human Gastric Carcinoma Patients Is a Bona Fide Indicator of Lymph Node and Peritoneal Metastasis. Br J cancer, 100,1937-1942, 2009
10. Kodera, Y., Nakanishi, H., Ito, S., Mochizuki, Y., Nakayama, G., Koike, M., Fujiwara, M., Yamamura, Y., Nakao, A. Expression of L1 Cell Adhesion Molecule is a Significant Prognostic Factor in pT3-stage Gastric Cancer. AntiCancer Res. 29(10):4033-9, 2009
11. Characterization of a novel lymph node metastasis model from human colonic cancer and its preclinical use for comparison of anti-metastatic efficacy between oral S-1 and UFT/LV. Ito Y, *Nakanishi H, Kodera Y, Hirai T, Nakao A and Kato,T in press, 2010
12. Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. Matsui M, Shimizu, Y Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H. in press, 2010

(文献 1～12 すべて査読有)

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 大野 ふみ, 中西 速夫, 阿部 厚, 木下 篤敬, 関 泰, 安井 昭夫, 栗田 賢一, 立松 正衛: ヒト舌癌および口腔領域扁平上皮癌のリンパ管新生, リンパ管侵襲およびリンパ節転移に関する免疫組織化学的検討: 第 65 回 日本癌学会学術総会 2006 [示説]
2. 関 泰, 中西 速夫, 木下 篤敬, 大野 ふみ, 今井 隆夫, 栗田 賢一, 立松 正衛: GFP 遺伝子導入ラット舌癌リンパ節微小転移モデルの樹立とリンパ節転移に対する S-1 の転移抑制効果の検討: 第 65 回 日本癌学会学術総会 2006 [示説]
3. Nakanishi, H., HER family as potential molecular targets for anti-cancer therapy against gastrointestinal malignancies. The 12th Aichi Cancer Center International Symposium, 2007, Nagoya, Japan.
4. Nakanishi, H., Hara, M., Ikehara, Y., Tatematsu, M. Non-invasive and real-time monitoring of molecular targeting therapy

for lymph node and peritoneal metastasis in nude mice bearing xenografts of human colorectal cancer cells tagged with GFP and DsRed, Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV. The International Society for Optical Engineering (SPIE), Photonics West 2007. Symposium, 2007, San Jose, USA.

5. Nakanishi, H., Ito, S., A new diagnostic and therapeutic strategy targeting micrometastasis for prevention of peritoneal recurrence in gastric cancer patients. The 11 th German-Japanese Cancer Workshop. 2007, Kyoto, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)
なし

○取得状況 (計 件)
なし

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者
中西速夫

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし