

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08580

研究課題名（和文）酸性微小環境におけるリンパ管内皮細胞の機能変化が癌のリンパ節転移を誘導する

研究課題名（英文）Acidic microenvironment promotes lymphatic metastasis via the functional changes of lymphatic endothelial cells

研究代表者

中西 雅子（Nakanishi, Masako）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60437382

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト皮膚リンパ管内皮細胞（HDLEC）に酸刺激を行うと、接着因子であるVCAM-1の発現が誘導されることが分かった。また、この効果は酸感受性受容体GPR4を介していることが示された。さらに、酸性環境下ではHDLECと癌細胞との接着が促進されたが、VCAM-1抗体を処置するとこの効果は有意に抑制された。これらの結果から、癌組織において形成される酸性微小環境はリンパ管内皮細胞におけるVCAM-1の発現誘導を介してリンパ節転移に促進的に働いていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の病期の進展ならびに予後を評価する上で、リンパ節転移は重要な因子の一つとなる。従来、リンパ節転移は、癌細胞自身が産生するリンパ管新生因子の発現に左右されることが考えられてきた。本研究において明らかとなった、癌組織の酸性環境と、リンパ管内皮細胞におけるGPR4ならびにVCAM-1発現との関連性は、癌の病態形成を考えるうえで新たな知見である。また今後、リンパ節転移の予防・治療標的として、これらの分子の有用性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Human lymphatic endothelial cells (HDLEC) expressed several acid receptors. Acidic treatment significantly induced the expression of VCAM-1, and this effect was reduced by knockdown of acid-sensing receptor GPR4. In addition, adherence of cancer cells expressing VLA-4 to HDLEC was accelerated by acidic treatment, and the treatment of anti-VCAM-1 antibody inhibited this effect. These results suggest that acidic microenvironment induce VCAM-1 expression via GPR4 on lymphatic endothelial cells and enhance adhesion of cancer cells to promote lymph node metastasis.

研究分野：実験病理学

キーワード：癌微小環境 酸性環境 リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

癌組織は周囲の正常組織に比べて酸性の状態を呈することが知られており、これには癌細胞自身や免疫細胞から産生されるプロトンや乳酸の関与が考えられている。近年、この酸性微小環境は、癌細胞自身に働いてその増殖を促進させることや、MMP の活性化を引き起こすことで、浸潤・転移といった悪性形質の発現に関与することが報告されている (*Peppicelli S et al., Clin Exp Metastasis 2014*)。

このような背景から、申請者は「癌組織の酸性環境はリンパ節転移に関与する」との仮説をたて、プロトンがもたらすリンパ管内皮細胞 (HDLEC) の動態変化について検討を進めてきた。その結果、酸性環境は HDLEC における IL-8 の発現を誘導し、HDLEC の増殖促進を引き起こすとともに、管腔形成や運動性を亢進させることを明らかにした。また、この変化は、酸感受性受容体である TRPV1 の活性化と NF- κ B 経路を介することも示された (*Nakanishi M et al., Exp Cell Res 2016*)。さらにマイクロアレイ解析の結果、酸性環境は HDLEC において接着分子やケモカインの発現を誘導することも明らかとなった。しかし、これらの変化に TRPV1 の関与は確認されず、他の酸感受性受容体を介した経路の存在が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、酸性環境によりリンパ管内皮細胞において誘導される接着分子ならびにケモカインについて、① 酸感受性受容体を介した発現制御メカニズム、② それに伴う癌細胞との相互作用を明らかにする。さらに、癌転移の動物モデルを用い、③ 酸感受性受容体を標的とした治療法の有用性を検討することで、リンパ節転移の新たな分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 酸刺激による接着分子の発現誘導メカニズム

- 1) ヒト正常リンパ管内皮細胞 (HDLEC) を用い、酸性環境下 (pH6.4) における VCAM-1 の発現変化を経時的に解析した。
- 2) VCAM-1 の発現誘導に関わる酸感受性受容体として GPR4 に着目し、発現抑制系を用いてその役割を検討した。
- 3) 酸刺激により HDLEC において発現誘導される CXCL6 ならびに CX3CL1 について、1)と同様に発現変化を検討した。

(2) リンパ管内皮細胞と癌細胞との相互作用

- 1) ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 あるいはマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 を用い、HDLEC との共培養系において酸刺激に伴う細胞接着の変化を観察した。さらに、VCAM-1 抗体の処置や GPR4 ノックダウンによるこれらの効果を検討した。
- 2) 酸刺激により発現誘導される CXCL6 ならびに CX3CL1 について、癌細胞の増殖・運動性への関与を検討した。また、HDLEC に対する効果についても同様に解析した。

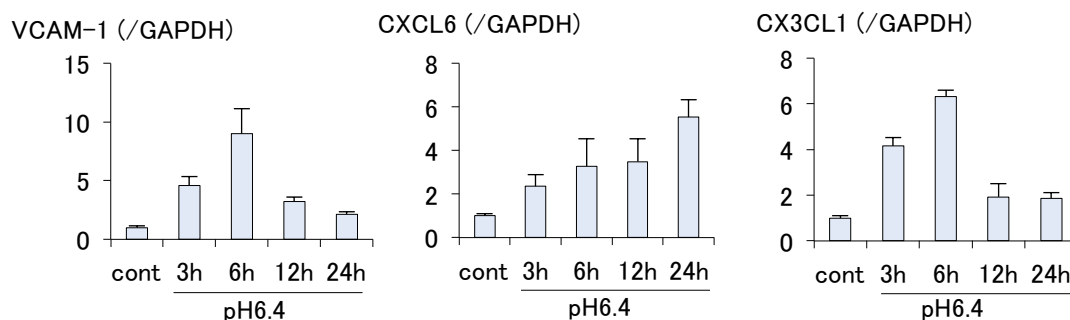
(3) リンパ節転移モデルを用いた転移抑制実験

B16F10 によるリンパ節転移モデルマウスを用い、VCAM-1 抗体処置による転移抑制効果について *in vivo* で検討した。

4. 研究成果

(1) 酸刺激による接着分子の発現誘導メカニズム

HDLEC を pH6.4 の酸性環境下で培養すると、VCAM-1 ならびに CXCL6、CX3CL1 の mRNA 発現が有意に増加した (図 1)。



同様に、酸刺激に伴う VCAM-1 発現の増加はウェスタンブロット法によっても確認できた (図 2)。また、蛍光免疫染色により、HDLEC における VCAM-1 の発現を確認した。

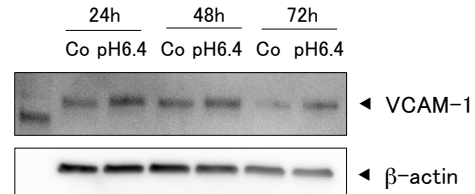


図 2. 酸刺激に伴う VCAM-1 の発現誘導

HDLEC は、イオンチャネルならびに G タンパク質共役型受容体など種々の酸感受性受容体を発現していることが確認された。そこで、血管内皮細胞においても重要性が指摘されている GPR4 に着目し、VCAM-1 の発現誘導における役割を検討した (図 3)。エレクトロポレーションにより HDLEC に siGPR4 をトランスフェクションし、酸刺激に伴う VCAM-1 発現について検討したところ、GPR4 のノックダウンにより酸による効果が有意に抑制されることが示された (図 4)。

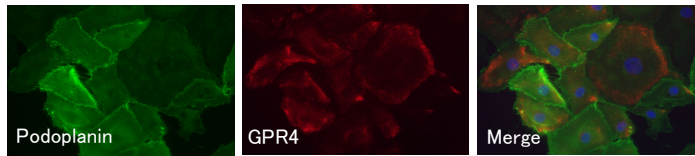


図 3. HDLEC における GPR4 の発現

酸刺激に伴う CXCL6 ならびに CX3CL1 の発現は、ELISA により解析した。いずれのサイトカインも、pH6.4 の条件下において、有意な増加が確認できた。

(2) リンパ管内皮細胞と癌細胞との相互作用

酸刺激により誘導される VCAM-1 の発現増加は、癌細胞と内皮細胞との接着に影響する可能性を考え adhesion assay を行った。

コンフルエントの HDLEC に酸刺激を行った後、蛍光標識したメラノーマ細胞を播種し、1 時間後に洗浄後 HDLEC と接着している細胞数を計測した。その結果、酸刺激によりメラノーマ細胞の HDLEC への接着が増加することが示された。さらに、この効果は VCAM-1 の中和抗体を処置した場合や、GPR4 をノックダウンした場合において抑制されることが確認できた (図 5)。

また、MDA-MB-231 細胞を用い、細胞増殖・運動性・浸潤性における CXCL6、CX3CL1 の影響を検討したがいずれも著明な変化は得られなかった。そこで、同様に HDLEC に対するこれらケモカインの影響を検討したところ、CX3CL1 の添加により HDLEC の細胞増殖が促進されることが分かった (図 6)。一方、細胞遊走能に対する効果は認められなかった。さらに、Tube formation assay の結果、CX3CL1 添加により HDLEC の管腔形成に亢進が認められたことから、CX3CL1 はリンパ管新生に寄与している可能性が示唆された (図 7)。

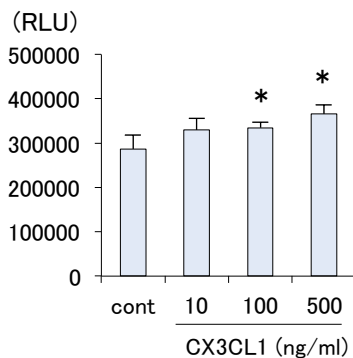


図 6. HDLEC の増殖における CX3CL1 の効果

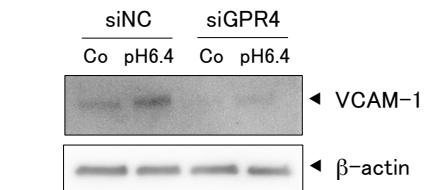
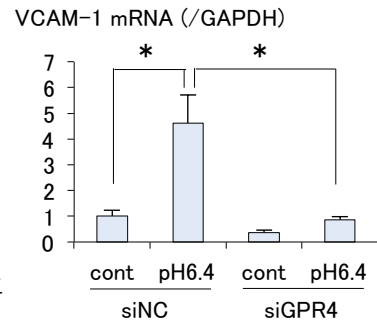


図 4. 酸刺激誘導性の VCAM-1 発現における GPR4 の役割

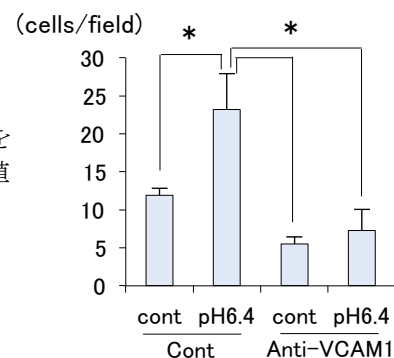
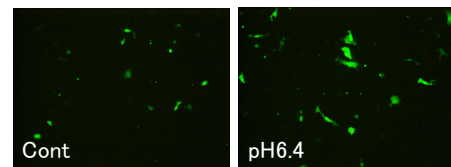


図 5. 酸性環境下における adhesion assay

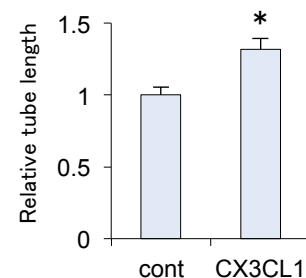
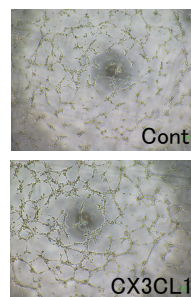


図 7. 管腔形成能に対する CX3CL1 の効果

(3) リンパ節転移モデルを用いた転移抑制実験

癌組織の微小環境によりリンパ管内皮細胞における VCAM-1 発現が誘導されたことから、この現象が *in vivo* でも生じているか確認した。C57BL/6J マウスの足底部に B16F10 細胞を接種し、4 週後に膝窩リンパ節を採取した。対照群のリンパ節と比較し、腫瘍接種群ではリンパ節重量は有意に増加しており、組織学的に転移巣とリンパ管増生が認められた。また、リンパ節での VCAM-1 発現は、対照群と比較して腫瘍接種群において増加する結果が得られた (図 8)。

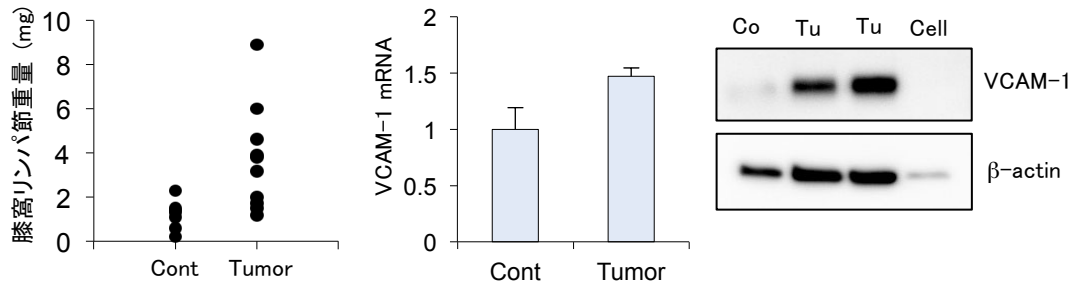
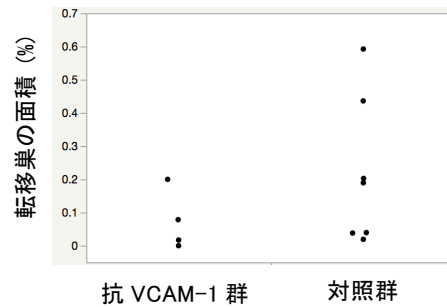


図 8. リンパ節転移モデルマウスの膝窩リンパ節重量と VCAM-1 発現

次に、右足底部に腫瘍細胞を、反対側に PBS を接種した転移モデルマウスを用い、抗 VCAM-1 抗体あるいはコントロール IgG を投与し、リンパ節転移の病態について解析した。両群ともに膝窩リンパ節・鼠径リンパ節は患側である右側で腫大が認められた。リンパ節重量の比較では、抗 VCAM-1 抗体投与群と対照群の間に有意な差は確認できなかった。しかしながら、鼠径リンパ節の組織学的解析において、抗 VCAM-1 抗体投与群での転移病巣の減少が認められた (図 9)。

	転移あり	転移なし	合計
対照群	5 (71.4%)	2 (28.6%)	7
抗 VCAM-1 群	3 (37.5%)	5 (62.5%)	8
合計	8	7	15



(結論)

これまでに得られた結果から、癌局所において形成される酸性微小環境は、リンパ管内皮細胞における GPR4 を介して VCAM-1 の発現を誘導し、癌細胞との接着性を増加させることでリンパ節転移に促進的に関与していることが示唆された。また、酸性環境によりリンパ管内皮細胞からの産生が増加する CX3CL1 は、オートクライン的に作用し、リンパ管内皮細胞の機能亢進に寄与すると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Enaka Mayu, Nakanishi Masako, Muragaki Yasuteru	4. 巻 191
2. 論文標題 The Gain-of-Function Mutation p53R248W Suppresses Cell Proliferation and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma through the Down-Regulation of Keratin 17	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 555 ~ 566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.11.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Masako, Korechika Ayaka, Yamakawa Haruka, Kawabe Naoko, Nakai Kazuma, Muragaki Yasuteru	4. 巻 45
2. 論文標題 Acidic microenvironment induction of interleukin-8 expression and matrix metalloproteinase-2/-9 activation via acid-sensing ion channel 1 promotes breast cancer cell progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1284 ~ 1294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 Masako Nakanishi, Yasuteru Muragaki
2. 発表標題 Acidic microenvironment promotes lymphatic metastasis via the induction of VCAM-1 in lymphatic endothelial cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西雅子、池森恭花、村垣泰光
2. 発表標題 癌組織の酸性環境はリンパ管内皮細胞におけるVCAM-1の発現誘導を介してリンパ節転移モデルを転移を促進する
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------