

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209044

研究課題名（和文） リンパ行性微小癌転移機構解明のためのリンパ学を基盤とした体系的研究

研究課題名（英文） Basic and clinical research for evaluating micro-environmental changes in sentinel lymph node produced by micro-metastasis of carcinoma cell.

研究代表者

大橋 俊夫 (OHASHI TOSHIO)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80020832

研究成果の概要（和文）：

- ①ヒト乳癌細胞（MDA-MB-231）はATPを分泌し、ヒトのセンチネルリンパ節近傍の輸入リンパ管内皮細胞表面に接着因子ICAM-1を誘導し、センチネルリンパ節内への微小癌転移を誘起させることを発見した。
- ②炎症反応に関与するケモカインCCL2も同様の機序でリンパ行性微小癌転移を誘導していることを証明した。
- ③ずり応力刺激は、ヒト集合リンパ管内皮細胞の遺伝子発現とその蛋白産生を亢進させ、流れに対する感受性を自己制御していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

- ①We reported in AJP (Cell Physiology, 295: C1123-C1132, 2008) that human breast cancer cell line, MDA-MB-231 has produced ATP-mediated ICAM-1-dependent facilitation of the attachment of carcinoma cells to human endothelial cells.
- ②We reported in Cancer Science (100: 419-428, 2009) that chemokine CCL2 has facilitated ICAM-1-mediated interactions of Cancer Cells to human lymphatic endothelial cells.
- ③We reported in AJP (Cell Physiology, 298: C647-C655, 2010) that shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
年度			
年度			
総計	28,700,000	8,610,000	37,310,000

研究代表者の専門分野：生理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：癌転移、センチネルリンパ節、分子プロファイリング、癌抗原、生体顕微鏡観察

1. 研究開始当初の背景

組織間隙マトリックス、リンパ管ならびにリンパ節の生理学的研究は欧米の数箇所の

研究施設で精力的に進められている。それらの研究グループと肩を並べることができる本邦の研究チームの1つが私共の教室であると自負している。事実、リンパ管内細胞の培

養株の確立、一酸化窒素によるリンパ管機能の解明、リンパ管の濃縮機構の解明、摘出リンパ節内リンパ動態可視化標本の作成については全くオリジナルな仕事であり、世界で初めて私共の研究グループが確立し、アメリカ生理学会誌やCancer Cell誌等国際一流誌に報告してきた。

世界のリンパ系研究者チームに比較しても決して引けを取らず、なおかつ全く独創的でしかも先駆的なリンパ系、微小循環系の体系的で統合的な研究を格段に発展させることが出来る研究チームを組織し、それを現在十分に機能させていると確信している。

2. 研究の目的

長いリンパ学の研究歴史の中で、ここ10年における革命的な研究業績は目を見張るものがある。例えば(1)リンパ管発生におけるホメオボックス遺伝子Prox1やFox C1/C2の発見 (2)VEGF C/Dの発見とその受容体VEGFR3の同定 (3)VEGF C/Dを仲介するリンパ管新生と癌細胞のリンパ行性転移機構の解明などが挙げられる。事実、こうした国際的業績に後押しされ、2004年3月リンパ学に関するゴードン会議が米国ベンチュラ市で開催された。申請者大橋は本会議に招聘され、本研究グループの30年にわたるリンパ学の研究業績を発表した。

本研究は申請者らのリンパ学に関するこれまでの研究業績(例えば(a)リンパ管系は低酸素環境で機能しており、酸素ラジカルやレドックス反応が重要な役割を果たしている事。(b)微小リンパ管はアルブミン濃縮機能を持ち、所属リンパ節からのnatural killer (NK)細胞の遊走を調節し、自然免疫能を制御している事。(c)ラット・マウスのリンパ管内皮細胞株の樹立に成功し、その細胞を用いてbFGFやPDGF/BB等の成長因子がリンパ管新生を誘発する事をin vitro実験で証明した事等)を、生理学的意義を常に考慮し、上記(a)(b)(c)の個々の研究分野を統合し、それらの基礎研究の研究手法を多視点より活用し、リンパ行性微小癌転移機構(センチネルリンパ節)を解明することを、最終の研究目的とする。

3. 研究の方法

<平成19年度>

リンパ管、リンパ節、リンパ球より成るリンパ系の統合的な生理機能を、循環器学、免疫学、腫瘍学の3つの視点から、低酸素環境においてリンパ液中のアルブミン濃縮機能を仲介して、内部環境の恒常性維持に努める脈管

システムと生体防御システムという統一概念の下、リンパ行性微小癌細胞転移様式の解明のために、体系的に実験を行うことを基本とする。

(1)循環器学的視点よりみた研究計画

リンパ系は血液循環を主体とする微小循環系の物質交換機能と連携して、細胞を取り囲む内部環境の恒常性維持のために働いている。すなわち、毛細血管-細静脈系における水分供給と水分回収の差し引き分の水分と細胞群により代謝水として排泄される水分を、細胞間隙マトリックス環境に存在する老廃物や疲労物質の内、水溶性の低分子物質を包含して毛細リンパ管に回収するシステム(リンパ産生機構)としてまず作動している。それに引き続き、このリンパ液が次第に濃縮されながら集合リンパ管(壁に平滑筋を含有し、リンパ弁を内在されるリンパ管)、所属リンパ節、主幹リンパ節、胸管へと輸送される機能(リンパ輸送機構)として作動している。しかもこれら両機能が25~40mmHgの酸素分圧の環境下で働いていることがリンパ系の第1の特徴とすることを、すでに私共が報告してきた。その生理学的意義と癌細胞の微小転移機構との関連性について解明するために次の実験計画を立案した。

- ①生体顕微鏡システム(現有設備)を用いてリンパ環境に沿ったリンパ液の酸素分圧を測定する。ラット・マウスの腸間膜リンパ循環系のような膜様特性を持つ臓器のリンパ管系と、肝臓や骨格筋等の実質臓器のリンパ管系における毛細リンパ管-微小リンパ管-集合リンパ管-リンパ節内リンパ管-主幹リンパ管-胸管内における毛細リンパ液の酸素分圧をカテーテル型酸素電極を用いて定量的に測定し、比較検討する。その結果と過去の業績を加味して、生理学的・病態生理学的意義を考察する。
- ②ヌードマウスに腫瘍組織の移植等を行なった微小癌転移病態モデルを利用して、組織間隙の酸素分圧を変化させながら、リンパ産生機構に対する組織酸素分圧の影響と癌のリンパ行性転移の様式を生体内で評価する。
- ③ラット・マウスの集合リンパ節を介する癌細胞の輸送機構に及ぼすリンパ液の酸素分圧の影響を生体内で評価する。
- ④心臓様拍動に類似した能動的リンパ輸送に及ぼすリンパ液の酸素分圧、ならびに一酸化窒素、一酸化炭素、ペルオキシナイトレイト等酸素ラジカル、プロスタグランジンカスケード産生物質、ATP依存性K⁺チャ

ネルに関連する物質、内皮細胞由来過分極誘起物質等の癌細胞の微小転移機構に及ぼす作用をin vitro実験で体系的に解析する。

(2)免疫学的視点よりみた研究計画

血液内のアルブミンの70~80%は生体内の細静脈より漏出し、組織間隙-マトリックス系を循環して、その大部分(90%以上)は毛細リンパ管に入り微小循環リンパ管で濃縮され、12~24時間かけて血液循環に戻る生理機能の存在する事は周知の事実である。ところがその生理学的意義、意味付けは不明である。最近私共のグループの他、オーストラリアならびに英国の研究グループはこのアルブミンの濃縮機構はリンパ節内部にも存在し、NK細胞を中心としたリンパ球のリンパ節からの遊走を制御し、自然免疫能に関与することを報告した。そこでこのアルブミン濃縮-リンパ系を介するアルブミン循環の意義とその癌細胞の微小転移に及ぼす影響を体系的に解析するために、下記の実験系を計画した。

①ラット・マウスの生体顕微鏡実験システム(現有設備)を用いて、細静脈からのアルブミン放出と細静脈に内在する白血球や血小板との相互作用、ならびに流れ因子や細静脈内皮細胞由来の生理活性物質による影響を体系的に解析し、あわせて癌の微小転移に及ぼす影響を検索する。

②①と同一標本を用いて、腫瘍移植実験モデルやサイトカインによる炎症実験動物モデルを用いて、細静脈アルブミン漏出機構の変化とリンパ産生、リンパ輸送、リンパ節からのリンパ球動員、自然免疫との関連性について体系的に解析する。

③ラット・マウスの摘出リンパ管灌流標本を用いて、蛍光プローブ物質の微小リンパ管壁からの透過性変化を調べ、アルブミンの濃縮機構を定量的に評価する。ならびにその濃縮機構に及ぼすTNF α 、IL-1 β 、IL-6等サイトカインやカドヘリン、細胞接着因子、細胞骨格蛋白の重合化の影響を検索する。加えてこのアルブミン濃縮機構のリンパ行性微小癌細胞転移機構について検索する。

(3)腫瘍学的視点から見た研究計画

リンパ管発生におけるホメオボックス遺伝子Prox1やFox C1/C2の発見、ならびにVEGF C/Dの発見とその受容体VEGFR3の同定等の研究業績に触発され、VEGF C/Dを仲介とするリンパ管新生とリンパ行性癌転移の解明が世

界的に注目を受けている。私共もラット・マウス等の小動物のリンパ管内皮細胞株の樹立に成功するとともに、PDGF/BB、bFGFを介するリンパ管新生とリンパ行性癌転移機構について報告してきた。リンパ管内皮細胞の増殖・分化機構の分子生物学的研究だけでは解明できないリンパ管新生やリンパ行性癌転移機構の解析に私共が積み重ねてきたリンパ学の生理的研究、すなわちリンパ産生やリンパ輸送機構やレオロジー特性(毛細リンパ管は圧平性があり、腫瘍内組織はリンパ管産生の駆動力が生まれ難い等)を視点においた研究を加味し、リンパ管新生における新しい見方(機能的なリンパ管特性)を吟味し、それらの成果よりリンパ行性微小癌細胞転移機構を再検討するために次のような実験計画を立案した。

①樹立したラット・マウスリンパ管内皮細胞を用いて、リンパ管新生現象に及ぼす繫留線維、平滑筋様細胞、周皮細胞の関与並びに能動的リンパ輸送機構や毛細リンパ管の圧平防止機構とリンパ管新生機構ならびにリンパ行性癌転移機構との連携する仕組みについて、分子遺伝学、分子発生学、分子生物学、免疫組織化学的手法を用いて解析する。

②ラット・マウスリンパ管内皮細胞と同種の脂肪細胞をco-cultureし、VEGF C/D、bFGF、PDGF/BB等の成長因子によって誘起されるリンパ管新生ならびにリンパ管内皮細胞と転移癌細胞との相互作用に及ぼす脂肪細胞の影響について解析する。

③ラット・マウスリンパ管内皮細胞と確立された腫瘍細胞株を用いてco-cultureと接着実験を行ない、両細胞間に特異的に発現する接着物質を同定し、その物質のクロニングを行ない、リンパ行性微小癌転移を把握するための特異的分子マーカーを同定する。

<平成20年度以降>

(1)循環器学的視点よりみた研究計画

①NOS-K0マウス、K_{ATP}channel-K0マウス、リンパ管発生におけるホメオボックス遺伝子Prox-1-K0あるいはFox C1/C1-K0マウス等を用いてリンパ産生、リンパ輸送機構に及ぼすリンパ液の酸素分圧の影響を体系的に調べ、リンパ行性微小癌転移機構との関連を検索する。

②私共の確立したラット・マウスリンパ管内皮細胞を用いて、酸素分圧変化で変動する遺伝子群を遺伝子チップを用いて体系的

に検索し、低酸素環境で機能する細胞内情報伝達機構を推定し、転移癌細胞とリンパ管内皮細胞の相互作用を表現する分子マーカーを同定する。

③②の実験結果を踏まえて、リンパ管内皮細胞の酸素分圧感知機構と細胞内情報伝達機構の仕組みをNF- κ B、HIF-1、レドックス反応等を中心に、分子生物学的手法を用いて解析し、リンパ行性微小癌細胞転移機構との関連性を体系的に解明する。

④培養リンパ管内皮細胞にパッチクランプを適用してイオンチャンネルを中心とした膜電気特性を解析し、酸素分圧や流れ因子などの影響について体系的に検索し、転移癌細胞との相互作用への影響を解明する。

(2)免疫学的視点よりみた研究計画

①リンパ節内のリンパ管 滯留標本を in vitroあるいはin-situ標本として作製する。これらの標本を用いてリンパ節内のアルブミン濃縮機構の仕組みと、微小癌転移細胞のリンパ節内動態とそのリンパ節内接着様式を体系的に解析する。

②リンパ液内のアルブミン濃度をヒトの生体で定量的に評価する装置を作製し、アルブミン濃度動態と自然免疫能との関係を定量的に解析と同時に、微小癌転移機構に及ぼす影響を詳細に検索する。

(3)腫瘍学的視点よりみた研究計画

①リンパ管内皮細胞-腫瘍細胞間に特異的に発現する接着因子のKO動物を作製し、腫瘍細胞のリンパ行性微小癌転移機構の変化について生体顕微鏡システム（現有設備）を用いて体系的に検討する。

②ラット・マウスのリンパ節内リンパ管の in-vitroならびにin-situ管流標本を用いて、腫瘍細胞、腫瘍免疫状態の樹状細胞、Tリンパ球等とリンパ節内リンパ管内皮細胞の相互作用を生体顕微鏡システム（現有設備）を用いて定量的に解析する。ならびにその相互作用に関与する接着物質を同定し、クローニングを行なう。

③リンパ管新生機構や癌細胞のリンパ行性転移機構に関する上記のすべての実験結果を踏まえて、癌細胞のリンパ行性転移を抑制するための薬物あるいは理学的療法について検討する。さらに前哨リンパ節（sentinel lymph node）の早期診断方法

を考案し、臨床応用に発展させるための予備実験を行なう。

4. 研究成果

①培養したヒト乳癌細胞 (MDL-MB-231) は ATP を分泌し、この ATP はヒトのセンチネルリンパ節近傍の輸入リンパ管内皮細胞表面に接着因子 intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 の発現を誘導し、センチネルリンパ節内への微小癌転移発生に関与していることを発見した。

②炎症反応に関与するケモカイン CCL2 は、ヒトセンチネルリンパ節近傍の輸入リンパ管内皮細胞表面に接着因子 ICAM-1 の発現を誘導し、センチネルリンパ節内の微小癌転移を誘導していることを証明した。

③リンパ流によって生じるズリ応力刺激は、ヒト集合リンパ管内皮細胞の既存型一酸化窒素産生酵素の遺伝子発現とその蛋白産生を亢進させ、流れ刺激による感受性を自己制御している生理的因子となっていることを証明した。

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 26 件）

① Y. Kawai, Y. Yokoyama, M. Kaidoh, T. Ohhashi: Shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells. Am. J. Physiol., 298: C647-C655, 2010. 査読有

② Y. Kawai, M. Kaidoh, Y. Yokoyama, K. Sano, T. Ohhashi: Chemokine CCL2 facilitates ICAM-1-mediated interactions of cancer cells to human lymphatic endothelial cells. Cancer Sci., 100: 419-428, 2009. 査読有

③ Y. Kawai, T. Ohhashi: Topics of physiological and pathophysiological functions of lymphatics. Curr. Mol. Med., 9: 942-953, 2009. 査読有

④ Y. Kawai, M. Kaidoh, T. Ohhashi: MDA-MB-231 produces ATP-mediated ICAM-1-dependent facilitation of the attachment of carcinoma cells to human lymphatic endothelial cells. Am. J.

Physiol., 295: C1123-C1132, 2008. 査読有

⑤Y. Kawai, K. Hosaka, M. Kaidoh, T. Minami, T. Kodama, T. Ohhashi: Heterogeneity in immunohistochemical, genomic, and biological properties of human lymphatic endothelial cells between initial and collecting lymph vessels. *Lymphat. Res. Biol.*, 6: 15-27, 2008. 査読有

⑥F. Ikomi, Y. Kawai, J. Nakayama, N. Ogiwara, K. Sasaki, R. Mizuno, T. Ohhashi: Critical roles of VEGF-C-VEGF receptor 3 in reconnection of the collecting lymph vessels in mice. *Microcirculation*, 25: 1-13, 2008. 査読有

⑦N. Sakai, R. Mizuno, N. Ono, H. Kato, T. Ohhashi: High oxygen tension constricts epineurial arterioles of the rat sciatic nerve via reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.*, 293(3): H1498-H1507, 2007. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

①河合佳子, 大橋俊夫, 流れ刺激によるリンパ管内皮細胞の eNOS 発現の自己制御様式について, 第 50 回日本脈管学会総会, 2009. 10. 29, 東京

②Kawai Y, Ohhashi T, ATP develops suitable environment for metastasis of carcinoma cells in sentinel lymph node., 第 36 回国際生理学会世界大会, 2009. 7. 31, 京都

③河合佳子, 大橋俊夫, 培養リンパ管内皮細胞を用いたセンチネルリンパ節微小癌転移機構の解析, 第 33 回日本リンパ学会総会, 2009. 7. 18, 大阪

④河合佳子, 伊古美文隆, 大橋俊夫, VEGF-C-mediated recanalization of collecting lymph vessels., 第 34 回日本微小循環学会年次総会, 2009. 2. 21, 東京

⑤河合佳子, 海藤真紀, 横山由美子, 大橋俊夫, 乳癌細胞 MDA-MB-231 培養上清によるヒトリンパ管内皮細胞の ICAM-1 発現増強機序の解明, 第 32 回日本リンパ学会総会, 2008. 6. 7, 東京

⑥河合佳子, 大橋俊夫, リンパ管へのアプローチ: その新展開 ヒトリンパ管内皮細胞培養法の確立とセンチネルリンパ節における臨床応用研究, 第 113 回日本解剖学会総会, 2008. 3. 27, 大分

⑦ T. Ohhashi, Y. Kawai, Microenvironmental properties for metastatic carcinoma cells in sentinel lymph node: with special reference to molecular profiling of human lymphatic endothelial cells interacted with the carcinoma cells., Gordon Research Conference, 2008. 3. 4, Ventura, CA, USA

⑧河合佳子, 海藤真紀, 大橋俊夫, Heterogeneity in the characterization of human lymphatic endothelial cells between initial and collecting lymph vessels., 第 33 回日本微小循環学会総会, 2008. 2. 21, 東京

⑨河合佳子, 海藤真紀, 大橋俊夫, The supernatants of culture media of breast cancer cells produce overexpression of adhesion molecules on human lymphatic endothelial cells., 第 33 回日本微小循環学会総会, 2008. 2. 21, 東京

[図書] (計 9 件)

① 大橋俊夫, 河合佳子, 朝倉書店, からだと酸素の事典, 2009, pp282-284

② 大橋俊夫, メディカ出版, リンパ浮腫治療研究会編 リンパ浮腫-診療の手引き-, 2007, pp1-55

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: センチネルリンパ節内転移癌細胞検出キット

発明者: 大橋俊夫, 河合佳子

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2009/051385

出願年月日: 2009年1月28日

国内外の別: 国際特許

②名称: センチネルリンパ節内転移癌細胞検出キット

発明者: 大橋俊夫, 河合佳子

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-050735

出願年月日: 2008年2月29日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 俊夫 (OHASHI TOSHIO)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80020832

(2) 研究分担者

河合 佳子 (KAWAI YOSHIKO)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：10362112

永井 崇 (NAGAI TAKASHI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：50514353

伊古美 文隆 (IKOMI FUMITAKA)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：50262704

水野 理介 (MIZUNO RISUKE)
信州大学・医学部・講師
研究者番号：30273080

保坂 佳代子 (HOSAKA KAYOKO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：30362122