

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07171

研究課題名(和文)新規リンパ管新生因子に着目したリンパ行性転移機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of possible mechanisms of lymphatic metastasis noted by a novel lymphangiogenic factor

研究代表者

八木 秀樹 (YAGI, Hideki)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：40250740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌リンパ節転移モデルを用いて、その転移機構を明らかにすると共に、癌幹細胞性についても明らかにし、新規転移抑制薬や治療薬の開発を目指した。癌幹細胞性についてCD44R1の発現やSP細胞の有無などで検証したところトリプルネガティブ乳癌細胞株で癌幹細胞性が高いことが判明した。高リンパ節転移乳癌細胞株MDA-MB-231-LNを同所性に移植した腫瘍内にリンパ管が多数存在することから、この細胞はリンパ管新生因子を産生していると考え、リンパ管内皮細胞を用いて、wound healing assayを行ったところ、親株と比してMDA-MB-231-LN細胞の培養上清を加えることで、細胞遊走性が上がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在用いられている多くの転移モデルは、例えば、尾静脈内投与による肺転移モデル、左心室移植による骨転移モデル、脾臓内移植による肝転移モデルなど、癌の転移プロセスの一部のみをモデル化したものがほとんどである。そこで申請者らは自然にリンパ節転移が生じる系の作製に着手し、成功した。本研究のリンパ節高転移モデルは従来の転移モデルと比較して、よりヒトに近いことが本研究の特色である。これは原発巣から始まる転移の全てのプロセスを含むところが独創的な点である。また、抗Lyve-1阻害抗体の報告は国内外共に無く、治療実験を含む研究がさらに進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Using a breast cancer lymph node metastasis model, we aimed to clarify the mechanism of metastasis and cancer stemness, and to develop new metastasis inhibitors and treatments. Cancer stemness was verified by CD44R1 expression and the presence of side population cells, and it was found that triple-negative breast cancer cell lines had high cancer stemness. The presence of numerous lymphatic vessels in the tumor of a highly lymph node metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231-LN, transplanted orthotopically, suggested that these cells produce lymphangiogenic factors. The addition of culture supernatant of MDA-MB-231-LN cells increased cell migration as compared to the parental line.

研究分野：癌免疫学

キーワード：リンパ節転移 乳癌細胞 LYVE-1 リンパ管内皮細胞 リンパ管新生因子 トリプルネガティブ乳癌細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

昨今のがん治療薬の進歩には、目覚ましいものがある。低分子分子標的薬から抗体医薬品、そして本庶 祐・京都大学特任教授のノーベル医学生理学賞受賞に見られる免疫チェックポイント阻害薬の登場である。しかしながら、『遠隔転移』は患者の予後を大きく左右する重要な因子である。現在までに転移抑制薬として承認されているのは骨転移抑制薬のデノスマブ(抗 RANKL 抗体)のみである。この様に転移抑制薬の開発は、まだ不十分である。よって、転移を抑制する薬剤が開発されれば、がん治療に大きな一歩を刻むであろう。そのためにはよりヒトに近い転移モデル系を作製し、転移メカニズムを解析することが重要であり、それにより新たな標的分子が見つかると思える。この標的分子の発見が新たな治療薬開発につながるし、微小転移のバイオマーカー開発に結び付くと考える。

我々は、自然にリンパ節転移が生じるモデル系の作製を行い、免疫不全マウスに同所性(乳腺)に移植されたヒト乳癌細胞株において、反対側のリンパ節にも転移する細胞株の樹立に成功した。この時、高転移株の組織像を観察したところ癌組織周辺だけでなく癌組織内にリンパ管が存在することに気付いた。これまで、多くの研究者は腫瘍内中心部でのリンパ管の存在に否定的だった。しかし、我々は、リンパ管に特異的な抗 LYVE-1 モノクローナル抗体(64R)を作製し、リンパ節高転移ヒト乳癌細胞株の同所性移植腫瘍内中心部に多数のリンパ管が存在することを見出した。このことから、腫瘍組織からリンパ管新生因子が産生されていると考えた。

2. 研究目的

乳癌リンパ節転移モデルを用いて、その転移機構を明らかにし、新規転移抑制薬の開発を目指すことを目的とした。我々が樹立した高リンパ節転移乳癌細胞株 MDA-MB-231-LN を同所性に移植した腫瘍内にリンパ管が多数存在することから、MDA-MB-231-LN 細胞はリンパ管新生因子を産生しているものと考えられた。本研究では新規リンパ管新生因子の探索と共に、新規リンパ管新生因子産生機序についてもアプローチをする。

乳癌は病理学的に estrogen receptor (EP)、progesterone receptor (PR)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) らの発現により分類されている。一般的には、ホルモン受容体 (ER、PR) を発現している luminal type、HER2 を発現している HER type、いずれも発現していない triple negative (TN) type に分けられ、TN type 乳癌は現在治療法も少なく、予後が悪いことが知られている。一方で、癌の多剤耐性や悪性度との関連が報告されている癌幹細胞 (cancer stem cells: CSC) の存在が悪性腫瘍において示されている。我々は CSC のマーカーとして CD44R1 に着目した。CD44 分子は選択的スプライシングにより多数の変異型アイソフォームを生じることが知られている。中でもバリエーション v8-v10 ドメインを含む CD44R1 は CSC に選択的に発現されていることが慶応大の佐谷先生らにより報告されている。各種乳癌細胞株を用いて CD44R1 の発現を検索し、その癌幹細胞性について検討を行った。

3. 研究方法

3-1. 抗体染色とフローサイトメトリー

癌細胞株を 5×10^5 /tube となるように分注し、それぞれ希釈した抗体カクテルを 100 μ L ずつ加え、氷上で 30 分間反応させた。0.1%BSA-PBS で 3 回洗浄し、BD Accuri C6 Plus にて測定し、FlowJo にて解析した。一部の抗体では間接法にて染色した。その際の 2 次抗体は PE または Alexa647 標識 anti-rat IgG 抗体を用い、30 分間反応させた。

3-2. Side population (SP) 細胞

癌細胞を 8%FCS 加 DMEM に 1×10^6 cells/mL となるように懸濁した。そこに Hoechst 33342 (10 μ g/mL) を加え、1 部には reserpine 12 μ g/mL を加えた。37 $^{\circ}$ C で 45 分インキュベートした後、1 mL の 8%FCS 加 DMEM で 2 回遠心洗浄し、0.5 μ g/mL propidium iodide (PI) を含む冷培地で 1×10^6 cells/mL となるように懸濁し、細胞の蛍光発現強度を JSAN Cell Sortor (ベイバイオサイエンス) にて測定した。

3-3. 活性酸素種 (ROS) の測定

ROS の測定は CellROX[®] Deep Red Flow Cytometry Assay Kit (Life technologies) を用いて行った。細胞浮遊液 500 μ L に CellROX[®] Deep Red Reagent 125 μ M を 0.5 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C 、5%CO₂ にて 30 分間反応させた。その後、PI 染色液を 0.5 μ L 加え、BD Accuri C6 plus にて測定、FlowJo にて解析した。

3-4. Wound healing assay

SVEC4-10 細胞または GFP 融合マウス LYVE-1 遺伝子導入 HEK293 細胞を 24 well プレートで培養し、confluent になったことを確認後、マイクロピペットのチップを用いて傷を付け、MDA-MB-231P 細胞培養上清 または MDA-MB-231LN 細胞培養上清を添加し、6 時間培養後、その創傷部分を計測した。

3-5. Boyden chamber assay と Giemsa 染色

Costar インサート付 24 well プレート (メンブレン穴サイズ 5.0 μ m) に希釈した MDA-MB-231P 細胞培養上清、MDA-MB-231LN 細胞培養上清を下層部にそれぞれ 750 μ L/well 加えた。SVEC4-10 細胞 (1.5×10^5 /well) または GFP 融合マウス LYVE-1 遺伝子導入 HEK293 細胞 (1×10^5 /well) をインサート上部に添加、6 時間または 15 時間培養した。培養後、非遊走細胞を綿棒にて除去した。インサートについて引き続き、May-Grünwalds Giemsa 染色を行った。倒立顕微鏡を用い、青紫に染色されている細胞数を計測した。

3-6. RT-qPCR

Total RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて常法通り行った。逆転写反応は Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) を用いて常法通り行った。qPCR は、cDNA テンプレート 1 μ L、SYBR Green Real time PCR (東洋紡) 10 μ L、plus solution (東洋紡) 2 μ L、forward primer 1 μ L、reverse primer 1 μ L に精製水を加え、全量が 20 μ L となるように調製した。Step One Plus (Applied Biosystems) にて real time PCR

を行い、測定結果を Step One™ Software で解析した。初期変性を 95 で 5 分間行った後、95 、15 秒間での denature、61 、12 秒間の anneal/expansion を 45 サイクル行い、各サイクルでの SYBR Green からの蛍光を測定することにより、PCR 産物の定量を行った。

4. 研究成果

4-1. リンパ節高転移性 triple negative 乳癌細胞株における癌幹細胞マーカーの検討

10 種類の乳癌細胞株を luminal type、HER2 type、triple negative (TN) type に分類し、癌幹細胞特異的細胞表面マーカー発現の検索をフローサイトメトリーにて行った。Luminal type では上皮細胞のマーカーである E-cadherin の発現が多くみられた。HER type では HER2 発現のほか、上皮特異抗原の EpCAM (ESA) の発現がみられた。現在までに、乳癌で癌幹細胞の特異的マーカーとして CD24⁻、CD44⁺、EpCAM⁺が報告されている。予後が悪いとされている TN type では CD44 を除く、検索したマーカー (CD24、EpCAM、Her2) の発現がほとんどみられなかった。また、リンパ節転移能にかかわる分子の検索においても MDA-MB-231P 細胞と MDA-MB-231LN 細胞において CD24、CD44、ESA (EpCAM)、Her2、CD133、Lgr5、CXCR4、CCR1、CCR3 の発現を比較したが、両者間で明確な差は見られなかった。

次に、CD44 の選択的スプライシングにより生じる CD44R1 (バリエーション v8-v10 ドメインを含む) が癌幹細胞に発現するとの報告があるので、CD44R1 分子の発現について検索を行った。CD44R1 (v8-v10) のうち、CD44v8、CD44v9、CD44 standard form (s) について、それぞれに対するモノクローナル抗体 RV9、RV3、RV7 を各種乳癌細胞株と反応させ、その発現をフローサイトメトリーにて解析し、相対幾何平均蛍光強度として比較した。Luminal type と HER2 type の乳癌細胞株では CD44v8、CD44v9 発現はほとんど認められなかったが、TN type である BT-20 細胞、MDA-MB-468 細胞、MDA-MB-231 細胞では高い発現が認められた。

MDA-MB-231 細胞においてリンパ節転移能が高い MDA-MB-231LN 細胞と親株との間で、CD44 分子に関して発現解析を行ったところ、正常型 CD44s および変異型 CD44 である CD44v3、CD44v6 の発現量については MDA-MB-231LN 細胞と MDA-MB-231P 細胞の間に明確な差は見られなかったが、変異型 CD44v8、CD44v9 両者において MDA-MB-231LN 細胞が MDA-MB-231P 細胞より高発現であった。よって、MDA-MB-231P 細胞より MDA-MB-231LN 細胞で CD44R1 (v8-v10) 発現が高いことが判明した。

癌幹細胞において CD44R1 発現が高いことが報告されているので、MDA-MB-231LN 細胞において癌幹細胞の特徴の一つである side population (SP) 細胞の検出を試みた。MDA-MB-231P 細胞では SP 細胞をほとんど検出できないのに対して、MDA-MB-231LN 細胞においては SP 細胞を高頻度に検出することができた。ABC トランスポーターのうち ABCG2 の発現について検索したが、MDA-MB-231P 細胞及び MDA-MB-231LN 細胞においてその発現は確認されなかった。よって、MDA-MB-231LN 細胞で認められる SP 細胞は ABCG2 以外の ABC トランスポーターに依存していることが示唆された。

CD44R1 は細胞膜表面においてシスチントランスポーターxCT を安定化させることで、抗酸化物質である還元型グルタチオンの生成を促進し、ROS の蓄積を抑制するため、腫瘍細胞は治療時などにおいて発生する酸化ストレスに対して抵抗性をもつことが報告されている。そこで MDA-MB-231P 細胞と MDA-MB-231LN 細胞間で 5-FU 添加により酸化ストレスを与えたときの ROS 産生量の比較を行った。すると、5-FU 存在時、非存在時ともに MDA-MB-231LN 細胞で ROS の発現が少ない傾向にあった。また、xCT によるシスチンの取り込みを、スルファサラジンが阻害することで、還元型グルタチオンの生成を抑えることが報告されている。そこで、MDA-MB-231LN 細胞において、xCT を阻害する目的でスルファサラジンを添加し、ROS の産生量の変化を調べた。すると、5-FU 存在時および非存在時ともに ROS の発現が少なかったのが、スルファサラジンを添加することで増加が見られた。このことは、スルファサラジンと 5-FU とのコンビネーション療法の可能性を示唆するものと考えられる。

4-2. リンパ節転移能に関する因子の探索

免疫不全 (SCID) マウスの下部乳腺組織にマトリジェルを用いて MDA-MB-231LN 細胞を移植した原発組織を組織学的に検索すると、LYVE-1 陽性の新生リンパ管が多数認められた。このことから、MDA-MB-231LN 細胞が産生するリンパ管新生因子が存在することが強く示唆された。

我々はリンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE-1 分子に着目し、Lyve1-遺伝子導入 HEK293 細胞を作製し、MDA-MB-231LN 細胞培養上清を添加することで細胞遊走性が導けるか wound healing assay にて検討した。親株細胞に対して、MDA-MB-231LN 細胞培養上清添加培地において Lyve1-遺伝子導入 HEK293 細胞の細胞遊走性の増加が認められた。なお、この遊走性の増加は抗 LYVE-1 抗体 (64R) の添加によって、抑制された。

次に、マウスリンパ管内皮細胞株 SVEC4-10 細胞を用いて、運動性への影響を検討した。SVEC4-10 細胞の運動性への影響は、wound healing assay と Boyden chamber assay を行った。Wound healing assay を行った結果、親株細胞培養上清添加と比べて MDA-MB-231LN 細胞培養上清の添加において SVEC4-10 細胞の運動性が有意に増大した。続いて、Boyden chamber assay を行ったところ、同様に MDA-MB-231LN 細胞培養上清の添加において SVEC4-10 細胞の膜通過細胞数の増加が認められた。

現在までに知られているリンパ管新生因子としては VEGF-C と VEGF-D が報告されている。そこで、VEGF-C と VEGF-D の mRNA 発現量を RT-qPCR を用いて、MDA-MB-231P 細胞と MDA-MB-231LN 細胞で比較した。その結果、両細胞間で、VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現量に有意な差は見られなかった。さらに、タンパク質についても、両細胞の培養上清中の VEGF-C 及び VEGF-D の存在はサンドウィッチ ELISA により検出することができなかった。以上より、MDA-MB-231LN 細胞から VEGF-C または VEGF-D 以外のリンパ管新生因子が産生されており、その因子を新たに同定することはリンパ節転移のメカニズム解析を大きく進めるものと思われ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jomen Wataru, Ohtake Takaaki, Akita Takayuki, Suto Daisuke, Yagi Hideki, Osawa Yosuke, Kohgo Yutaka	4. 巻 153
2. 論文標題 Iron chelator deferasirox inhibits NF- B activity in hepatoma cells and changes sorafenib-induced programmed cell deaths	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113363 ~ 113363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.113363	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 Otsuka Hirotada, Endo Yasuo, Ohtsu Hiroshi, Inoue Satoshi, Kuraoka Mutsuki, Koh Miki, Yagi Hideki, Nakamura Masanori, Soeta Satoshi	4. 巻 304
2. 論文標題 Changes in histidine decarboxylase expression influence extramedullary hematopoiesis in postnatal mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 1136 ~ 1150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.24533	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 -
1. 著者名 Ueda Shiho, Hayashi Hidemi, Miyamoto Takako, Abe Shinya, Hirai Kana, Matsukura Kanji, Yagi Hideki, Hara Yuta, Yoshida Kinji, Okazaki Shogo, Tamura Masakazu, Abe Yuki, Agatsuma Toshinori, Niwa Shin ichiro, Masuko Kazue, Masuko Takashi	4. 巻 110
2. 論文標題 Anti tumor effects of mAb against L type amino acid transporter 1 (LAT 1) bound to human and monkey LAT 1 with dual avidity modes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 674 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13908	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 -
1. 著者名 Funayama Hiromi, Tashima Itaru, Okada Satoru, Ogawa Takuya, Yagi Hideki, Tada Hiroyuki, Wakita Ryo, Asada Yoshinobu, Endo Yasuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of Zoledronate on Local and Systemic Production of IL-1 , IL-18, and TNF- in Mice and Augmentation by Lipopolysaccharide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 929 ~ 936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00923	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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹荒 雅紀、小園 桃香、関 彩香、清水 唯、細谷 悟史、田中 善孝、八木 秀樹
2. 発表標題 がん免疫療法に適した長期生存T細胞の培養法の基礎的研究 - in vivo リンパ球トレーシング法を用いて -
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増田 陽祐、平戸 美帆、星 都、八木 秀樹
2. 発表標題 ヒト非小細胞肺癌細胞株を用いたがん幹細胞性の検討とその高骨転移細胞株での検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤平 ほのか、星 都、高橋 健人、小太刀 菜月、多田納 豊、小川 拓哉、八木 秀樹
2. 発表標題 ヒトlysophosphatidyl serine 受容体-2 (LysoPS2) に対する新規モノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多田納 豊、宗像 達夫、澤井 円香、八木 秀樹、佐野 千晶、富岡 治明
2. 発表標題 Mycobacterium avium complex 由来Dアミノ酸によるマクロファージの 性状変化誘導についての検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 H Yagi, M Hirato, M Osono, H Iwasaki, M Sato, T Masuko
2. 発表標題 Expression of the cancer stem cell markers on the breast cancer cells with highly metastasis to lymph node
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平戸美帆、小園桃香、岩崎洸、佐藤將、益子高、八木秀樹
2. 発表標題 リンパ節高転移性triple negative乳癌細胞株における癌幹細胞性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒沢毬伽、木村朱里、楠珠美、千葉健治、益子高、八木秀樹
2. 発表標題 Sphingosine 1-phosphate (S1P) 受容体-4に対する新規モノクローナル抗体の作製の試み
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小園桃香、関彩香、太田智之、平戸美帆、八木秀樹
2. 発表標題 培養リンパ球の生体内での長期トレース法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村朱里、高橋健人、小太刀菜月、桑島みなみ、物江静香、小川拓哉、多田納豊、八木秀樹
2. 発表標題 新規抗ヒトLysoPS受容体モノクローナル抗体作製とその性状解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本蒼司、林菜津美、沖田鋼季、八木秀樹、石渡俊行、益子高、遠藤雄一、杉浦麗子
2. 発表標題 新規ラットモノクローナル抗体のヒト膵癌組織に対する反応性と抗腫瘍効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎晶貴、富岡佳久、林菜津美、吉本蒼司、杉浦麗子、沖田鋼季、八木秀樹、八木田秀雄、益子高、遠藤雄一
2. 発表標題 新規ラットモノクローナル抗体のヒト大腸癌に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 將、百百 純里奈、常田 百合、岩崎 洸、太田 智之、松本 光史、多田納 豊、八木秀樹
2. 発表標題 高骨転移性肺癌細胞株由来新規破骨細胞誘導因子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小太刀菜月、高橋健人、桑島みなみ、物江静香、小川拓哉、多田納豊、八木秀樹
2. 発表標題 ヒトlysophosphatidyl serine受容体に対する新規モノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際医療福祉大学薬学部 生体防御学分野 Home Page https://sites.google.com/site/immunobiologyiuhw/home
--

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
---------	---------