

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10303

研究課題名(和文) 口腔癌所属リンパ節郭清による肺転移活性機序の解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of lung metastasis activation by lymph node dissection for oral cancer and development of the preventive methods

研究代表者

宮下 仁 (Miyashita, Hitoshi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70372323

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)：リンパ節(LN)転移モデルマウスのLNを切除することにより肺の微小転移が活性化し、肺転移活性化モデルを用いて、LN切除による肺転移活性化に関わる分子を同定するために肺転移活性化前後の血液を採取し、血清質量分析し膨大なプロテオームデータを取得したが肺転移活性化に関わる分子の同定には至らなかった。しかし、ドキソルビシン封入リポソーム(DOX-LP)を転移LNに注入し超音波照射することにより上記肺微小転移の活性化を抑制する新たな研究モデルを樹立した。現在、担癌マウスのLNの切除により肺微小転移が活性化し、DOX-LPのLN内投与と超音波照射により不活化する機序を解明するための新たな方策を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺転移は頭頸部癌を含む多くの癌において生命予後を規定する極めて重要な因子であり、肺転移の予防法の開発は癌患者の治療成績の向上に極めて重要である。本研究では、担癌マウスのリンパ節(LN)の切除により肺転移が活性化する病因解明を血清質量分析法を用いて試みたが肺転移の活性化に関与する分子の同定には至らなかった。しかし、ドキソルビシン封入リポソーム(DOX-LP)を転移LNに注入し超音波照射することにより上記肺微小転移の活性化を抑制する新たな肺転移の病態解析モデルを樹立した。この研究モデルにより肺転移病巣の活性化抑制のための治療法の開発に新たな方向性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of lung metastasis, MXH10/Mo/lpr, in which micro-metastasis of the lung is activated by ablation of the lymph node (LN), a large amount of proteomic data were obtained by serum mass spectrometry analysis of molecules involved in the activation of lung metastasis with serum taken before and after the activation. However, identification of the molecules involved has not been achieved. On the other hand, in the course of our study, it was found that doxorubicin-encapsulated liposomes (DOX-LP) injected into metastatic LNs and irradiated with ultrasound could inhibit the activation of the above-mentioned pulmonary micrometastases. We are currently investigating new strategies to elucidate the mechanism by which lung micrometastases are activated by resection of LNs in tumor-bearing mice and inactivated by intra-LN injection of DOX-LP and ultrasound irradiation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：リンパ節郭清 リンパ節腫脹マウス リンパ節転移モデルマウス 肺微小転移 休眠細胞活性化

1. 研究開始当初の背景

リンパ節(LN)郭清後の遠隔転移病巣の活性化は、頭頸部癌や乳癌の分野で報告されている。しかし、その発症メカニズムは不明である。現在、臨床において常用されている画像診断法で検出できる肺転移病巣の大きさは数ミリ程度であるが、その時点で、肺転移病巣は微小転移の域を越えていることから遠隔転移が発覚する以前の病態を捉えることができなければ肺微小転移の活性化の病因を解明することはできない。従って、LN 切除によって肺転移病巣が活性化する過程をタイムゼロから解析できる疾患モデルの開発が必要である。我々の研究グループは、ヒトの LN と同等の大きさである短径約 10 mm に LN が腫脹する MXH10/Mo/lpr マウスとこのマウスに生着するルシフェラーゼ(Luc: 発光酵素)発現腫瘍細胞株を樹立し、生体発光画像解析装置(IVIS)で腫瘍細胞接種後タイムゼロからリアルタイムで LN 転移過程を評価できる LN 転移モデルを開発した (Cancer Res 73: 2082-2092, 2013. PLoS One 2013; 8: e55797, 2013. J Immunol Methods 389:69-78, 2013)。

さらに、この LN 転移マウスの LN を切除することにより、肺細動脈に休眠状態で生着している腫瘍細胞が活性化し、肺転移病巣が増大する過程を腫瘍細胞接種後タイムゼロからリアルタイムで解析できる肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスを樹立した (Biochem Biophys Res Commun 460:543-8, 2015)。この肺転移モデルでは、転移 LN を起点とした LN 介在血行性転移により肺等の遠隔臓器に転移が形成され、この遠隔転移の形成過程をタイムゼロからリアルタイムで観察することが可能であり、従来の LN 転移マウスモデルでは観察不可能な事象を観察できる。

また、我々の研究グループの先行研究において、LN 被膜には LN 内外の血管と交通する多数の穿通枝が存在することを見出し、癌細胞が輸入リンパ管から LN 辺縁洞に侵入し、増殖を開始した転移の初期段階において、LN 被膜表層の血管に侵入することを確認し、転移 LN を起点として遠隔転移が誘発される LN 介在血行性転移という新たな転移機構を見出した(Sci Rep 6: 32506, 2016. J Immunol Methods 445:1-9, 2017)。

オートファジーが腫瘍細胞の休眠に寄与していることが近年明らかとなった。しかしながら、腫瘍休眠と遠隔臓器での腫瘍細胞活性化におけるオートファジーの役割は不明瞭な点が多い。本研究がオートファジーと微小転移休眠細胞活性化の関係を解明する先駆的研究となる。一方、癌休眠細胞は癌幹細胞(Cancer stem cell)との相互作用から、化学療法抵抗性を示す。LN 内に存在する癌細胞は、術後補助化学療法に抵抗性を有する可能性があり、癌幹細胞との関与が想定される。術後の肺転移病巣の活性化と癌幹細胞と関わりが明らかにされれば術後補助化学療法の新しい転移癌治療概念の創出に繋がる。

また、血行性癌転移過程には、癌細胞の血管内への浸潤後、癌細胞の脈管内での生存と標的転移臓器への移動、標的臓器血管内皮への遊走、標的臓器への生着と増殖という多段階過程が提唱されている。血管は癌細胞の転移経路だけではなく、酸素や栄養等を供給することから、血管が前転移ニッチの形成に関わっている。しかしながら、前転移ニッチ形成と腫瘍休眠を関係づける研究はなく、癌の重要な Hallmark である脈管研究の新たな研究展開が期待される。

さらに、近年、Tumor Dormancy Therapy という癌治療法が提案されている。この治療法は腫瘍縮小ではなく、増殖を抑制することで延命をはかることを目的としているが、腫瘍休眠・活性機序が明らかになれば、Tumor Dormancy Therapy の展開が期待できる。

2. 研究の目的

口腔癌所属リンパ節(LN)転移の治療では、頸部郭清術が第一選択肢である。しかし、頸部郭清術の術後の比較的早期に肺転移等の遠隔転移が検出される症例を経験することがある。これらの症例においては、転移先臓器で既に休眠状態であった癌細胞が、頸部郭清術による手術侵襲によって活性化されることで発症した可能性がある。しかしながら、その活性化機序はいまだ解明されていない。本研究では、我々の研究グループが開発した肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスを使用して、リンパ節郭清による肺微小転移活性化の機序を解明し、遠隔転移予防法の開発に展開することを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物：

我々の研究グループが樹立したリンパ節(LN)転移実験に使用可能な MXH07/Mo-*lpr/lpr*、MXH10/Mo-*lpr/lpr*、MXH28/Mo-*lpr/lpr*、MXH36/Mo-*lpr/lpr*、MXH41/Mo-*lpr/lpr*、MXH43/Mo-*lpr/lpr*、MXH51/Mo-*lpr/lpr*、およびMXH54/Mo-*lpr/lpr* マウス、以上8系統のリコンビナント近交系マウスに関して、これらのマウスの基礎疾患や腫瘍細胞の生着やLN転移や肺転移誘導の状態を確認したところ、MXH10/Mo-*lpr/lpr* (MXH10/Mo/*lpr*) マウスが最も適していることが明らかとなった。以上より本研究ではMXH10/Mo/*lpr* マウスを実験動物として用いた。

腫瘍細胞：

腫瘍細胞としては、生体発光イメージング装置(IVIS)で解析可能な生体発光関連遺伝子であるルシフェラーゼ(Luc)遺伝子をFM3Aマウス乳癌細胞に導入したFM3A-Luc細胞を用いた。

血清質量分析：

転移LN切除により肺転移の活性化を誘導したマウスと活性化前のコントロールマウスからの血液標本を採取し、血清質量分析(LC-MS/MS)を行い、肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスとそのコントロールからプロテオームデータを取得した。しかし、得られた膨大なデータから肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスとそのコントロールの間で判別能の高いペプチドを絞り込むまでには至らなかった。

この原因としては、肺微小転移の活性化が切除するLNの転移の有無にかかわらず生ずること、腫瘍細胞の移植からLNを切除する期間の違いによって肺微小転移の活性化の頻度が異なることなど、肺微小転移の活性化のトリガーとしてのLN切除という操作には多くの要因が含まれ、何がトリガーなのか絞り込まれていなかったことが挙げられた。そこで肺微小転移の活性化のトリガーを絞り込むため、この肺転移の活性化因子や阻害因子に関して様々な方面から検討した。

肺微小転移活性化あるいは不活性化の起点が明確な新規疾患モデルの樹立：

肺微小転移活性化あるいは不活性化の起点が明確な新規疾患モデルの樹立を目的とし様々な検討を行った。その結果、肺微小転移活性化の起点が明確な新規疾患モデルの樹立は未だ検討中であるが、肺微小転移不活性化の起点が明確な新規疾患モデルを樹立することができた。以下に、肺微小転移不活性化モデルの樹立の方法について述べる。

肺微小転移不活性化モデルにおいては、ヒトのLNと同等の大きさである短径約10mmにLNが腫脹するMXH10/Mo/*lpr* マウスとルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を用いたLN転移モデルを使用した。このLN転移モデルにおいては腸骨下LN(SiLN)に腫瘍細胞を注入するとリンパ管

を介して、マウスリンパネットワークにおいて SiLN の下流の LN である固有腋窩 LN(PALN) に転移病巣が形成される。

これまで我々は、MXH10/Mo/lpr マウスを用いた LN 転移モデルを用いてドキソルビシン (DOX) による治療介入を行った結果、SiLN と PALN における抗腫瘍効果を確認した。しかし、SiLN 切除による肺微小転移の活性化を抑制することはできなかった。これは DOX を SiLN 内に局所注射すると、DOX の分子量が小さいことから、LN 内に貯留せずに投与後直ちに薬剤が全身に拡散すると考えられ、肺転移巣に作用する薬剤濃度が投与濃度よりも希釈されることで抗腫瘍効果が十分に得られなかったと考えられた。

一方、これまで我々の研究グループは、LN 内への抗がん剤の注射による LN 内での抗がん剤の貯留効果を向上させるために、リン脂質の二重膜で構成されたリポソームの内部に薬剤を封入するリポソーム化を検討してきた。さらに、超音波照射によりリポソームを崩壊させ、腫瘍組織により選択的に薬剤を送達させ、少ない投与量で抗腫瘍効果を向上させる検討を行ってきた。さらに、リポソームの粒子サイズを大きくすることで、LN 内の滞留性を向上させる検討を行ってきた。

以上の研究の過程で、肺微小転移活性化がドキソルビシン封入リポソーム(DOX-LP)を転移 LN に注入し超音波照射することにより上記肺微小転移の活性化を抑制できることが明らかとなった。本研究では、LN 内の滞留性が向上するリポソームの粒子サイズが粒子径 460nm の DOX-LP を転移 LN に注入し、 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ の照射強度で転移 LN である PALN に超音波照射することにより上記肺微小転移の活性化を抑制できることが明らかとなった。

4 . 研究成果

本研究では、我々の研究グループが独自に樹立したリンパ節腫脹マウスを用いた肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスを用いて、転移リンパ節(LN)郭清による肺転移活性化の機序に関わる分子を肺転移活性化前後の分子発現の変動から明らかにし、それぞれの変動分子群の発現の制御を可能にする手法を見出し、肺転移予防法の開発を目的とした。

我々の研究グループは、LN 腫脹を自然発症し、肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスとして利用可能なリコンビナント近交系マウス 8 系統維持している。これまでの研究において、これらのマウスの基礎疾患や腫瘍細胞の生着や LN 転移や肺転移の状態を確認し、MXH10/Mo/lpr マウスが最も適していることが明らかとなった。MXH10/Mo/lpr マウス以外では、生体発光画像解析装置を用いて生体内の腫瘍細胞の動態を解析するために使用したルシフェラーゼ発現腫瘍細胞が、移植免疫学的には組織適合抗原が一致しているにもかかわらず、腫瘍細胞の生着や転移能に問題があったが、MXH10/Mo/lpr マウスにおいては、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞の生着や転移能に実験の障害となるような問題は確認できなかった。

また、転移 LN 切除により肺転移の活性化を誘導したマウスと活性化前のコントロールマウスからの血液標本を採取し、血清質量分析(LC-MS/MS)を行い、肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスとそのコントロールからプロテオームデータを取得した。しかし、得られた膨大なデータから肺微小転移休眠細胞活性化モデルマウスとそのコントロールの間で判別能が高いペプチドを絞り込むまでには至らなかった。この原因としては、肺微小転移の活性化が切除する LN の転移の有無にかかわらず生ずること、腫瘍細胞の移植から LN を切除する期間の違いによって肺微小転移の活性化の頻度が異なることなど、肺微小転移の活性化のトリガーとしての LN 切除という操作には多くの要因が含まれ、何がトリガーなのか絞り込ま

れていなかったことが挙げられた。

そこで肺微小転移の活性化のトリガーを絞り込むため、この肺転移活性化モデルにおける肺転移病巣の活性化因子や阻害因子に関して様々な方面から検討したところ、我々の研究グループが見出した LN 内の貯留性が向上するサイズのドキソルピシン封入リポソーム (DOX-LP) を転移 LN に注入し、超音波照射することにより上記肺微小転移活性化モデルにおける肺転移病巣の活性化を抑制できることが明らかとなった。この DOX-LP の LN 内投与と超音波照射による肺微小転移不活化モデルにおいては、超音波照射という明確なトリガーが肺微小転移不活化の起点となっていることから、肺微小転移休眠細胞活性化と不活化モデルマウスとの間で判別能が高い分子の絞り込みが可能かと思われた。現在、担癌マウスの LN の切除により、なぜ、肺微小転移が活性化し、なぜ、DOX-LP の LN 内投与と超音波照射により肺微小転移の活化が抑制されるのか、この肺微小転移の活性化や不活化のスイッチとなる分子は何かを効率よく探索するための新たな方策を検討し実験を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Atsumu Kouketsu, Hitoshi Miyashita, Ikuho Kojima, Maya Sakamoto, Takaki Murata, Shiro Mori, Shinnosuke Nogami, Kensuke Yamauchi, Hirokazu Nagai, Hiroyuki Kumamoto, Tetsu Takahashi	4. 巻 120
2. 論文標題 Comparison of different diagnostic imaging techniques for the detection of bone invasion in oral cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 105453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oraloncology.2021.105453	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 Atsumu Kouketsu, Yoshinaka Shimizu, Shinnosuke Nogami, Minami Yamada-Fujiwara, Hirokazu Nagai, Kensuke Yamauchi, Hitoshi Miyashita, Haruka Saito, Kenji Odashima, Yuta Yanagisawa, Tetsu Takahashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Wound healing effect of autologous fibrin glue and polyglycolic acid sheets in a rat back skin defect model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transci.2021.103144	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 Akira Ohkoshi, Naoko Sato, Koreyuki Kurosawa, Hitoshi Miyashita, Ryo Ishii, Ayako Nakanome, Takenori Ogawa, Masahiro Tachi, Tetsu Takahashi, Yukio Katori	4. 巻 48
2. 論文標題 Impact of CAD/CAM mandibular reconstruction on chewing and swallowing function after surgery for locally advanced oral cancer: A retrospective study of 50 cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 1007-1012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.03.014	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 Kojima Ikuho, Takanami Kentaro, Ogawa Takenori, Sakamoto Maya, Nagai Hirokazu, Miyashita Hitoshi, Iikubo Masahiro	4. 巻 34
2. 論文標題 High detection sensitivity and reliable morphological correlation of PET with a silicon photomultiplier for primary tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 643 ~ 652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12149-020-01489-0	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 Hitoshi Miyashita, Motoi Fukumoto, Yoshikazu Kuwahara, Tetsu Takahashi, Manabu Fukumoto	4. 巻 13(7)
2. 論文標題 ISG20 is overexpressed in clinically relevant radioresistant oral cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of clinical and experimental pathology	6. 最初と最後の頁 1633-1639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Miyashita H, Kitamura J, Ando F, Kouketsu A, Kataoka Y, Shimoda H, Inamura N, Okamoto T, Takahashi T	4. 巻 21
2. 論文標題 Perioperative Evaluation of the Controlling Nutritional Status (CONUT) Score in Patients with NO Oral Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prog nutr	6. 最初と最後の頁 537 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23751/pn.v21i3.6871	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 Sato N, Koyama S, Mito T, Izumita K, Ishiko R, Yamauchi K, Miyashita H, Ogawa T, Kosaka M, Takahashi T, Sasaki K.	4. 巻 61
2. 論文標題 Changes in oral health-related quality of life after oral rehabilitation with dental implants in patients following mandibular tumor resection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 406 411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.18-0234	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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Miyashita H
2. 発表標題 3D simulation and guided surgery for mandibular reconstruction with fibular free flap
3. 学会等名 第36回日本顎顔面補綴学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyashita H
2. 発表標題 3D models and simple approach using the mountable alignment guide for mandibular reconstruction with free fibular flap
3. 学会等名 The 64th Congress of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons; Japan?Germany International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyashita H, Uchida T, Takahashi T
2. 発表標題 Pin1 inhibitor targets human cancer cells
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyashita H, Sato N, Kitamura J, Takagi N, Kurosawa K, Kochi T, Ogawa T, Okoshi A, Izumida K, Takeda Y, Kataoka Y, Nogami S, Yamauchi K, Nagai H, Kato H, Koyama S, Takahashi T
2. 発表標題 3D models and simple approach using the mountable alignment guide for mandibular reconstruction with free fibular flap
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小川武則, 黒沢是之, 宮下 仁, 佐藤奈央子, 大越 明, 中目亜矢子, 吉田拓矢, 石川 健一朗, 遠藤拓弥, 香取幸夫	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Journal of Otolaryngology, Head and Neck Surgery. Vol. 35 No. 9 (9月増大号)	

〔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
研究 分 担 者	森 士朗 (MORI Shiro) (80230069)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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