

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20013032

研究課題名（和文）皮膚がん組織におけるリンパ管の制御機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in cutaneous neoplasms

研究代表者

平川 聡史（HIRAKAWA SATOSHI）

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419511

研究成果の概要（和文）：

乳房外 Paget 病は皮膚悪性腫瘍の一つである。浸潤癌はリンパ行性転移しやすく、予後不良である。本研究課題は、106 例の乳房外 Paget 病を検討し、以下の知見を得た。原発巣における血管・リンパ管新生。浸潤癌における上皮-間葉転換 リンパ節におけるリンパ管新生。リンパ節におけるリンパ管新生は、乳房外 Paget 病の転移拡大に関わる重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Nodal lymphangiogenesis promotes distant lymph node (LN) metastasis in experimental cancer models. However, the role of nodal lymphangiogenesis in distant metastasis and in the overall survival of cancer patients remains unknown. Therefore, we investigated mechanisms that might facilitate regional and distant LN metastasis in extramammary Paget's disease (EMPD). We retrospectively analyzed the impact of tumor-induced lymphatic vessel activation on the survival of 116 patients, the largest cohort with EMPD studied to date. Nodal lymphangiogenesis was significantly increased in metastatic, compared with tumor-free LNs ($P = 0.022$). Increased lymphatic invasion within regional LNs was significantly associated with distant metastasis in LN ($P = 0.047$) and organs ($P = 0.003$). Thus, invasion within regional LNs is a powerful indicator of systemic tumor spread and reduced patient survival in EMPD ($P = 0.0004$). Lymphatic vessels associated with tumors expressed stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), whereas CXCR4 was expressed on invasive Paget cells undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like process. A431 cells overexpressing Snail expressed increased levels of CXCR4 in the presence of TGF- β 1. Haptotactic migration assays confirmed that Snail-induced EMT-like process promotes tumor cell motility via the CXCR4-SDF-1 axis. Sinusoidal lymphatic endothelial cells and macrophages expressed SDF-1 in subcapsular sinuses of lymph nodes before Paget cell arrival. Our findings reveal that EMT-related features likely promote lymphatic metastasis of EMPD by activating the CXCR4-SDF-1 axis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,000,000	0	9,000,000
2009 年度	9,000,000	0	9,000,000
年度		0	
年度		0	
年度		0	
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：がん特性・がん血管と血管、リンパ管新生

キーワード：血管新生、リンパ管新生、浸潤、転移、上皮-間葉転換、予後、皮膚癌

1. 研究開始当初の背景

癌組織における血管新生は、遠隔転移に関わる危険因子の一つとして広く認識されている。本邦でも、抗血管新生療法に基づく分子標的薬は、既に複数の薬剤が臨床応用されている。一方、癌リンパ行性転移は病期進行に関わる場合があり、複数の癌腫で転移はセンチネルリンパ節に始まることが多いため、リンパ節転移の病態解明は極めて重要である。

担癌マウスモデルを用いた研究から、癌組織ではリンパ管新生が起き、所属リンパ節転移を促進することが明らかとなった。リンパ管新生を促進する因子は、vascular endothelial growth factor (VEGF)-C が知られている。VEGF-C は VEGFR-3 に結合し、VEGFR-C-VEGFR-3 は、リンパ管新生に関わる中心的なシグナル伝達経路と考えられている。一方、研究代表者はヒト皮膚からリンパ管内皮細胞を単離し、リンパ管内皮細胞は VEGF-A に応答し、VEGFR-2 を介して増殖することを見出した(Hirakawa et al. *Am J Pathol* 2003)。さらに、皮膚特異的 VEGF-A トランスジェニック・マウスに対して化学発癌を行った。この結果、VEGF-A は癌組織でリンパ管新生を促進すること、リンパ管新生は原発巣のみならずリンパ節でも生じ、遠隔転移の拡大を促進することを見出さした(Hirakawa et al. *J Exp Med* 2005; Hirakawa et al. *Blood* 2007)。しかし、ヒト皮膚癌組織におけるリンパ管新生の働きや

臨床的意義は以前不明である。

乳房外 Paget 病は、高齢アジア人に好発する皮膚悪性腫瘍である(図1)。上皮内癌は、概して予後は良い。一方、浸潤癌はリンパ行性転移しやすく、予後は極めて不良である。従って、乳房外 Paget 病の浸潤・転移機構を解明し、治療の基盤を創出することは極めて重要である。しかし、乳房外 Paget 病の浸潤・転移機構は不明なままである。図1 乳房外 Paget 病の臨床・組織像

A. 外陰部に生じた鮮紅色斑。内部には結節あり。B. HE 染色弱拡大像。肥厚した表皮内では Paget 細胞が増殖している。真皮乳頭層が延長し、脈管が侵入している。稠密な炎症細胞浸潤あり。C. 真皮に生じた脈管浸潤像。D,F. VEGF-A の免疫組織化学染色。正常皮膚(D)は陰性。Paget 細胞及び炎症細胞が強陽性(F)。E,G VEGF-C の免疫組織化学染色。正常皮膚(E)は陰性。Paget 細胞が特異的に陽性(G)。

2. 研究の目的

ヒト皮膚癌組織におけるリンパ管新生を同定し、臨床的意義を見出すことが目的である。

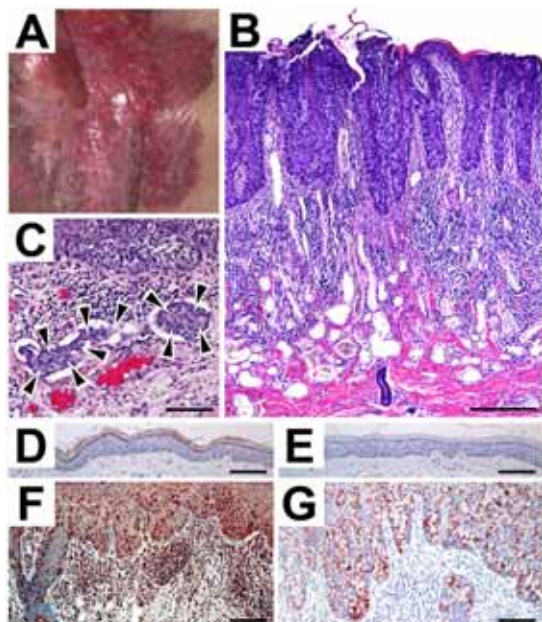
3. 研究の方法

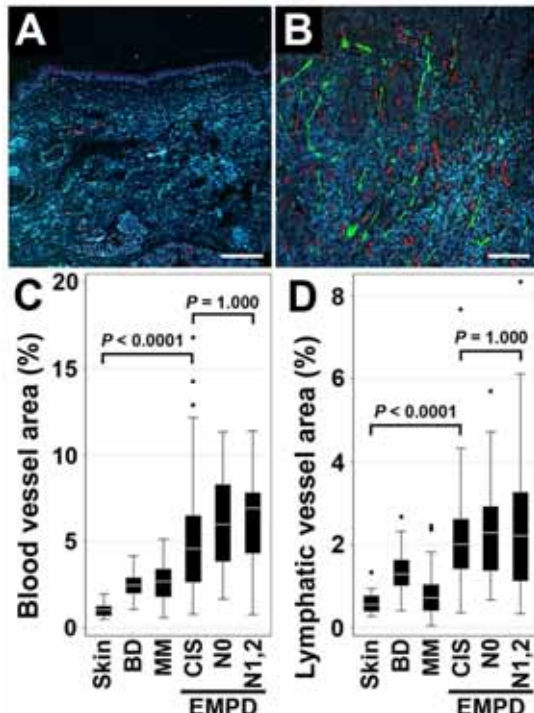
乳房外 Paget 病 106 例について、病理組織学的検討を行った。パラフィン及び新鮮凍結切片に対して、リンパ管特異的マーカーである podoplanin, Prox1 を認識する特異抗体を用いて二重蛍光染色を行った。VEGF-A, VEGF-C の発現は、免疫組織化学染色で検出した。

4. 研究成果

(1)血管・リンパ管新生

皮膚原発巣では、血管及びリンパ管新生が亢進していた(図2)。この生物像は上皮内癌で認められ、浸潤癌でも同程度であった。上皮内癌でも、癌間質には転移に関わるリスクが存在することが示唆された。





乳房外 Paget 病では、病期に関わらず血管及びリンパ管新生が亢進している ($P=1.000$)。乳房外 Paget 病は、Bowen 病 (BD)、悪性黒色腫 (MM) と比較して血管・リンパ管新生が亢進していた ($P<0.0001$)。

従って、リンパ節におけるリンパ管新生は乳房外 Paget 病の転移拡大に関わる重要な因子であることが示唆された。

(2) 上皮-間葉転換

浸潤癌 42 例について検討を行った。リンパ節転移を来し予後不良であった症例では、E-cadherin が腫瘍細胞の膜表面に存在せず、一方間葉系マーカーである N-cadherin 及び vimentin が発現していた。即ち、予後不良群は上皮-間葉転換を来していることが示唆された。さらに、上皮-間葉転換を来した症例では、原発巣でリンパ管浸潤を高率に認めた。従って、リンパ管浸潤は、リンパ管新生に加えて上皮-間葉転換が密接に関与し、リンパ節転移を来すことが示唆された。

(3) リンパ節におけるリンパ管新生

所属リンパ節転移を来した症例では、リンパ節におけるリンパ管新生が亢進していた。この度合いは、N-grade と正の相関が見られた ($P=0.02$)。さらに、リンパ節におけるリンパ管浸潤は、遠隔リンパ節転移及び遠隔臓器転移

と相関し ($P=0.047$, $P=0.003$)、患者予後とも相関していた ($P=0.0004$, $P<0.0001$)。すなわち、リンパ節におけるリンパ管浸潤は、患者予後を評価する上で重要な因子であることが示唆された。

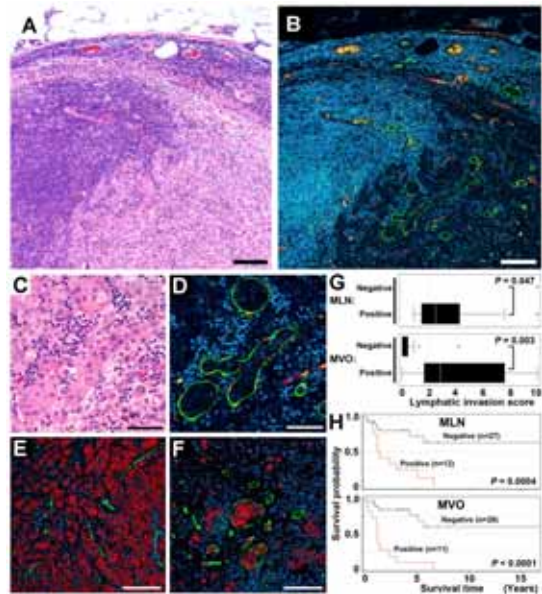


図3 リンパ節におけるリンパ管新生と浸潤
A, B. 所属リンパ節の病理組織弱拡大像。左側に正常リンパ節構造、右側に転移巣を認める (A)。 (B) 同一切片の蛍光二重染色像 (赤, 血管 von willebrand factor; 緑, リンパ管 podoplanin)。転移巣にリンパ管新生が生じている。C, D. 強拡大像。転移性腫瘍細胞は、リンパ洞の内腔に浸潤している。E, F. 蛍光二重染色像 (赤, 腫瘍細胞 cytokeratin 7; 緑, リンパ管 podoplanin)。リンパ節におけるリンパ管浸潤陰性例 (E) と陽性例 (F)。陽性例は、遠隔リンパ節転移 (MLN) 及び遠隔臓器転移 (MVO) と相関していた (G)。さらに、遠隔リンパ節転移は患者予後と相関していた (H)。

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7件)

1. Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis: Role of Tumor-induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y,

- Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K. *Am J Pathol.* 2009; 175:2235-48 査読有
2. Hirakawa S. From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. *Cancer Sci.* 2009; 100: 983-9. 査読有
 3. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K. *J Dermatol Sci.* 2009; 56:188-95. 査読有
 4. IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 2779-88. 査読有
 5. Isokane M, Hieda M, Hirakawa S, Shudou M, Nakashiro K, Hashimoto K, Hamakawa H, Higashiyama S. Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell Sci.* 2008; 121: 3608-18. 査読有
 6. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K. The NF-kappaB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* 2008; 20: 901-9. 査読有
 7. Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto

K. PPAR γ is an important transcription factor in 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci.* 2008; 50: 53-60. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

平川 聡史

リンパ管新生：癌リンパ行性転移と皮膚炎症における役割 (指定演題)

第 83 回日本薬理学会年会 シンポジウム
平成 22 年 3 月 16 - 17 日 大阪

平川 聡史 松尾恵太郎 東川晃一郎 鎌田伸之

Functional role of tumor-associated lymphatic vessels in lymph node metastasis (口演：一般演題)

第 68 回日本癌学会学術総会

平成 21 年 10 月 1 - 3 日 横浜

Hirakawa S, Sato E, Okazaki H, Shudou M, Oike Y, Hashimoto K. Lymphatic hyperpermeability and persistent inflammation induced by cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in angiotensin-related growth factor transgenic mice. 39th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting, Budapest, Hungary, September 9-12, 2009.

平川 聡史 皮膚疾患とリンパ管新生：病態解明を目指して 第 33 回日本リンパ学会総会 シンポジウム 平成 21 年 7 月 17 日、18 日 高槻市

平川 聡史 橋本公二 リンパ管新生：がん組織におけるリンパ管の役割 第 25 回日本 D D S 学会 ワークショップ (指定演題) 平成 21 年 7 月 3 日、4 日 東京

Hirakawa S. Lymph node lymphangiogenesis – a new concept in cancer metastasis. Invited speaker.

Symposium in 7th World Congress on Melanoma and 5th Congress of the European Association of Dermato-Oncology (EADO), Vienna, Austria, May 12-16, 2009.

平川聡史 松尾恵太郎：リンパ管新生：乳房外 Paget 病におけるリンパ行性転移機序 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会（口演：一般演題）

平成21年3月20日、21日 名古屋市

平川聡史

Intra-nodal lymphangiogenesis: a concept reflecting metastatic spread of tumors in the lymphatic system

第34回日本微小循環学会年次総会 シンポジウム 平成21年2月21日 東京

Hirakawa S, Matsuo K. Lymph node lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor and lymphatic vessel activation in extramammary Paget disease. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, October 28-30, 2008.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Katayama I, Detmar M, Hashimoto, K. Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. UICC World Cancer Congress. Geneva, Switzerland, August 27-31, 2008.

Oral presentation.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Katayama I, Detmar M, Hashimoto, K. Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. 5th International Investigative Dermatology. Kyoto, Japan, May 14-17,

2008. Poster presentation.

〔図書〕(計1件)

Detmar M, Hirakawa S. Vascular Biology. Textbook of Dermatology, 2nd ed. Bologna J et al., eds. MOSBY ELSEVIER.

2008 Pp.1553-63.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419511