

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20390455
 研究課題名 (和文) メラノーマとリンパ管の interaction - 転移促進因子は産生されるのか？
 研究課題名 (英文) The influence of interactions between normal lymphatic endothelial cells and melanoma cells on cell migration
 研究代表者
 小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
 北海道大学・北海道大学病院・講師
 研究者番号：70374486

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、リンパ管内皮細胞の産生する液性因子が悪性黒色腫細胞の増殖・遊走性に対してどのような影響を及ぼすのかについて調べた。ヒト新生児真皮由来リンパ管内皮細胞の培養上清 (LEC-CM) に含まれる悪性黒色腫細胞遊走刺激因子について検討し、その結果、LEC-CM に含まれるラミニン 421 が悪性黒色腫細胞の遊走性を刺激していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Laminin-421 secreted by LEC possibly facilitates lymphatic metastasis through the induction of chemotaxis of melanoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野：悪性腫瘍

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：悪性黒色腫、転移

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫はメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、高率にリンパ節転移を来し、進行例の予後は悪く、化学療法や免疫療法などの各種治療法に対して強い抵抗性を示す。早期例では外科的切除により治癒が期待でき、10年生存率は95%以上である一方、リンパ節転移症例では5年生存率は40~50%に低下する。臨床研究においては、悪性黒色腫に対する lymphatic mapping と sentinel node biopsy が普及してきており、sentinel node への転移は重要な予後因子であることが報告されているが、リンパ行性転移のメカニズムの解

析は遅れをとってきた。

しかし最近、リンパ管内皮細胞のマーカー分子として podoplanin や LYVE1 などが同定され、それらを利用しての組織学的なリンパ管内皮細胞の識別やリンパ管内皮細胞の単離・培養が可能になってきた。その結果、リンパ行性転移におけるリンパ管新生の重要性が注目されるようになってきた。例えば、腫瘍組織内に観察されるリンパ管の数とリンパ節転移の頻度との間に正の相関関係が認められている。さらに、腫瘍細胞の産生する VEGF-C や VEGF-D がリンパ管内皮細胞に作用し、リンパ管新生を促すことも見出されて

いる。

一方、リンパ管内皮細胞が腫瘍細胞に働きかける作用も報告されている。例えば、リンパ管内皮細胞の産生するケモカイン CCL21 に対してそのレセプターである CXCR4 や CCR7 を発現した腫瘍細胞が高い遊走性を示すことである。

本研究では、リンパ管内皮細胞の産生する液性因子が悪性黒色腫細胞の増殖・遊走性に対してどのような影響を及ぼすのかについて調べた。

2. 研究の目的

悪性黒色腫の転移・浸潤、特に本腫瘍に多いリンパ行性転移のメカニズムの解明を目指し、リンパ管内皮細胞を用いた本研究を計画した。悪性黒色腫細胞およびリンパ管内皮細胞の相互作用の解明を研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) LEC 培養上清の作製

100-mm 培養皿に 1×10^6 個の LEC を播種し、 37°C の CO_2 インキュベーター内で 3 日間培養した。80%コンフルエントの状態、FBS を含まない EGM2-MV2 培地で 2 回洗浄後、FBS を含まない培地で 24 時間培養し、培養上清 (LEC-CM) を回収した。

(2) 細胞増殖能の測定

細胞増殖能は、WST-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて評価した。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生じる。細胞内脱水素酵素活性に応じて産生されるホルマザンの色素量は生細胞数に比例することを利用した細胞増殖能の評価方法である。96 well プレートの各 well に、10%FBS DME/F12 に浮遊させた各悪性黒色腫細胞 (5×10^3 cells/ $100 \mu\text{l}$ /well) を播き培養した。16 時間後、培地を取り除き FBS を含まない EGM2-MV2 培地で洗浄し、LEC-CM を $100 \mu\text{l}$ /well を加えた。24 および 48 時間後、WST-8 ($10 \mu\text{l}$ /well) を加え、 CO_2 インキュベーター内に静置した。1 時間後、ホルマザン色素を Microplatereader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用い、450nm の吸光度で測定した。

(3) 細胞遊走能の測定

細胞遊走能は、トランスウェル・チャンバー (Transwell cell culture chamber, Coster, Cambridge, MA) を用いたケモタキシスアッセイで評価した。トランスウェルの下室に LEC-CM $600 \mu\text{l}$ を、上室には DME/F12 に浮遊

させた 2×10^5 cells/ml の各悪性黒色腫細胞浮遊液 $100 \mu\text{l}$ を入れ、 CO_2 インキュベーター内で 6 時間静置した。ポジティブコントロールとして、トランスウェルの下室にファイブロネクチン (bovine fibronectin, Telios, San Diego, CA) $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を入れ、ファイブロネクチンに対する遊走能を調べた。インキュベーション後、トランスウェル・チャンバーの上下の培養液を捨て、5%グルタルアルデヒド溶液で固定後、ギムザ液で染色した。フィルター上面の細胞を綿棒でぬぐい去ったあと、フィルター下面の細胞を倒立顕微鏡下で観察した。ケモタキシス活性は、1 視野 (100 倍) あたりの細胞数で表した。

(4) 熱処理、限外濾過

LEC-CM を 56°C 、30 分間および 90°C 、5 分間の熱処理を行った後、ケモタキシス・アッセイを行った。また、マイクロポアフィルター (Microcon, Millipore, Billerica, MA) を用いて LEC-CM を 30kDa 以上・以下、100kDa 以上・以下に分画し、それぞれの分画に対する悪性黒色腫細胞のケモタキシス活性を調べた。

(5) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

培養した LEC からの全 RNA 抽出は TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて行った。総量 $3 \mu\text{g}$ の全 RNA をもとに moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) と random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として、AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) と ラミニン $\alpha 1 \sim 5$ 、ラミニン $\beta 1 \sim 3$ 、ラミニン $\gamma 1 \sim 3$ に特異的なプライマーを用いて PCR を行った (表 1B)。内因性コントロールとして GAPDH のプライマーを用いた。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルにて電気泳動した後、エチジウム・ブロマイドで染色し、UV イルミネーターで観察した。

(6) ウェスタンブロッティング法

5-10%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルにて SDS-PAGE を行い、蛋白質を分離後 PVDF 膜に転写した。転写した膜を blocking buffer (5% skim milk を含んだ TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 137 mM NaCl; 0.1% Tween) を用いて室温で 1 時間ブロッキングをした。一次抗体である、抗ラミニン $\alpha 4$ 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、抗

ラミニン β 1 抗体、抗ラミニン γ 1 抗体は Chemicon (Temecula, CA)、抗ラミニン β 2 抗体は BD biosciences (San Jose, CA) より購入した。一次抗体と室温で1時間反応させた後に TBS-T で膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と室温で1時間反応させた。TBS-T で洗浄後、ペルオキシダーゼの検出を Immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA) を用い、LAS1000mini (Fuji Film, Tokyo, Japan) で行った。

(7) 免疫沈降

protein A sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) にウサギ抗ラミニン 1 抗体 (Sigma, St. Louis, MO) を結合させた。この複合体を LEC-CM に加え、4°C で転倒混和した。遠心後に上清と免疫沈降物とをそれぞれ回収し、ケモタキシンアッセイおよびウエスタンブロット解析に供した。

(8) フローサイトメトリー

悪性黒色腫細胞株 C8161 と MeWo のインテグリンと CD151 の発現を、フローサイトメトリーにより解析した。各細胞をトリプシン・EDTA 溶液により培養皿から剥離して回収し、0.065% NaN_3 PBS で2回洗浄後、氷温で1時間1次抗体で処理し、引き続き氷温で45分間 FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel, Aurora, OH) あるいは FITC 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) で処理した。1次抗体には、マウス抗インテグリン α 2 抗体 (AK7, Chemicon, Temecula, CA)、ラット抗インテグリン β 1 抗体 (mAb13, Becton Dickinson, San Jose, CA)、マウス抗インテグリン β 3 抗体 (RUU-PL7F12, Becton Dickinson, San Jose, CA)、マウス抗インテグリン β 4 抗体 (ASC-3, Chemicon, Temecula, CA)、マウス抗インテグリン β 5 抗体 (AST-3T, Frontier Science, Ishikari, Japan)、マウス抗インテグリン α 3 抗体 (ASC-1, Chemicon, Temecula, CA)、マウス抗インテグリン α 6 抗体 (4F10, Chemicon, Temecula, CA) およびマウス抗 CD151 抗体 (Acris, Hiddenhausen, Germany) を用いた。細胞はナイロンメッシュを通した後、 1×10^4 個の細胞の蛍光強度を FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) で解析した。

(9) インテグリンの機能阻害

悪性黒色腫細胞株 C8161、MeWo をトリプシン・EDTA 溶液により培養皿から剥離して回収

した細胞浮遊液 (2×10^5 個/ml) に、ラット抗インテグリン α 3 抗体 (SM-T1, 辻 勉博士, 星薬科大学より供与)、あるいはマウス抗インテグリン α 6 抗体 (GoH3, BioLegend, San Diego, CA) をそれぞれ $30 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ 加え、37°C、30分間、 CO_2 インキュベーター内に静置した。

(10) CD151 の発現抑制

CD151 の発現を抑制するために siRNA を用いた。CD151 遺伝子の発現抑制には siCD151-#4 (sense: 5' -GCAGGUCUUUGGCAUGA-3' ; antisense: 5' -UCAUGCCAAAGACCUGCUU-3'), #2 (sense: 5' -CCUCAAGAGUGACUACAUCUU -3' ; antisense: 5' -GAUGUAGUCACUCUUGAGGUU-3') を用いた (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。コントロールの siRNA には、既知の哺乳類の遺伝子とは相同性のない AllStars Negative Control siRNA (Qiagen, Valencia, CA) を使用した。siRNA の導入は、Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて行った。siRNA 導入24時間後に蛋白を抽出し、抗 CD151 抗体 (11G5a, Acris, Hiddenhausen, Germany) を用いたウエスタンブロット法で CD151 の発現を確認した。

(11) 統計学的検定

統計学的検定には Student's t-検定を行い、* $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

悪性黒色腫細胞がリンパ節に転移するためには、悪性黒色腫細胞は LEC と出会わなければならない。両者の間には何らかの相互作用が生じていると考えられる。本研究では、悪性黒色腫細胞と LEC との相互作用、特に LEC が悪性黒色腫細胞の増殖・遊走性に及ぼす影響について検討した。その結果、1) LEC がラミニン 421 を産生・分泌すること、ならびに 2) ヒトメラノーマ細胞がラミニン 421 に対してケモタキシンを示すことが初めて明らかとなった。

まず、LEC-CM は検討した5系の悪性黒色腫細胞の増殖性には影響を及ぼさないが、それらのケモタキシンを誘導することが明らかとなった。この事実は、LEC-CM 中に悪性黒色腫細胞に対するケモタキシン因子が含まれていることを示している。これまで LEC によって分泌されケモタキシンを亢進する因子についていくつかの報告がなされている。それらの多くはケモカインに関するものであ

る。しかしながら、本研究で見出された LEC-CM のケモタキシス活性は、分子量 100 kDa 以上の粗分画に認められ、低分子量 (8 から 14 kDa) であるケモカイン・ファミリーに属するものではないと考えられた。Podglabinska ら、Hirakawa ら、Petrova らはマイクロアレイ解析によって LEC および血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルを比較検討している。それらのデータには、LEC が発現している 100 kDa 以上の分子をコードしている遺伝子としてラミニン、ナイドジェンなどの細胞外マトリックス構成成分が含まれていた。細胞外マトリックス成分は様々な種類の腫瘍細胞のケモタキシスを含む細胞運動性を刺激することが知られている。悪性黒色腫の血行性転移においても、ラミニンは、メラノーマ細胞の血管内皮下基底膜への接着や浸潤過程において促進的に働くことが報告されている。そこで細胞外マトリックス成分であるラミニン、ナイドジェンに着目して LEC-CM に含まれるケモタキシス活性について検討を進めた。ラミニンとコラーゲンとの架橋分子であるナイドジェンは、LEC-CM 中に存在することがウエスタンブロット法によって確認された。しかし、LEC-CM からナイドジェンを除去しても、C8161 細胞に対するケモタキシス活性は減少することはなかった。このことから、ナイドジェンはケモタキシス活性の本体ではないと判断し、引き続き LEC-CM 中のラミニンの存在とそのケモタキシス活性について検討した。ラミニンは α 鎖、 β 鎖および γ 鎖からなる三量体を形成し、タイプ IV コラーゲン、硫酸ヘパランプロテオグリカン、ナイドジェンとともに細胞基底膜を構成する。これまでに 5 種類の α 鎖、3 種類の β 鎖および 3 種類の γ 鎖が同定されており、ラミニン三量体として合計 15 種類のサブタイプが知られている。ラミニン三量体のうち α 鎖は、レセプターと相互作用するドメインを有し機能的に最も重要であり、また、組織特異的な発現パターンを示す。

LEC は最近まで細胞自体の識別・分離が甚だ困難であったため、LEC が産生するラミニンのサブタイプを明らかにした報告は少ない。本研究では、LEC は $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ のラミニン鎖を発現していることが mRNA および蛋白レベルの両方で確認された。本研究で用いた抗体のひとつであるポリクローナル抗ラミニン-1 抗体 (抗ラミニン $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ 抗体) は、 $\gamma 1$ 鎖上に存在するエピトープを認識する。この抗体を用いて LEC-CM からラミニン $\gamma 1$ を免疫沈降し、その沈降物をウエスタンブロットしたところ、ラミニン $\alpha 4$ 、

$\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 鎖が検出された。さらに、免疫沈降後の LEC-CM はもはや悪性黒色腫細胞 C8161 に対するケモタキシス活性を有していないことがわかった。これらのことから、LEC-CM に含まれるラミニンのうち、ラミニン $\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$ (ラミニン 421) の三量体が悪性黒色腫のケモタキシスを誘導していると判断した。これらの結果は、ラミニン 421 が LEC によって産生・分泌され、さらにメラノーマ細胞に対してケモタキシス活性を有することを初めて示している。

ラミニンに対して悪性黒色腫細胞がケモタキシスを発揮するのであれば、悪性黒色腫細胞はラミニンを認識する接着因子を発現しているはずである。ラミニンに結合する接着因子としてインテグリン・ファミリーに属するものが知られている。インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ および $\alpha 3 \beta 1$ が主にラミニン $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖に結合する。これらのインテグリンの発現をフローサイトメーターで解析したところ、用いた悪性黒色腫細胞すべてにおいてこれらインテグリンの発現が認められた。悪性黒色腫細胞 C8161 にインテグリン $\alpha 6$ および $\alpha 3$ の機能を阻害できる抗体を作用させ、LEC-CM へのケモタキシスを調べたところ、この C8161 細胞のケモタキシスは有意に低下した。ラミニン結合性インテグリンと複合体 tetraspanin-enriched microdomain を形成し、ラミニンを介した細胞運動性を調節する因子に CD151 がある。悪性黒色腫細胞株 C8161 および MeWo の CD151 の発現を siRNA を利用して抑制し、LEC-CM に対するケモタキシスを調べたところ、これらの細胞のケモタキシスは有意に低下した。以上の結果から、悪性黒色腫細胞はラミニン結合性インテグリンを介して LEC-CM 中にあるラミニンを認識してケモタキシスを起こしていると考えられた。

リンパ管は免疫反応においてのみならず、腫瘍細胞のリンパ行性転移、播種の主経路であり、生命予後を左右する転移の機序において重要な器官である。しかし、腫瘍細胞がリンパ管壁を通過し、リンパ管内に入るメカニズムは未だ不明である。本研究により、リンパ管内皮細胞が産生するラミニン 421 が悪性黒色腫細胞のリンパ管への遊走や、転移リンパ節における悪性黒色腫細胞の浸潤に深く関与している可能性が示唆された。

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 2 件)

① Saito N, Hamada J, Furukawa H,

Tsutsumida A, Oyama A, Funayama E, Saito A, Tsuji T, Tada M, Moriuchi T, Yamamoto Y: Laminin-421 produced by lymphatic endothelial cells induces chemotaxis for human melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res. 22, 601-10, 2009 査読有

- ② 齋藤典子：リンパ管内皮細胞が産生するラミニン 421 は悪性黒色腫の遊走を促進する. 北海道医学雑誌 84, 83-91, 2009 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 齋藤典子, 浜田淳一, 古川洋志, 堤田新, 齋藤亮, 山本有平：メラノーマにおけるリンパ行性メカニズムの検討：リンパ管内皮細胞が産生するラミニン 421 はメラノーマの遊走を促進する. 第77回日本形成外科学会・北海道地方会, 札幌市, 2009.2.7
- ② 齋藤典子, 浜田淳一, 多田光宏, 守内哲也, 古川洋志, 堤田新, 齋藤亮, 山本有平：Interactions of lymphatic endothelial cells with melanoma cells implicated in melanoma lymphatic metastasis. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋市, 2008.10.29
- ③ 齋藤典子, 浜田淳一, 多田光宏, 守内哲也, 古川洋志, 堤田新, 齋藤亮, 山本有平：メラノーマのリンパ行性転移メカニズム：リンパ管内皮細胞が産生する液性因子はメラノーマの遊走を促進する. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京都, 2008.10.2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤田 新 (TSUTSUMIDA ARATA)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00374489
(H20)

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：70374486
(H21～H22)

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00399924

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10533630

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00432146

齋藤 亮 (SAITO AKIRA)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：70507574

(3) 連携研究者

なし