

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：34449

研究種目：基盤(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591682

研究課題名（和文） SATB1・VEGF-C siRNAとデコイベクターによる乳癌リンパ節転移阻止

研究課題名（英文） Inhibitory study on lymph node metastasis of mammary cancer by SATB1 and VEGF-C siRNA and decoy vectors

研究代表者

柴田 雅朗 (SHIBATA MASA-AKI)

大阪保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：10319543

研究成果の概要（和文）：

乳癌の増殖と転移を促進する SATB1 を siRNA でノックダウンさせ、VEGF-C の受容体である VEGFR-3 に対するデコイは VEGF-C の機能低下（抗リンパ管新生）をもたらす。VEGFR-3 デコイはマウス乳癌モデルのリンパ節転移を抑制した。しかし、乳癌の増殖と転移を促進する SATB1 の siRNA ではその効果は観察されなかった。VEGFR-3 デコイの持つ転移抑制活性は臨床的に意義の高い所見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

SATB1 that enhances growth and metastasis of breast cancer was blocked by siRNA. A decoy vector for VEGFR-3 (receptor for VEGF-C) reduces VEGF-C function (anti-lymphangiogenesis) VEGFR-3 decoy but not Satb1 siRNA can inhibit mainly lymph node metastasis on mouse mammary cancer model. The antimetastatic activity of VEGFR-3 decoy may be of high clinical significance.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科学・乳癌・遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳癌はリンパ節、肺、肝、骨などに転移し、腫瘍サイズとの間には強い正の相関があり、生存率とは負の相関がある。その中でもリンパ節転移は最も予後の悪い因子である。この意味では転移を阻止する治療法の開発は急務である。リンパ管新生因子の VEGF-C が乳癌のリンパ節転移に対して促進的に作用することが知られている。また、2008年になって、

乳癌で過剰発現している SATB1 は乳癌の増殖と転移を促進するゲノムオーガナイザーであると報告された。

2. 研究の目的

SATB1 を siRNA により機能阻害し、また VEGF-C の受容体である VEGFR-3 をデコイベクター（おとりの可溶性 VEGFR-3 受容体：sVEGFR-3）により、VEGF-C を機能喪失させ、

乳癌のリンパ節転移の抑制を試みた。また、追加実験を設けた。その理由は、2009年に角膜に何故、リンパ管が生じないかの機序が解明された。すなわち、角膜ではVEGFR-2のサブライミングバリエーションにより内因性の可溶性VEGFR-2(esVEGFR-2)が分泌され、VEGF-Cを補足しVEGF-Cの機能が阻害されることに起因する。そこでVEGF-Cの機能喪失の別の手法としてesVEGFR-2の発現ベクターを用いて、追加実験を行った。

3. 研究の方法

SATB1に対する異なった配列を標的とする4種類の2重鎖siRNAを合成した。BJMC3879細胞にこれらのsiRNAを細胞に遺伝子導入し、24時間後にreal-time RT-PCRによりノックダウン効率を解析し、最も効果の高いsiRNA配列を発現ベクターに組み込んだ。動物実験として、BJMC3879乳癌細胞(ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ)をBALB/cマウス雌に移植し、週1回、腫瘍内にSATB1 siRNAベクター(psiSATB1)、可溶性VEGFR-3デコイベクター(psVEGFR-3)あるいは対照として空ベクター(pVec)を遺伝子導入し、実験終了の6週まで実施した。追加実験として、esVEGFR-2と対照ベクターの投与を行った。腫瘍径を毎週、計測した。実験終了後、全生存動物を屠殺・剖検し、病理組織学的標本作製し、転移の有無を病理組織学的に検索した。また、血管内皮のマーカーであるCD31を指標として、リンパ管内皮のマーカーであるPodoplaninないしはLYVE-1を指標として、それらの腫瘍組織内での密度を算定した。

4. 研究成果

経時的な腫瘍体積はpsVEGFR-3群で、実験開始の2週後より実験終了まで有意な抑制が観察された。実験終了時の発光によるバイオイメージング解析では、腫瘍の拡がりはこの群で抑制傾向が観察された。病理組織学的解析では、リンパ節転移および直径1mm以上の肺転移巣の個数は、psVEGFR-3群で有意な抑制が示された。更にマウス1匹当たりの総ての転移の平均個数にも有意な抑制が観察された。Podoplaninの免疫組織学的染色標本で腫瘍内リンパ管を観察した。腫瘍内の拡張リンパ管内にしばしば癌細胞を確認した。このリンパ管侵襲の見られたリンパ管の数を定量した結果、psVEGFR-3群ではその数は有意に低下しており、リンパ節転移の抑制を裏付ける所見であった。腫瘍内の微小血管密度はCD31に対する免疫組織学的染色標本にて解析した。その結果、群間に差異は見られなかった。追加的に行ったesVEGFR-2では腫瘍径の有意な抑制、リンパ節および肺転移の有意な抑制をみた。また、腫瘍内のリンパ管新生(LYVE-1染色標本)ならびに癌細胞によるリ

ンパ管侵襲(Podoplanin染色標本)の抑制を観察した。しかし、腫瘍内の血管新生(CD31染色標本)には影響は示されなかった。以上、高転移性マウス乳癌モデルにおいて、VEGF-Cと結合してその機能を喪失させるsVEGFR-3デコイやesVEGFR-2は、有意な転移抑制作用をもたらした。一方、乳癌の増殖と転移に関わると報告された新規のSATB1遺伝子に対するsiRNA発現ベクターには抗腫瘍効果は発揮されなかった。sVEGFR-3デコイおよびesVEGFR-2は血管新生に影響を及ぼさず、リンパ管新生のみに抑制をもたらした事実は、癌のみならずリンパ管増生を示すリンパ管疾患にも効果があると考えられ、極めて臨床的意義の高い所見と考えられる。

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3件)

- ① Shibata, M.A., Ambati, J., Shibata, E., Albuquerque, R.J., Morimoto, J., Ito, Y. and Otsuki, Y. The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. BMC Med, 査読有、8巻、online resource ID:69, 2010.
- ② 柴田雅朗, 森本純司, 柴田映子, 大槻勝紀. VEGF-C, VEGF-DあるいはVEGF-A siRNA発現ベクターを用いた高転移性マウス乳癌モデルに対する癌遺伝子治療. リンパ学. 査読有、33巻、42-47, 2010.
- ③ 柴田雅朗, Ambati Jayakrishna, 柴田映子, Albuquerque Romulo, 森本純司. 新規の内因性可溶性VEGF受容体2型は高転移性マウス乳癌のリンパ節転移を抑制する. 乳癌基礎研究. 査読無、20巻、22-30, 2011.

[学会発表] (計5件)

- ① 柴田雅朗, 「Splicing variantである可溶性VEGF受容体2(sVEGFR-2)遺伝子は高転移性マウス乳癌に対してリンパ節転移ならびに肺転移を抑制する」第20回乳癌基礎研究会. 2010年7月17日宮崎.
- ② 柴田雅朗, 第42回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 「血管新生・リンパ管新生を標的とした乳癌治療の基礎研究」2010年9月23日静岡.
- ③ 柴田雅朗, 第33回日本分子生物学会年会・第38回日本生化学会大会合同大会. 「エレクトロポレーションによる実験動物を用いた癌遺伝子治療の基礎」2010年12月8日神戸.
- ④ 柴田雅朗, 「新規内因性リンパ管新生抑制因子である可溶性VEGF受容体2型のマウス乳癌に対するリンパ節転移抑制作用」第

35 回日本リンパ学会総会. 2011 年 6 月 3 日東京.

- ⑤柴田雅朗、「リンパ管新生を標的とした新規内因性可溶性 VEGF 受容体 2 型のマウス乳癌リンパ節転移抑制」第 43 回日本臨床分子形態学会総会. 2011 年 9 月 9 日大阪.

〔図書〕(計 1 件)

- ①Shibata, M. A., Morimoto, J., Shibata, E., Harada-Shiba, M. and Fujioka, S. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of anti-VEGF-C and enhanced IL-12 therapy in an immunocompetent mouse mammary cancer model. In Gunduz, E. G. a. M. (ed.), 「Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities」InTech 社, Rijieka, pp. 489-502, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://lab-anat-histopathol.jp/kakenhi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 雅朗 (Shibata Masa-Aki)
大阪保健医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 10319543

(2) 研究分担者

森本 純司 (Morimoto Junji)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90145889

(3) 連携研究者

なし

