

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249052

研究課題名(和文) 臨床的応用に視点を置いたリンパ行性微小癌転移機構解明の体系的研究

研究課題名(英文) Molecular and physiological approach for addressing the mechanisms of micrometastasis of carcinoma cells within the sentinel lymph node

研究代表者

大橋 俊夫(OHASHI, Toshio)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80020832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円、(間接経費) 10,890,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌や悪性黒色腫の治療として、その臨床的意義が確立されてきているセンチネルリンパ節理論であるが、生理学的視点から考え直してみると、癌の原発巣から最も多量のリンパ液が流れ込んでいるリンパ節と言い換えることができる、との仮説を提唱してきた。その証明のために、多角的かつ網羅的に解析を行った。本研究課題の遂行により、リンパの流れ自体が刺激となり、リンパ節の微小環境変化を惹起する機構の一部が解明でき、生体内でのセンチネルリンパ節内に癌転移巣を形成する過程が明らかとなった。本研究結果をもとに、センチネルリンパ節内癌転移を抑制あるいは治療するような臨床応用に向けた基盤作りができたと考える。

研究成果の概要(英文)：We have considered the sentinel lymph node (SLN) to be constantly subjected to a high lymph flow rate. According to their physiological and biomechanical characteristics, thus we hypothesized that SLN contains lymphatic endothelial cells (LEC) that are constantly loaded with high levels of shear stress. To test this hypothesis, we investigated the effects of shear stress stimulation on the expression of adhesion molecules on human LEC isolated from the lymph vessels nearest the SLN of breast cancers, and on the release of ATP from human LEC. In conclusion, shear stress stimulation induces ICAM-1 expression on human LEC by activity cell surface F1/FO ATP synthase, which might contribute to the development of premetastatic environment within SLN.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：循環生理学 リンパ系 癌転移 リンパ節 微小環境

1. 研究開始当初の背景

私共のこれまで35年間におけるリンパ学の循環器病学、自然免疫学、腫瘍学に関連した研究成果 (*Cir. Res.*, 1983; *J. Physiol. (Lond)*, 1983; *Am. J. Physiol.*, 1979, 1981, 1990, 1991, 1999, 2000, 2001, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008, 2009; *Am. J. Pathol.*, 2008; *Cancer Cell* 2004; *Annals. Surg. Oncol.*, 2004; *Cancer Sci.*, 2009) を統合し、分子生物学、分子遺伝学、生理学、薬理学、組織学等の研究手法を多視点より活用してきた。

2. 研究の目的

従来報告とは異なり、リンパ節のリンパ管内皮細胞を受け皿として、リンパ行性微小癌転移機構の形成に關与するセンチネルリンパ節の微小環境要因の変化を体系的に解明し、その基礎実験結果を踏まえて微小癌転移診断・治療法を新しく開発し、臨床応用を目指すことが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

リンパ管、リンパ節、リンパ球より成るリンパ系の統合的な生理機能を、循環器学、免疫学、腫瘍学の3つの視点から、低酸素環境においてリンパ液中のアルブミン濃縮機能を仲介して、内部環境の恒常性維持に努める脈管システムと生体防御システムという統一概念の下、リンパ行性微小癌細胞転移様式の解明し、その基礎実験結果を踏まえて、センチネルリンパ節の微小癌転移の診断・治療を目指して体系的に実験を行うことを基本とする。

4. 研究成果

乳癌や悪性黒色腫の治療として、その臨床的意義が確立されてきているセンチネルリンパ節理論であるが、生理学的視点から考え直してみると、癌の原発巣から最も多量のリンパ液が流れ込んでいるリンパ節と言い換えることができる、との仮説を提唱してきた。その証明のために、ヒト集合リンパ管由来リンパ管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験、ラット・マウスの小動物からミニブタの大動物を用いた *in vivo* 実験を行い、多角的かつ網羅的に解析を行った。すなわち、(1)培養ヒトリンパ管内皮細胞およびヒト乳癌細胞株に流れ刺激を負荷して、培養上清のATP濃度、炭酸ガス分圧変化を測定し、その特性を解析した。(2)ラット尾部に、流れ刺激によってリンパ管内皮細胞から分泌されるのと同濃度のATPを外因的に投与し、リンパ節内の微小環境変化について免疫組織染色法を用いて解析した。(3)ミニブタの胃の粘膜下に超音波造影剤を投与してリンパ管・リンパ節の

可視化技術を確立し、流れ刺激が生体内のリンパ節にどのような生物学的変化を惹起するかについて解析した。

本研究課題の遂行により、リンパの流れ自体が刺激となり、リンパ節の微小環境変化を惹起する機構の一部が解明でき、生体内でのセンチネルリンパ節内に癌転移巣を形成する過程が明らかとなった。本研究結果をもとに、センチネルリンパ節内癌転移を抑制あるいは治療するような臨床応用に向けた基盤作りができたと考える。

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22件)

1) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Cell surface F1/F0 ATP synthase contributes to interstitial flow-mediated development of the acidic microenvironment in tumor tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305: C1139-C1150, 2013, 査読有

2) Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, Yang X, Jensen L, Lim S, Feng N, Xue Y, Li X, Larsson O, Ohhashi T, Cao Y. Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat. Comm.* 4, article number: 2129, 2013, 査読有

3) Bridenbaugh EA, Nizamutdinova IT, Jupiter D, Nagai T, Thangaswamy S, Chatterjee V, Gashev AA. Lymphatic muscle cells in mesenteric lymphatic vessels of various ages. *Lymphat. Res. Biol.* 11: 35-42, 2013, 査読有

4) 大橋俊夫 日本発汗学会20年のあゆみと将来展望 - 自らの手掌部発汗研究のあゆみと照らし合わせて - 発汗学 20(1): 2-11, 2013, 査読有

5) 河合佳子 ずり応力刺激による脈管内皮細胞機能の制御機構(総説) 信州医学雑誌 61(2): 45-56, 2013, 査読有

6) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管の解剖・生理学の最近のトピックス *Angiology Frontier* 12(2): 91-96, 2013, 査読有

7) Kawai Y, Yoshida K, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Shear stress-mediated F1/F0 ATP synthase-dependent CO₂ gas excretion from human pulmonary arteriolar

endothelial cells. J. Cell. Physiol. 227(5): 2059-2068 2012, 査読有

8) Ohhashi T. The establishment of new lymphology: Overview. Ann. Vasc. Dis. 5: 247-248, 2012, 査読有

9) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Pivotal roles of shear stress in the microenvironmental changes that occur within sentinel lymph nodes. Cancer Sci. 103(7): 1245-1252, 2012, 査読有

10) Ikomi F, Kawai Y, Ohhashi T. Recent advance in lymph dynamic analysis in lymphatics and lymph nodes. Ann. Vasc. Dis. 5: 258-268, 2012, 査読有

11) Kawai Y, Ohhashi T. Current topics of immunohistochemical and biological properties of human lymphatic endothelial cells. Ann. Vasc. Dis. 5: 269-274, 2012, 査読有

12) 河合佳子, 大橋俊夫 リンパ管内皮細胞の機能についての新知見 リンパ学 35(1): 18-19, 2012, 査読有

13) Kawai Y, Ajima K, Nagai T, Kaidoh M, Ohhashi T. Real-time imaging of the lymphatic channels and sentinel lymph nodes of the stomach using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in a porcine model. Cancer Sci. 102(11): 2073-2081, 2011, 査読有

14) Nagai T, Bridenbaugh EA, Gashev AA. Aging-associated alterations in contractility of rat mesenteric lymphatic vessels. Microcirculation 18(6): 463-473, 2011, 査読有

15) Maejima D, Kawai Y, Ajima K, Ohhashi T. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB produces NO-mediated relaxation and PDGF receptor-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels. Microcirculation 18(6): 474-486, 2011, 査読有

16) Tsujino N, Nakada T, Tsubouchi K, Kobayashi M, Kawai Y, Yano S, Matsunaga T, Hirose M, Ohmori S, Ohhashi T, Yamada M. Thrombin activates Ca²⁺-permeating nonselective cation channels through protein kinase C in human umbilical vein endothelial cells. Shinshu Medical Journal 59(1): 13-26, 2011, 査読有

17) Aki TJ, Nagai T, Cote GL, Gashev AA. Mesenteric lymph flow in adult and aged rats. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 301(5): H1828-1840, 2011, 査読有

18) 大橋俊夫, 河合佳子 リンパ管とリンパ節の機能と形態の特性 - リンパ浮腫との関連から - 日本マイクロサーージャリー学会誌 24(3): 228-232, 2011, 査読有

19) Kawai Y, Yokoyama Y, Kaidoh M, Ohhashi T. Shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 298(3): C647-C655, 2010, 査読有

20) Gashev AA, Nagai T, Bridenbaugh EA. Indocyanine Green and lymphatic imaging: current problems. Lymphat. Res. Biol. 8(2): 127-130, 2010, 査読有

21) 大橋俊夫, 河合佳子 むくみを深く知るための生理学 臨牀看護 36(7): 850-854, 2010, 査読有

22) 大橋俊夫, 河合佳子 リンパ循環学から見た皮膚の美しさと健康 日本香粧品学会誌 34(4): 292-296, 2010, 査読有

〔学会発表(国内は招待講演・シンポジウムのみ)〕(計24件)

1) 河合佳子 流れ刺激による肺の炭酸ガス排出機構における新しい概念 日本学術会議中部地区講演会(松本:2013年7月12日)

2) 河合佳子, 大橋俊夫 肺での炭酸ガス発生における流れ刺激の役割: 新呼吸概念の提言 第14回関東心・血管フォーラム(東京:2013年6月1日)

3) 河合佳子 リンパ管やリンパ節の生理・病態生理学的役割におけるリンパの流れの意義について 第14回リンパ微小循環研究会 特別講演(大分:2012年11月7日)

4) 大橋俊夫 日本発汗学会20年のあゆみと将来展望 - 自らの手掌部発汗研究のあゆみと照らし合わせて - 第20回日本発汗学会総会 特別講演(奈良:2012年8月24,25日)

5) 大橋俊夫 リンパ浮腫の外科治療に関連したリンパ動態学の基礎知識 第47回日本形成外科学会中部支部学術集会 特別講演

(松本：2012年7月7日)

6) 河合佳子、大橋俊夫 流れ刺激によるリンパ管内皮細胞の特性変化とセンチネルリンパ節環境変化に関する研究 第36回日本リンパ学会総会 シンポジウム(東京：2012年6月28-30日)

7) 大橋俊夫 私の研究の歩みとその根底に流れる研究哲学 - そこから見た循環器病学の将来展望 - 第60回循環力学研究会 記念講演(東京：2012年5月26日)

8) 河合佳子 260gの偉大な臓器：腎臓 - 体重の1/200の臓器に1/4の血液が流れている理由 - 第89回日本生理学会大会 日本生理学会教育委員会シンポジウム：生理学モデル講義(松本：2012年3月29-31日)

9) 河合佳子、安嶋久美子、大橋俊夫 超音波造影剤ソナゾイドによるリンパ節の可視化とその臨床応用 第89回日本生理学会大会 日本リンパ学会連携シンポジウム(松本：2012年3月29-31日)

10) 大橋俊夫 物理的因子(流れと圧力)と血管の働きとの関係について 第25回日本老年脳神経外科学会 教育講演(松本：2012年3月16日)

11) 河合佳子、大橋俊夫 VEGF-Cを介する集合リンパ管の再疎通現象について 第85回日本薬理学会年会 シンポジウム(京都：2012年3月13,14日)

12) Kawai Y, Ohhashi T. Physiological and pathophysiological roles of shear stress in vascular endothelial cells: New proposed concept of shear stress-mediated carbon dioxide exchange in human lungs. The 5th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular biology, Symposium (Shanghai, China: 4-7, November, 2011)

13) 河合佳子、大橋俊夫 流れ刺激による脈管内皮細胞の機能制御について 第52回日本脈管学会総会 シンポジウム(岐阜：2011年10月19-21日)

14) 大橋俊夫 リンパ管系の機能と形態との相互連関について 第35回日本リンパ学会総会 基調講演(東京：2011年6月2-4日)

15) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管内皮細胞の機能についての新知見 第35回日本リンパ学会総会 シンポジウム(東京：2011年6月2-4日)

16) 河合佳子 炎症・癌転移とリンパ系との

連関 第59回循環力学研究会 (東京：2011年5月14日)

17) 河合佳子、大橋俊夫 Evaluation of shear stress stimulation for gene and protein expression in lymphatic endothelial cells: with special reference to functional regeneration of collecting lymph vessels. 第36回日本微小循環学会総会 シンポジウム(名古屋：2011年2月10-12日)

18) Kawai Y, Ajima K, Nagai T, Ohhashi T. Detection of sentinel lymph node using contrast-enhanced ultrasonography with sonazoid in swine stomach in vivo. The 7th International Sentinel Node Society Meeting (Yokohama, 18-20, November, 2010)

19) Ohhashi T. Novel Basic and Therapeutic Insights in Angiogenesis and Lymphangiogenesis. 9th World Congress for Microcirculation Chairperson (Paris : 24-30, September, 2010)

20) Kawai Y, Ohhashi T. VEGF-C-mediated reconnection of collecting lymph vessels. 9th World Congress for Microcirculation Chairperson (Paris : 24-30, September, 2010)

21) 大橋俊夫 循環器学、免疫学、腫瘍学を連携した新しいリンパ学の創生 第34回日本リンパ学会総会 特別講演(東京：2010年6月24-26日)

22) 大橋俊夫、河合佳子 リンパ循環学から見た皮膚の美しさと健康 第35回日本化粧品学会 特別講演(東京：2010年6月4日)

23) 大橋俊夫 センチネルリンパ節における微小癌転移成立機構について 第4回なにわ皮膚腫瘍研究会 特別講演(大阪：2010年5月14日)

24) 河合佳子 shear stress 刺激によるリンパ管内皮細胞における eNOS 発現 第11回関東心・血管フォーラム(東京：2010年5月22日)

[図書](計16件)

1) 大橋俊夫 第8章 血液 第9章 循環, 分担執筆 標準生理学 第8版, 編集委員, 医学書院, 東京, p.502-666 (2013年)

2) 大橋俊夫、佐藤佳代子 リンパマッサージ健康法 PHP 研究所, 東京, p.12-109(2013年)

- 3) 大橋俊夫 「診療指針」作成の意義 リンパ浮腫診断治療方針 2013(リンパ浮腫療法士認定機構編)メディカルトリビューン社, 東京, p.iii (2013年)
- 4) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管の生理リンパ浮腫診断治療方針 2013(リンパ浮腫療法士認定機構編)メディカルトリビューン社, 東京, p.9-10 (2013年)
- 5) 大橋俊夫 「美と健康の要 リンパと血流大研究」日経ヘルス 日経 BP 社, 東京, p.47-49 (2013年)
- 6) 河合佳子 流れ刺激による肺の炭酸ガス排出機構における新しい概念 日本学術会議中部地区会議ニュース No. 135 p. 6-7 (2013年)
- 7) 大橋俊夫 リンパの誤解 Health & Beauty Review5月号, 東京, p.65-69 (2012年)
- 8) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管の生理原発性リンパ浮腫診断治療指針(笹嶋唯博編), メディカルトリビューン社, 東京, p.8-10 (2012年)
- 9) 大橋俊夫 名医のセカンドオピニオン週刊朝日増刊号 新「名医」最新治療 2013, 朝日新聞出版, 東京, p.82-83 (2012年)
- 10) 大橋俊夫、河合佳子 集合リンパ管の再生とリンパ流の効果 生体の科学, 金原一郎記念医学医療新興財団, 東京, 生体の科学 63(6): 577-583 (2012年)
- 11) 大橋俊夫、河合佳子 第6章 リンパ浮腫血管生物医学事典, 朝倉書店, 東京, p.446-448 (2011年)
- 12) 河合佳子、大橋俊夫 第1章 リンパ管内皮細胞 リンパ浮腫血管生物医学事典, 朝倉書店, 東京, p.13-15 (2011年)
- 13) 大橋俊夫、河合佳子 リンパ管の生理 - リンパ浮腫との関連から - よくわかるリンパ浮腫のすべて(光嶋勲編), 永井書店, 東京, p.34-39 (2011年)
- 14) 大橋俊夫 リンパ浮腫全書(監修)リンパ浮腫全書, へるす出版, 東京, 総 p.165 (2010年6月)
- 15) 大橋俊夫 リンパを流すと健康になる PHP 研究所, 東京, 総 p.203 (2010年)
- 16) 大橋俊夫 健康づくりQ & A 乾布摩擦の効果 月刊健康づくり 12月号, (財)健康・体力づくり事業財団, 東京, p.25 (2010年)

〔産業財産権〕
出願状況(計4件)

名称: センチネルリンパ節描出剤
発明者: 大橋俊夫、河合佳子
権利者: 国立大学法人 信州大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/064807
出願年月日: 平成23年6月28日
国内外の別: 国外

名称: センチネルリンパ節への薬物輸送剤
発明者: 大橋俊夫、河合佳子
権利者: 国立大学法人 信州大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/064808
出願年月日: 平成23年6月28日
国内外の別: 国外

名称: センチネルリンパ節描出剤
発明者: 大橋俊夫、河合佳子
権利者: 国立大学法人 信州大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-151224号
出願年月日: 平成22年7月1日
国内外の別: 国内

名称: センチネルリンパ節への薬物輸送剤
発明者: 大橋俊夫、河合佳子
権利者: 国立大学法人 信州大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-151243号
出願年月日: 平成22年7月1日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者
大橋 俊夫 (OHASHI, Toshio)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 80020832

(2)研究分担者
河合 佳子 (KAWAI, Yoshiko)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 10362112

永井 崇 (NAGAI, Takashi)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 50514353

安嶋 久美子 (AJIMA, Kumiko)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 70584051

(3)連携研究者
なし