

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 25 年 8 月 30 日現在

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22591561
 研究課題名（和文）リンパ管新生評価系並びにリンパ節転移モデルを用いたリンパ管新生機序
 解明と治療応用
 研究課題名（英文）Evaluation and therapeutic application of lymphangiogenesis using
 animal model with lymph node metastasis of lung neoplasm
 研究代表者
 土岐 善紀（ YOSHINORI DOKI ）
 富山大学・大学病院・講師
 研究者番号：90303221

研究成果の概要（和文）：

80 種類のライブラリーの中からリンパ管新生の阻害剤を探索した結果、シコニンが強いリンパ管新生抑制効果を持つ事を確認した。さらに、シコニンはリンパ管内皮細胞の遊走ではなく各種細胞外基質へ接着を亢進していることが明らかとなった。また、興味深いことに、シコニンの誘導体であるデオキシシコニンは、シコニンとは逆にリンパ管新生を亢進させていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We have explored seeds that played the role of lymphangiogenetic inhibitor and evaluated 80 series of agents in the library. As a result, Shikonin had a strong inhibitory effect to lymphangiogenesis, and this affection was introduced by increasing of adhesion to some extracellular matrix, and is not by migration of lymphatic endocell. On the other hand, Deoxyshikonin which is a derivative from Shikonin, made an opposite reaction to increase an angiogenesis of lymphatic vessels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：がん転移、リンパ管新生

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

肺がんはがんによる死亡の主要な原因であり、早期発見が行われても転移性肺がん患者の予後は一般的に不良である。現在まで、がん転移の分子機序の解明において、がんの血行性転移に関しては学際的に多大な努力が費やされてきた。しかしながら、肺がんも含めて種々の腫瘍患者の予後を規定する要因であるリンパ節転移のメカニズムについては未だ詳細は明らかとなっていない。これまでに申請者は、肺がんの同所性移植によるリンパ節転移病態モデル (Doki Y. et al, Br J Cancer. 1999) の作成に成功し、本モデルにおいて肺がんのリンパ節転移の分子機序を解明してきた (Doki Y. et al, Oncol Rep. 2007)。本肺がん転移病態モデルは、臨床特性を反映している唯一の肺がんのリンパ節転移モデルである。近年、腫瘍のリンパ節転移は腫瘍リンパ管新生惹起に伴うことが、解明されつつあるが (Molecular lymphangiogenesis: new players. Trends Cell Biol. 2005.)、一方で、学際的に多大な努力が費やされてきた腫瘍血管新生研究の成果と較べて、まだまだ詳細は解明しきれていない。これらの研究は、電子顕微鏡等を用いた形態学的なマクロの視点に立った研究が主に進められているのが現状である。従って、リンパ管新生の詳細な細胞・分子レベルでの機序解明の推進において、リンパ管内皮細胞株の樹立が切望されていた。温度感受性 SV40 Transgenic ラットは、東北大学加齢研究所元所長・帯刀益夫博士によって創出されたラットであり、本ラットの細胞は 33°C においては、細胞が不死化するという非常にユニークな特性を有している (Biochem Biophys Res Commun. 2001)。最近申請者らは、血管内皮細胞の単離・培養の経験を基に、温度感受性 SV40 Transgenic ラットから、胸管のリンパ管内皮細胞および走行する血管内皮細胞を単離し、33°C において培養することで無限増殖能を有し、37°C において初代培養細胞と同様な形質を有し、かつ蛍光タンパク質が導入されたリンパ管内皮細胞株の樹立に世界で初めて成功した。

2. 研究の目的

近年、血管の研究が進み、血管新生抑制によるがんの増殖・転移を抑える治療が開発されてきている。しかしながら、リンパ管の研究は血管より遅れをとり、リンパ管新生抑制によるがんの増殖・転移 (がんのリンパ行性転移) を抑える治療はまだ開発されていない。本研究の目的は、①腫瘍血管新生と比較して

詳細が解明されていない腫瘍リンパ管新生に関与する分子機序を、条件的不死化リンパ管内皮細胞を使用した *in vitro* リンパ管新生評価系によって解明する、②siRNA や阻害剤を用いてリンパ管新生の動態を制御する方法の開発する、③独自の肺同所性移植リンパ節転移モデルを用いて、リンパ管新生阻害に基づく肺がんの新規分子標的治療戦略を構築することである。

3. 研究の方法

血管新生と比較して開発が進んでいないリンパ管新生に阻害剤のシーズを、生薬の主要成分の化合物ライブラリーから探索し、その作用機序を解析した。

材料

シコニン、シグマ・アルドリッチ、デオキシシコニンは、東京化学工業より購入した。

細胞増殖試験

96 well プレートにリンパ管内皮細胞 (1×10^4) を播種し、被験物質を添加した。その後、経時的に細胞増殖を観察した。その定量に関しては定法に従い、WST-8 試験法を用いた。

In vitro リンパ管新生試験

マトリゲルを固相化した 96 well プレートにリンパ管内皮細胞 (8×10^3) を播種し、被験物質を添加した。その後、経時的にリンパ管新生の状態を顕微鏡下で確認、撮影を行った。その撮影像を画像解析することにより、リンパ管の全長を計測した。

RT-PCR

定法に従った。

Western blotting

定法に従った。

HIF-1 α の細胞内挙動

リンパ管内皮細胞をマトリゲルが固相化したガラススライドに播種し、パラホルムアルデヒドで固定した。その後、一次抗体として HIF-1 α に対する抗体を添加し、30 分放置した。その後、FITC 付き二次抗体を添加した。作製したサンプルを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Wound-Healing 試験

定法に従った。

細胞接着試験

マトリゲルを固相化した 96 well プレート

にリンパ管内皮細胞 (1 X 10⁴) を播種し、被験物質を添加した。その後、非接着細胞を洗浄により除去し、残存した接着細胞を計測した。

4. 研究成果

細胞増殖に対するシコニンおよびデオキシシコニンの影響

WST-8 試験により、シコニンは 1 uM まで、デオキシシコニンは、3 uM まで細胞毒性は観察されなかった。

デオキシシコニンの In vitro リンパ管新生試験

デオキシシコニンの毒性のない濃度において、In vitro リンパ管新生試験を行った。その結果、デオキシシコニンは、マトリゲル上に播種後、6 時間で有意に、リンパ管新生を亢進することが確認できた (図 1)。

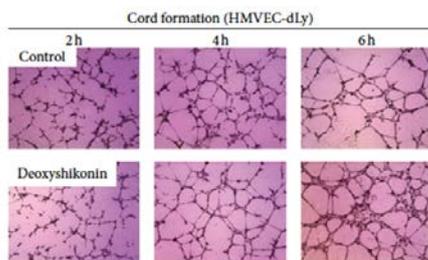


図1

デオキシシコニンのリンパ管新生亢進機序

次に、デオキシシコニンのリンパ管新生亢進機序を解析する目的で、RT-PCR を行った。その結果、デオキシシコニンは、リンパ管内皮細胞の HIF-1a の発現を亢進させることが確認できた。また、この HIF-1a の亢進に基づき、VEGF-C の亢進も確認された。この亢進は HIF-1a の siRNA により解除された (図 2)。

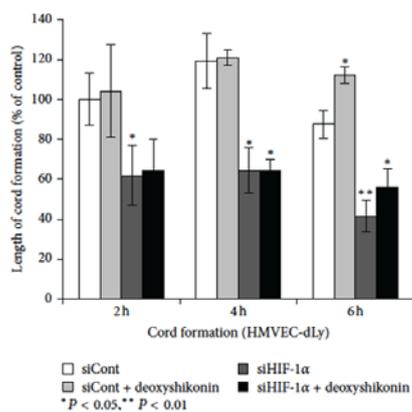


図2

デオキシシコニンによる HIF-1a の核内移行促進

前述のデオキシシコニンによる HIF-1a 発現亢進によるリンパ管新生促進機序の詳細を解明するために、HIF-1a の細胞内挙動を観察した。その結果、デオキシシコニンは HIF-1a の核内移行を促進していることが確認できた (図 3)。

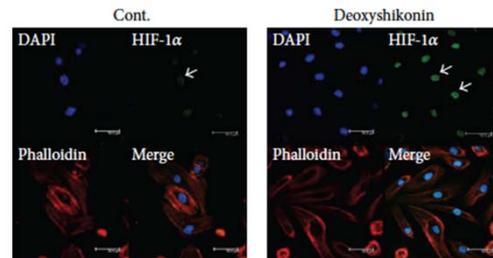


図3

デオキシシコニンの Wound-Healing 試験

デオキシシコニンは、in vitro 損傷治癒モデルにおいて、その効果を促進することが確認できた (図 4)。

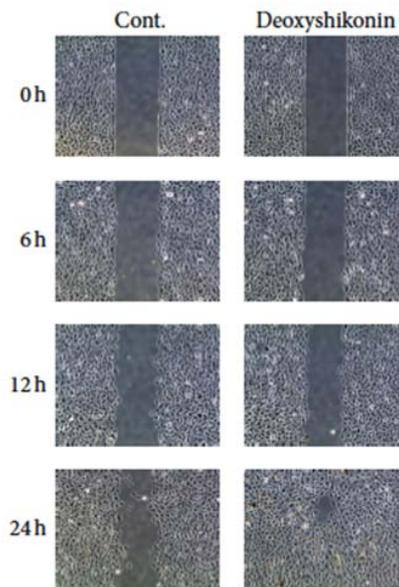


図4

シコニンのリンパ管新生阻害効果

一方で、シコニンは、マトリゲル上に播種後、6 時間で優位に、リンパ管新生を抑制することが確認できた (図 5)。その抑制効果は、細胞接着の増強に基づくことが示唆された (図 6)。

2012. 5. 18, 秋田

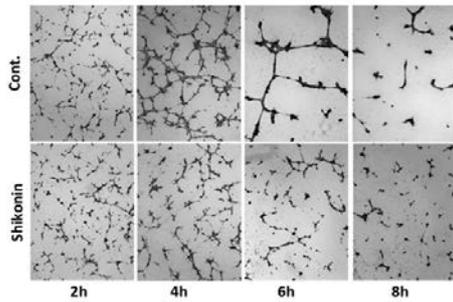


図5

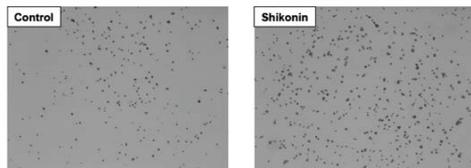


図6

総括

80種類のライブラリーの中で、シコニンに強いリンパ管新生抑制効果が確認された。さらに、シコニンはリンパ管内皮細胞の遊走ではなく各種細胞外基質へ接着を亢進させていることが明らかとなった。またシコニンの誘導体であるデオキシシコニンは、シコニンとは逆にリンパ管新生を亢進させた。今後は、シコニンおよびデオキシシコニンの構造とリンパ管新生阻害および促進効果との活性相関を解析することで、新たなリンパ管新生阻害剤の開発を目指す予定である。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 土岐善紀、仙田一貴、本間崇浩、冠動脈-肺動脈瘻を有する胸腺腫に対する1手術例、29回日本呼吸器外科学会総会、2012. 5. 19, 秋田。
- ② 土岐善紀、仙田一貴、本間崇浩、小プレートを用いた胸骨吊り上げ法による鏡視下胸腺摘出術、28回日本呼吸器外科学会総会、2011. 5. 13, 別府。
- ③ Y. Doki, K. Senda, T. Hommma, Complete VATS Lobectomy with Subxiphoid Route, 14th World Conference of Lung Cancer, 2011. 7. 6, Amsterdam, Nederland.
- ④ 土岐善紀、仙田一貴、本間崇浩、術後の有瘻生膿胸に対する二期的根治術(開窓後の大網充填術)、29回日本呼吸器外科学会総会、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土岐 善紀 (YOSHINORI DOKI)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：90303221

(2) 研究分担者

名倉 里織 (SAORI NAGURA)
富山大学・大学病院・助教
研究者番号：90401843

小泉 桂一 (KEIICHI KOIZUMI)
富山大学・和漢医薬学研究所・准教授
研究者番号：10334751