慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	婦人科悪性腫瘍のリンパ行性転移の分子基盤の解明
Sub Title	Analysis of molecular mechanism of lymphatic metastasis of gynecologic malignant tumor
Author	森定, 徹(Morisada, Toru) 藤野, 明浩(Fujino, Akihiro)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, 不死化リンパ管内皮細胞株および婦人科癌細胞株を用いて腫瘍とリンパ管内皮の相互関係について解析を行った。不死化リンパ管内皮細胞株の樹立・培養手技を確立した上で, この培養系に炎症性サイトカインTNFαを添加し細胞接着因子の発現が誘導されることを確認した。リンパ管においてもサイトカインによる細胞接着の亢進が生じ, 腫瘍のリンパ行性転移のメカニズムに関与することが示唆された。また, 子宮頸癌細胞株(SKG-2)を用いた三次元培養実験においてSKG-2細胞がスフェロイドを形成することを確認した。このスフェロイドはがん微小環境における婦人科腫瘍の分子生物学的特性を有していることが示唆された。 We have been analyzing molecular interaction between tumor cells and lymphatic endothelium using lymphatic endothelial cell (LEC) line and gynecologic cancer cell line. After establishment of immortalization and cultivation of LEC, we observed elevated expression of cell adhesion molecules on LEC by adding inflammatory cytokine, TNFα. The lymphatic vessels are supposed to have a certain role in lymphatic metastasis by promoting cell adhesion. It was confirmed that a uterine cervical cancer cell, SKG-2 formed cell spheroid in a three-dimensional culture dish. It is suggested that this cell spheroid possesses the biological character mimicking the gynecologic tumor in cancer microenvironment.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2013 ~ 2015 課題番号 : 25462613 研究分野 : 婦人科腫瘍学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25462613seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６２６１３

研究課題名（和文）婦人科悪性腫瘍のリンパ行性転移の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism of lymphatic metastasis of gynecologic malignant tumor

研究代表者
森定　徹（MORISADA, TOHRU）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：７０３１７９２３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、不死化リンパ管内皮細胞株および婦人科癌細胞株を用いて腫瘍とリンパ管内皮の相互関係について解析を行った。不死化リンパ管内皮細胞株の樹立・培養手技を確立した上で、この培養系に炎症性サイトカインTNFαを添加し細胞接着因子の発現が誘導されることを確認した。リンパ管においてもサイトカインによる細胞接着の亢進が生じ、腫瘍のリンパ行性転移のメカニズムに関与することが示唆された。また、子宮頸癌細胞株（SKG-2）を用いた三次元培養実験においてSKG-2細胞がスフェロイドを形成することを確認した。このスフェロイドはがん微小環境における婦人科腫瘍の分子生物学的特性を有していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have been analyzing molecular interaction between tumor cells and lymphatic endothelium using lymphatic endothelial cell (LEC) line and gynecologic cancer cell line. After establishment of immortalization and cultivation of LEC, we observed elevated expression of cell adhesion molecules on LEC by adding inflammatory cytokine, TNFα. The lymphatic vessels are supposed to have a certain role in lymphatic metastasis by promoting cell adhesion. It was confirmed that a uterine cervical cancer cell, SKG-2 formed cell spheroid in a three-dimensional culture dish. It is suggested that this cell spheroid possesses the biological character mimicking the gynecologic tumor in cancer microenvironment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：リンパ管内皮細胞　婦人科悪性腫瘍　リンパ管腫

１．研究開始当初の背景

婦人科悪性腫瘍の病期と予後を評価する上で,リンパ節転移と遠隔転移は重要な因子である。悪性腫瘍の増殖･進展に関して、リンパ管新生が関与していると考えられる局面は、原発巣でのリンパ管新生と、転移が生じたリンパ節の中でのリンパ管新生が挙げられる。近年、複数の癌腫において、原発巣でリンパ管新生が生じ、そのことがリンパ節転移を促進することが病理学的検討から示唆されている。臨床的に重要なのは、原発巣におけるリンパ管新生の程度が患者予後と相関する点にある。実際の検討として、臨床症例において胃、大腸、前立腺などの癌において強力なリンパ管新生因子であるVEGF-C の腫瘍内の発現量とリンパ節転移との相関が報告されている。また、リンパ管新生は、原発巣にとどまらず所属リンパ節内でも生じることが、マウスおよびヒト癌組織の検討から明らかにされている（Hirakawa S. et al. Blood 2007)。所属リンパ節におけるリンパ管新生は、リンパ節転移の拡大と相関し、遠隔リンパ節あるいは遠隔臓器への転移を促進することが示唆される。さらに近年、マウスの悪性黒色腫モデルを用いた実験で、転移先である肺のリンパ管内皮細胞にケモカイン SDF-1 が発現して腫瘍細胞の遊走を促進することが報告されており、リンパ行性転移におけるリンパ管内皮細胞の能動的な役割も示唆されている。

腫瘍血管新生を標的とした血管新生阻害薬がいくつも開発され、実地臨床で使用されている血管に関する研究と比較して、悪性腫瘍のリンパ管に関する研究は、リンパ管特異的な抗体や細胞株等の実験資材の相対的な不足と、特に欧米ではリンパ節転移は治療標的でなく臨床的な surrogate marker であるとみなされているために、そのメカニズムに関する基礎研究の知見の蓄積はまだ充分とは言えない現状である。血管新生阻害薬も、当初考えられていたほどの治療効果はまだ得られていない状況であり、腫瘍における脈管生物学の研究はさらに進める必要のある分野である。このような背景から、リンパ行性転移の分子機構についての包括的な解明は、癌進展に対する新しい治療への糸口として期待が持たれる分野である。

申請者はこれまでの研究で既に、有用なリンパ管内皮細胞のマーカーと考えられている膜蛋白 LYVE-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1)に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体が免疫組織染色およびフローサイトメトリー（FACS）の解析に有用であることを確認している(Morisada T. et al. Blood 2005)。さらに。ヌードマウスへの移植実験において腋窩リンパ節に転移をきたすヒト子宮頸癌細胞株 HeLa を用いたリンパ節転移マウスモデルを確立している。また、ヒトリンパ管内皮細胞の材料として、臨床治療上得られるリンパ管腫組織に注目し、研究分担者とともにインフォームド・コンセントの得られたリンパ管腫症例の切除検体を材料として、ヒトリンパ管内皮細胞の抽出・培養を行っている。得られた培養細胞にヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)を導入して不死化・細胞株樹立を行い、この不死化リンパ管内皮細胞株がリンパ管内皮細胞としての分子生物学的特性を保持していることを RNA レベル、蛋白レベルで確認している。このように、申請者の研究環境にはリンパ管研究を行う上で必要となる研究資材が準備されている状況である。

２．研究の目的

婦人科悪性腫瘍の治療の一層の向上を目指すためには、腫瘍細胞自体に関する研究のみならず、腫瘍のリンパ行性転移のメカニズムを理解するための研究が重要である。本研究では、すでに申請者らによって樹立されているリンパ管内皮細胞株およびリンパ管内皮特異的抗体(Anti-LYVE-1 monoclonal antibody)を用いて、婦人科癌細胞株とリンパ管内皮細胞の共培養実験、リンパ節転移モデルマウスの解析を行うことにより、腫瘍内リンパ管、リンパ節転移局所での腫瘍細胞とリンパ管内皮細胞の相互関係を分子生物学的手法で解析する。それにより婦人科悪性腫瘍のリンパ行性転移が生じる分子メカニズムを解明するとともに、転移抑制のための新たな分子標的治療の開発を目標とする。

３．研究の方法

本研究では、ヒトリンパ管内皮細胞、婦人科癌細胞株およびリンパ節転移マウスモデルを用いて、腫瘍のリンパ行性転移の分子機構を、研究の先行している腫瘍血管研究の知見と対比しながら解析する。さらに、リンパ管内皮細胞の分子生物学的特徴、腫瘍細胞との相互関係に焦点を当て、腫瘍内および転移リンパ節でのリンパ管内皮細胞−腫瘍細胞間の分子機構の解明を通じ、腫瘍のリンパ行性転移のメカニズムを明らかにする。

具体的には、まずリンパ管内皮細胞としての分子生物学的特性を保持していることを確認した不死化リンパ管内皮細胞株を用いて、腫瘍細胞とリンパ管内皮細胞の接着・生着に必須と想定される分子機構を *in vitro* の培養実験系で解析する。

(1)リンパ管内皮細胞のサイトカイン等への反応性の検討：

①癌の微小環境では、宿主の免疫応答が生じ、様々な炎症性サイトカインが産生され腫瘍増殖に関係するとされている。また、腫瘍局所では内皮細胞の接着因子の発現が上昇することが報告され、腫瘍細胞との接着に関与することが示唆されている。そこで、炎症性サイトカイン TNF-alpha に対する当細胞株の VCAM-1、ICAM-1、E-selectin などの細胞接着分子の発現の変化を検討する。

②リンパ管腫に対してある種の漢方薬がその増殖抑制効果を持つと報告されている。そこで当細胞株の漢方薬（越婢加朮附湯、黄耆建中湯）投与における増殖能、遊走能、脈管形成能を評価した。

(2)リンパ管内皮細胞株と婦人科癌細胞株との共培養の系を用いた、リンパ管内皮細胞と腫瘍細胞の相互関係に寄与する分子の検討･機能解析：

① リンパ管内皮細胞と婦人科癌細胞株を使って、２次元共培養を行い、至適な共培養の条件を検討する。
② 上記共培養の系において、腫瘍細胞・リンパ管内皮細胞の接点に重要な働きを持つとおもわれる分子について免疫組織染色でその発現を検討する。
③ 癌の原発巣や転移巣においては、癌細胞は組織や器官の中で三次元の立体構造をとって存在する。さらに、隣接するがん細胞同士、がん細胞と周囲組織の細胞との相互関係が生じ、いわゆるがん微小環境を形成している。近年、より腫瘍の微小環境に近い実験条件として、３次元培養の有用性が報告されてる。そこで、申請者の研究室に準備されている由来する臓器や組織型の異なる複数の婦人科癌細胞株(HeLa、SKG1、SKG2、SKG3a、SNG2、RMG1)を用いて、低接着性表面処理のなされたスフェロイド形成用培養プレート（PrimeSurface）を用いて、各株に置けるスフェロイド形成能を比較検討する。

(3)リンパ節転移モデルマウスを用いた節内リンパ管内皮細胞の分子生物学的特性の比較解析:

① 申請者はすでに、ヒト子宮頸癌由来細胞株（HeLa)をヌードマウスへの腹壁皮下に移植し、腋窩リンパ節に転移を起こすリンパ節転移モデルを確立している。また、担癌マウスの、転移が生じる前の腋窩リンパ節内でリンパ管新生（節内リンパ管新生）が起こっていることを観察している。そこで、本モデルを用いて、転移が生じる前の節内リンパ管内皮細胞と腫瘍移植をしていない節内リンパ管内皮細胞の分子生物学的特性を、免疫組織化学染色で検討する
② 腫瘍進展におけるリンパ管新生に血球細胞由来のいわゆる血管内皮前駆細胞（リンパ管内皮前駆細胞）が寄与するのか検討するために、致死量放射線を照射したヌードマウスに,GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植し骨髄の再構築を行った。このマウスに HeLa 細胞株を移植し、リンパ節における骨髄由来の GFP 陽性リンパ管内皮細胞の存在の有無を検討した。

４．研究成果

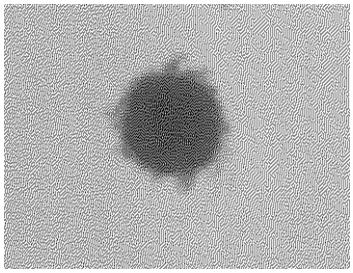
婦人科悪性腫瘍におけるリンパ行性転移のメカニズムを理解するために、腫瘍におけるリンパ管の分子基盤を解明することが重要と考えた。本研究では、ヒトリンパ管内皮細胞、婦人科癌細胞株を用いて、腫瘍細胞とリンパ管内皮細胞の分子機構を解析した。

(1)不死化リンパ管内皮細胞株の培養系に、TNFαを添加し、細胞接着因子 E-selectin、ICAM-1、VCAM-1 の発現が誘導されることを RNA、蛋白レベルで確認した。これによりリンパ管内皮においても炎症性サイトカインによる細胞接着因子の発現亢進が生じることが明らかとなり、腫瘍細胞とリンパ管内皮との接着に関与することが示唆された。また、漢方薬（越婢加朮附湯、黄耆建中湯）の投与によりリンパ管内皮細胞株の増殖が抑制されることが明らかになった。

(2)　子宮頸癌細胞株（SKG-2）を用いた培養実験において、三次元培養用のプレートを用い、至適な培養条件の下に SKG-2 細胞がスフェロイドを形成することを確認した（図)。今後は、この腫瘍細胞のスフェロイドと確立されたリンパ管内皮細胞を用いて、婦人科癌細胞株とリンパ管内皮細胞の三次元の相互関係の仕組みを明らかし、得られた腫瘍・リンパ管の相互関係に関わる基礎的知見を集積し、悪性腫瘍のリンパ行性転移のメカニズムを明らかにしようとしている。

(3) 骨髄再構築をした腫瘍移植マウスのリンパ節内には,GFP 陽性のリンパ管内皮細胞は認められなかったため、悪性腫瘍モデルにおけるリンパ節内のリンパ管新生は,既存のリンパ管内皮細胞の増殖によるものであることが示唆された.このリンパ管内皮細胞の増殖を標的とした治療戦略は,悪性腫瘍のリンパ行性転移を抑制する可能性がある。

リンパ管研究の分野では、リンパ管に特異的な抗体やその細胞株といった研究資材の相対的な不足が障害となり、リンパ行性転移のメカニズムの包括的な理解は未だなされていない。血管研究に比して研究資材が揃えにくいリンパ管研究の視点から悪性腫瘍の転移機構を解析していくところに当研究の独創性がある。悪性腫瘍におけるリンパ管内皮細胞と腫瘍細胞とのダイレクトな相互関係に焦点を当て、腫瘍内やリンパ節局所でのリンパ管内皮-腫瘍細胞間の分子機構の解明を通じ、婦人科腫瘍のリンパ行性転移のメカニズムを明らかにしていく本研究は、婦人科悪性腫瘍のリンパ行性転移抑制療法開発のための基礎的知見を与える意義深い研究であると考えている。



図：スフェロイドを形成したSKG-2細胞

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計３件）
①森定 徹，青木 大輔、【血管新生を標的とした婦人科癌治療】悪性腫瘍におけるリンパ管新生、産科と婦人科、査読無、82 巻、2015、147-153

②藤野 明浩、小関 道夫、上野 滋、岩中 督、木下 義晶、野坂 俊介、松岡 健太郎、森川 康英、黒田 達夫、リンパ管腫とリンパ管腫症・ゴーハム病の成人例の実際、小児外科、査読有、47 巻、2015、775-782

③藤野 明浩，森定 徹，梅澤 明弘，黒田 達夫、【病態解析のための動物モデル-何がわかったか】 ヒトリンパ管腫モデル動物の作成、小児外科、査読有、46 巻、2014、635-638

〔学会発表〕（計２件）
①加藤 源俊、森定 徹 他、リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する漢方薬の影響の検討、第 20 回日本小児外科漢方研究会・第 31 回日本小児外科学会秋季シンポジウム PSJM2015、2015 10.29-31、くまもと県民交流館（熊本県熊本市）

②Mototoshi Kato、Tohru Morisada et al、A PRELIMINARY STUDY OF THE EFFECT OF KAMPO MEDICINE ON THE HUMAN LYMPHGNGIOMA DERIVED LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS、16th European Congress of Paediatric Surgery、2015.6.29、Ljubljana（Slovenia）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1)研究代表者
森定　徹（MORISADA, Tohru）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：７０３１７９２３

(2)研究分担者
藤野　明浩（FUJINO, Akihiro）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：５０３０６７２６