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

Title	肺癌細胞と共にリンパ節に転移する原発巣由来ストローマ細胞は転移巣形成を促進する
Sub Title	Lung cancer metastasizes to lymph nodes by stromal cells
Author	大竹, 宗太郎(Otake, Sotaro)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究の目的は, 肺癌細胞のリンパ節転移動物モデルを作成し, さらに肺癌細胞とともにリンパ節に到達する免疫細胞やストローマ細胞の検出, 解析を行うことである。まず, Lewis lung cancerを用いた肺腫瘍縦隔リンパ節転移モデルを作成することができた。そして, この転移モデルのリンパ節を解析し, 転移リンパ節内で制御性T細胞の増加を認め, CD8陽性の細胞障害性Tcellが経時的に増えていることがわかった。このモデル自体が肺腫瘍のリンパ節転移における初期の変化をとらえている可能性があると考えられた。 The purpose of this study is to make the animal model of lymph node metastasis from lung cancer, and to detect and analyze immune cells and stromal cells in lymph node metastasis. First, we made the mouse model of lymph node metastasis from lung cancer using Lewis lung cancer. Then, We investigated this lymph node metastasis. This model may show an early change in lymph node metastasis from lung cancer.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26861126 研究分野 : 呼吸器外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26861126seika

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－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６８６１１２６

研究課題名（和文）肺癌細胞と共にリンパ節に転移する原発巣由来ストローマ細胞は転移巣形成を促進する

研究課題名（英文）Lung cancer metastasizes to lymph nodes by stromal cells

研究代表者
大竹　宗太郎（Otake, Sotaro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：７０６４９９５４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、肺癌細胞のリンパ節転移動物モデルを作成し、さらに肺癌細胞とともにリンパ節に到達する免疫細胞やストローマ細胞の検出、解析を行うことである。まず、Lewis lung cancerを用いた肺腫瘍縦隔リンパ節転移モデルを作成することができた。そして、この転移モデルのリンパ節を解析し、転移リンパ節内で制御性T細胞の増加を認め、CD8陽性の細胞障害性Tcellが経時的に増えていることがわかった。このモデル自体が肺腫瘍のリンパ節転移における初期の変化をとらえている可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to make the animal model of lymph node metastasis from lung cancer, and to detect and analyze immune cells and stromal cells in lymph node metastasis. First, we made the mouse model of lymph node metastasis from lung cancer using Lewis lung cancer. Then, We investigated this lymph node metastasis. This model may show an early change in lymph node metastasis from lung cancer.

研究分野：　呼吸器外科学

キーワード：　肺癌　腫瘍免疫　ストローマ細胞

１．研究開始当初の背景
癌転移のメカニズムに関して宿主–腫瘍間の相互作用の重要性が認識されている。腫瘍を構成する癌細胞以外の宿主側のストローマ細胞（間質細胞）には線維芽細胞、単球・マクロファージなどの免疫細胞、血管内皮細胞や様々な前駆細胞などが挙げられる。
Tumor draining lymph node（TDLN）では、腫瘍の進展に対する免疫反応が減弱していると考えられている。骨髄球や CD4+細胞からの制御性 T 細胞（Treg）や Th2 細胞の分化に始まり、腫瘍成長を促進させる免疫環境が整うことで、リンパ節での腫瘍の成長が成立している可能性がある。
実際、腫瘍環境やリンパ節転移巣では Treg の増加が認められており、Treg を除去することによって腫瘍に対する免疫反応が改善する報告がある。
Treg による免疫抑制作用発現のメカニズムは、細胞同士の直接作用や、TGFβや IL-10 のなどの抑制性サイトカインの放出によるものが考えられている。
乳癌患者では TDLN での CD25+Treg の上昇、Th2 細胞の上昇と、抗腫瘍作用のあるサイトカイン IL17、IFNγの減少が報告されている。肺癌領域では Th1/Th2 の比率が腫瘍の進展とともに減少するという報告がある。
上記を踏まえ、本研究では、TDLN に焦点をあて、肺癌リンパ節転移が成立する微小環境を評価する。

２．研究の目的
原発巣由来のストローマ細胞がリンパ節転移に関与するメカニズムを動物実験で明らかにし、臨床に役立たせることが最終目的である。その第一歩として、肺癌細胞のリンパ節転移動物モデルを作成する。さらに肺癌細胞とともにリンパ節に到達する免疫細胞やストローマ細胞の検出、解析を行う。また臨床検体を用いて肺門や縦隔リンパ節に到達する原発巣由来のストローマ細胞の検出、解析を試みる。そして将来、再発や予後との関連を調査し、転移再発を予測して術後の補助化学療法を効果的に行うことが可能となる。また、転移を阻止する治療法の開発に結び付くと期待される。

３．研究の方法
動物　：C57BL/6、雄性、8 週齢を使用。
細胞株：Lewis lung cancer（マトリジェルに細胞 50000 個を懸濁して使用）
手技　：
(1)麻酔下に左側胸部を剃毛。気管挿管を行い人工呼吸器管理下に剪刀で皮膚、皮下組織、前鋸筋を切開する。骨性胸郭を露出させると肋間から左肺が透見できる。肋間筋を剪刀で切離し開胸。
(2)肺を持ち上げ、インスリン注射用最細針を肋間から刺入し、培養癌細胞を懸濁したマトリジェル 20μl（癌細胞 50000 個）を肺内にゆっくり注入する。
(3)Control 群はマトリジェル 20μl のみを注入する。
(4)注入後、綿棒で肺をおさえて止血する。閉創し、手術終了。
(5)数日後、肺内に腫瘍が形成され、やがて縦隔リンパ節に転移を形成する。DAY1、6、11 に作業を行う（1 回あたり N=10）。
(6)DAY16 にマウスを犠牲死させ、左上縦隔、右上縦隔、気管支背側リンパ節を取り出す。
評価方法：
(1)採取検体の顕微鏡観察（肺門リンパ節、縦隔リンパ節の微小転移巣の腫瘍進展状況を評価）
(2)病理所見、FACS、免疫染色、PCR で評価
病理学的所見：リンパ濾胞の変化、リンパ管新生の観察。（ストローマ細胞を標識可能か検討。）
免疫染色対象：リンパ球、好中球、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、間葉系前駆細胞。
免疫染色に使用する抗体：CD14、CD34、CD45、I 型コラーゲン、FoxP3
単球/マクロファージ（CD14+，CD45+，CD34－）、血管内皮前駆細胞（CD14－，CD45+，CD34－）、間葉系前駆細胞（CD14－，CD45－，CD34－，I 型コラーゲン+）
フローサイトメトリー：CD3（T 細胞）、CD8（Treg）、GFP（腫瘍細胞）
ELISA，PCR：VEGF など成長因子、サイトカイン
さらに可能であればマウス melanoma 細胞株 B16 を使用して同様の研究。悪性度の高い B16F10 と低悪性度の F0、F1 とで比較。

４．研究成果
肺の肉眼所見：
5 日目から既に左肺に腫瘍を確認でき（図 1）、15 日目になると、左肺の殆どが腫瘍で埋め尽くされた（図 2）。

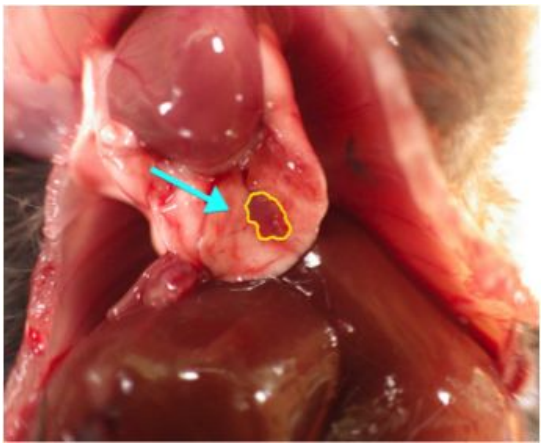


図 1　移植後 5 日目

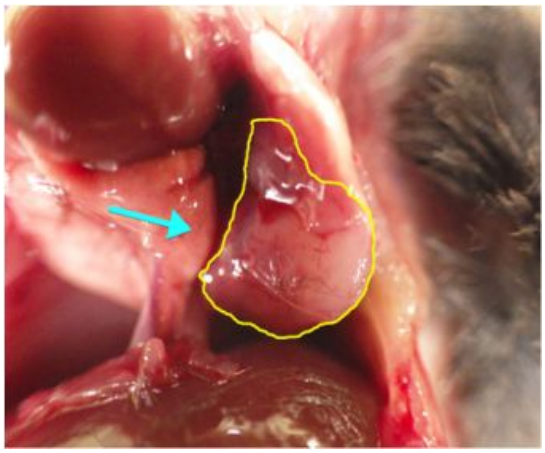


図 2　移植後 15 日目

肺の病理所見：
5 日目のもので大型の腫瘍細胞が正常肺胞構造の中にあることがわかった（図 3,4）。

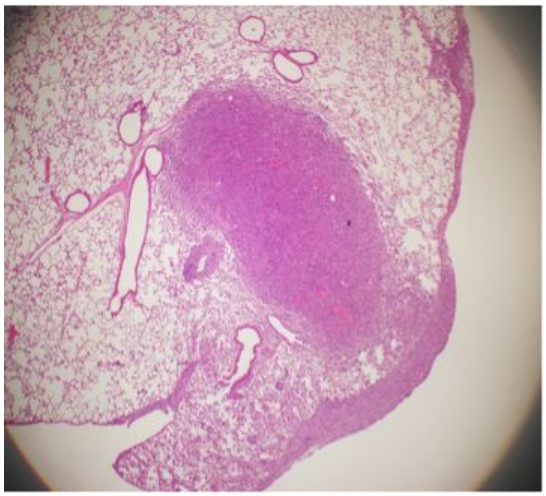


図 3

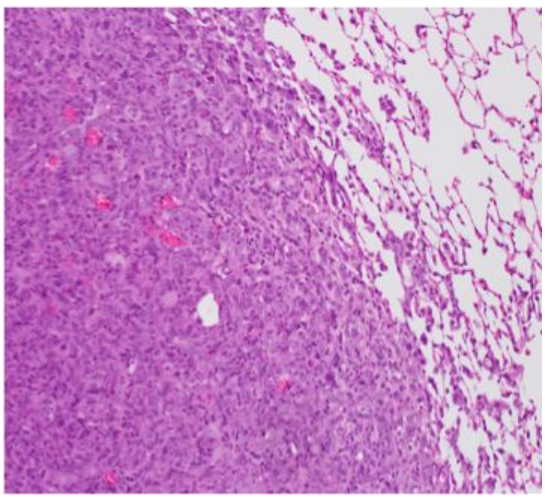


図 4

リンパ節の肉眼所見：
左縦隔リンパ節は、5 日目ですでに小さいながら腫大してきており（図 5）、15 日目になると大きく腫大していることがわかる（図 6）。

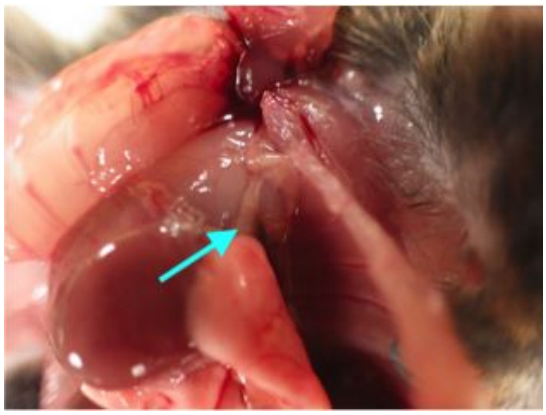


図 5　移植後 5 日目

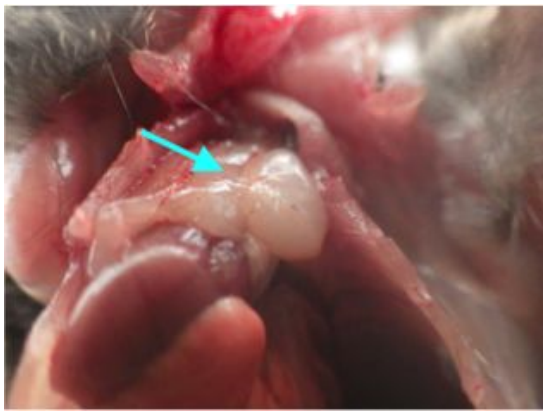


図 6　移植後 15 日目

右縦隔リンパ節も同様に、5 日目に比べ 15 日目になるとかなり腫大する。

リンパ節の病理所見：
Control 群では 5 日目と比較し、わずかに 15 日目でサイズの変化を認めるのみだが、移植後群では 5 日目（図 7）と比較し、15 日目（図 8）は細胞数、サイズの増大を認める。

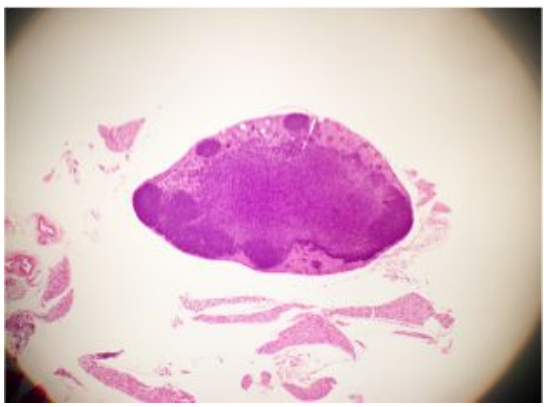


図 7　移植後 5 日目

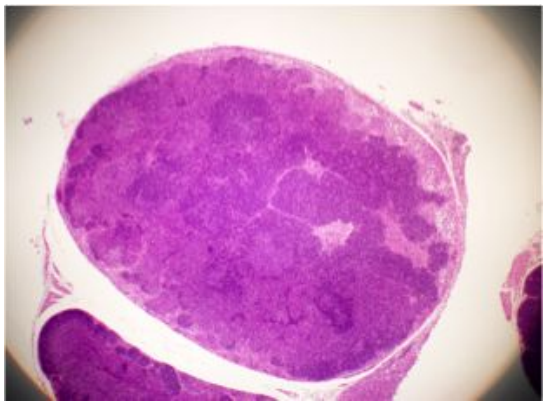


図 8　移植後 15 日目

11 日目のリンパ節で、細胞径の大きな腫瘍細胞を認め（図 9)、10 日前後でリンパ節への転移が起きることが確認できた。

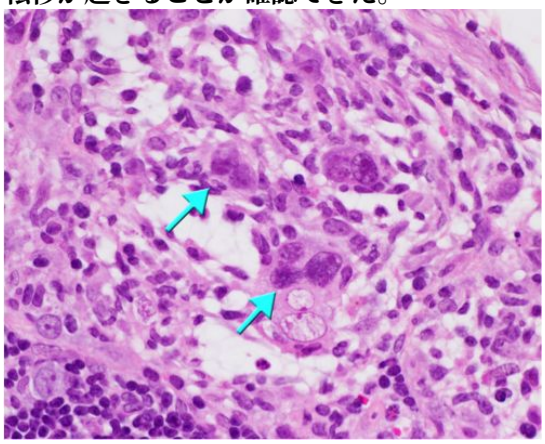


図 9　移植後 11 日目

免疫染色：
コントロール群、移植群共に FoxP3 陽性細胞がリンパ節内に存在していることが分かった（図 10,11)。

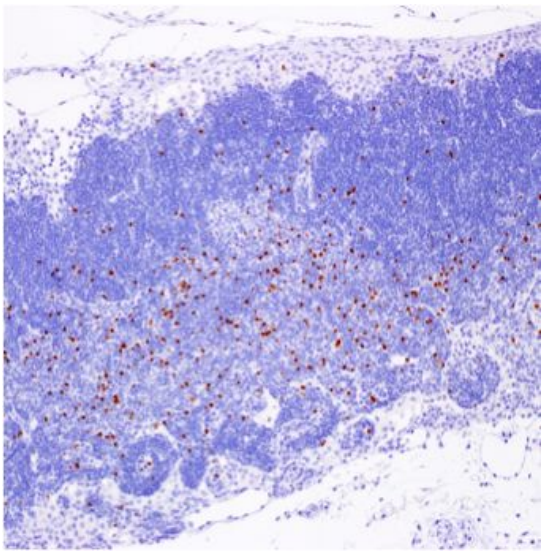


図 10　Control 5 日目

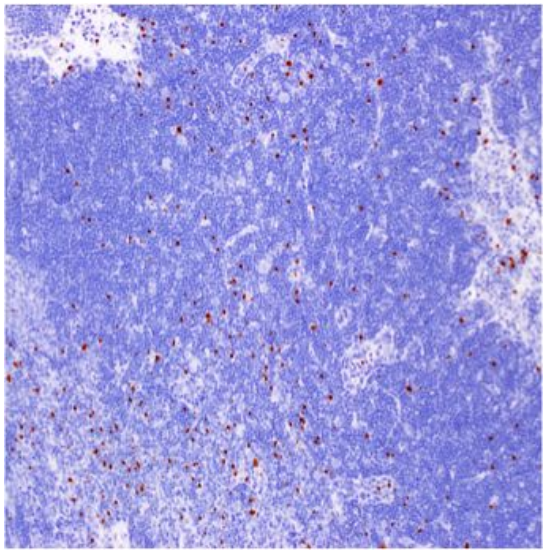


図 11　移植後 5 日目

強視野下でランダムに単位面積あたりの FoxP3 陽性細胞の細胞をカウントした。それらの個数を平均しグラフを作成した（図 12)。control 群では 9 日目をピークに制御性 T 細胞の増加を認め、その後低下したが、移植群では 9 日目をピークに減少することなく集積した。

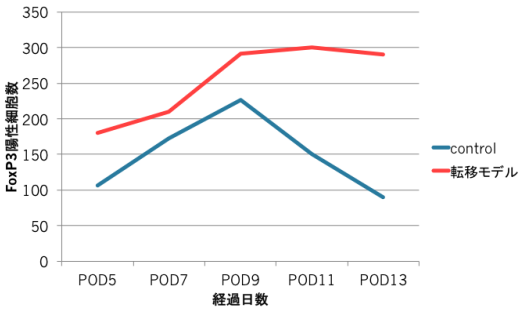


図 12　FoxP3 陽性細胞数の推移

フローサイトメトリー：
CD3 陽性の matture T 細胞中の CD4、CD8 陽性細胞の変化をフローサイトメトリーで確認した（図 13)。CD4 陽性細胞については一定であり、50%程の割合を認めたが、CD8 陽性細胞については control 群では 5 日目以降減少するのに対し、移植群では経時的に発現量の増大があった。5 日目では 3%ほどなのに対して、15 日目までには 38%まで割合が増えるという結果であった。

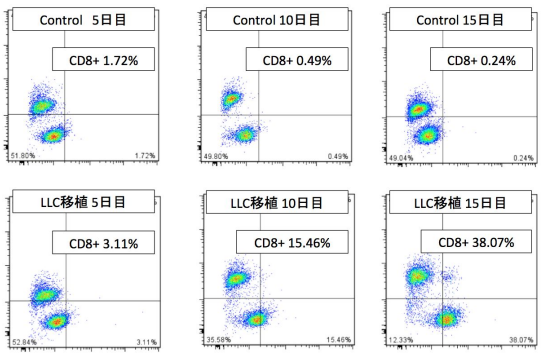


図 13　CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の変化

今回、Lewis lung cancer を用いた肺腫瘍縦隔リンパ節転移モデルを作成することができた。そして、TDLN において制御性 T 細胞の増加をみとめ、また CD8 陽性の細胞障害性 Tcell が経時的に増えているという結果を得ることができた。これらの変化は実際のがん患者のリンパ節でも報告されており、このモデル自体が肺腫瘍のリンパ節転移における初期の変化をとらえている可能性があると考えられた。

＜引用文献＞

1) Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. PNAS 2010;107:21677-21682
2) Butler TP. Cancer Res.1975
3) Paget S. Lancet. 1889
4) Fidler IJ. Nat Rev Cancer. 2003
5) Elenbaas B. Exp Cell Res. 2001

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　0 件）

〔学会発表〕（計　1 件）

発表者名　重信敬夫、河野光智、大竹宗太郎
発表表題　マウス同所移植肺腫瘍モデルにおける転移形成前後の縦隔リンパ節内 T 細胞分画の変化
学会等名　第 16 回 SNNS 研究会学術集会
発表年月日　2014 年 9 月 19 日～9 月 20 日
発表場所　城山観光ホテル（鹿児島県・鹿児島市）

〔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

大竹　宗太郎（OTAKE Sotaro）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70649954