

| | | | |
|---------|--|-----|--------|
| 氏名 | たかはし ひろゆき 高橋 宏幸 | | |
| 学位の種類 | 博士（医学） | | |
| 報告番号 | 甲第 1759 号 | | |
| 学位授与の日付 | 平成 31 年 3 月 14 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士） | | |
| 学位論文題目 | Vascular Endothelial Growth Factor C Upregulates Trans-Lymphatic Metastasis in the Murine Liver by Recruiting Bone Marrow-Derived Cells (血管内皮増殖因子 C は骨髄由来の細胞を動員することによって、マウス（大腸癌）の肝臓内リンパ行性転移を促進する) | | |
| 論文審査委員 | (主査) 福岡大学 | 教授 | 小玉 正太 |
| | (副査) 福岡大学 | 教授 | 高松 泰 |
| | 福岡大学 | 教授 | 向坂 彰太郎 |
| | 福岡大学 | 准教授 | 上原 清子 |

内容の要旨

【目的】

大腸癌肝転移は罹患率・死亡率ともに全世界で増加傾向にあるが、そのメカニズムは完全には解明されていない。大腸癌は一般的に血行性に肝転移を生じ、かつては遠隔転移が存在すると予後が期待できなかった。しかし近年、集学的治療の発展により、肝転移巣がある程度限局していれば、根治が期待できる時代になりつつある。つまり今後、大腸癌患者の予後改善の為には、一旦肝転移を形成した後の、肝臓内多発転移の制御が必須と考えられる。我々は肝臓内に豊富に存在するリンパ管が大腸癌肝転移の成立によって著明に新生亢進し、その主要な転移径路になっているという仮説を立てた。本実験の目的は大腸癌肝転移におけるリンパ行性転移のメカニズムを明らかにし、関連するメディエーターの制御によって肝臓内転移を制御できることを証明することである。

【対象と方法】

8～10 週齢の雄の野生型 C57BL6/J マウスに、NIH 配給の同種大腸癌細胞である MCA38 を 1×10^5 個、経門脈的に移植し、大腸癌肝転移モデルを作成した。移植後 28 日目に安楽死させて肝臓を摘出し、検体の肉眼および病理所見について検討した。Von Willebrand factor と Podoplanin および LYVE-1 の免疫染色を行い、コントロール群とで新生血管およびリンパ管数を比較検討した。肝臓内での増加が見込まれる Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGFC) を ELISA 法で測定し比較検討した。同様の実験を VEGFC の枯渇

モデル(CRISPR/Cas9 システムで作成した、VEGFC をノックアウトした MCA38 細胞を移植したマウス)と過発現モデル(野性型 MCA38 細胞を移植し recombinant human VEGFC の追加投与を行ったマウス)でも行った。また VEGFC の autocrine により癌細胞内で増加しているサイトカインを Protein array 法で同定し、直接 VEGFC 刺激を加えて、その regulation を検証した。またそのサイトカインの中和抗体を担癌マウスに投与し、大腸癌肝転移制御の可否を検証した。さらに肝臓内の骨髓由来単球、マクロファージをフローサイトメトリーでカウントし、コントロール群とで population の相違を比較検討した。

【結果】

マウスの大腸癌肝転移巣周辺では、正常マウスの肝臓に比べて新生リンパ管数が有意に亢進しており(Pdp: $p = 0.004$, LYVE-1: $p < 0.001$)、その内の幾つかには癌細胞の浸潤が認められ、肝臓内転移の径路になっていることが示唆された。一方、肝臓内の新生血管数には有意差は認められなかった。肝臓内の VEGFC 量も担癌マウス群で有意に増加していた($p = 0.01$)。VEGFC ノックアウト大腸癌細胞移植群はコントロール群よりも有意に長期生存し($p < 0.001$)、肝臓内リンパ管新生も有意に抑制されていた(Pdp: $p = 0.004$, LYVE-1: $p = 0.02$)。VEGFC 過発現モデルでは、それらと真逆の結果が得られた。Protein array では VEGFC 刺激により macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) が MCA38 細胞より分泌が促進されており、担癌肝臓においても MIP-1 α の mRNA は正常肝よりも有意に増加していた($p = 0.04$)。MIP-1 α の中和抗体投与群は isotype control 抗体投与群よりも有意に肝転移巣の縮小が得られた($p = 0.02$)。また担癌肝臓では正常肝臓に比べて腫瘍関連マクロファージ(tumor associated macrophages; TAMs)が増加していた。MIP-1 α の中和抗体投与群では総合的な TAMs の減少は僅かであった。しかしその population を詳細に検討したところ、肝臓既存のマクロファージ(i. e. Kupffer 細胞)ではなく骨髓由来の未熟なマクロファージ、あるいは単球が著明に低下していた。これらの肝臓内の単核球を microarray にかけてみたが、リンパ管新生に関連する遺伝子変化は認められなかった。

【結論】

大腸癌肝転移は肝臓内の新生リンパ管を介して広がっていくが、その際には腫瘍が分泌する VEGFC が非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。VEGFC を抑制することはこのメカニズムを阻害することに他ならないが、同時に MIP-1 α の分泌を抑制し、骨髓由来のマクロファージの転移巣への遊走を阻害することにも繋がる。VEGFC をターゲットとした抗リンパ管新生療法は大腸癌多発転移に対する有用な治療法となり得る。

審査の結果の要旨

本論文は大腸癌の肝転移において、血行性転移のほか、肝臓内で二次性にリンパ管を介した転移形式があることを明らかにしたものである。リンパ管を介した大腸癌肝内転移は、腫瘍が産生する vascular endothelial growth factor C (VEGFC) によるリンパ管新生によって促進される。一方、VEGFC の制御により、リンパ管新生のみならず、macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) を介した骨髄由来細胞の肝臓への動員が抑制され、間接的にも大腸癌肝転移が抑えられる。リンパ管新生を標的とした治療法は、肝転移を有する進行大腸癌患者の予後改善に繋がる可能性があることが示唆された。

1. 斬新さ

大腸癌の肝臓内多発転移におけるリンパ行性転移はあまり知られていない現象であり、さらにメカニズムも解明されていない。本研究はそれに着目したもので、大腸癌細胞が VEGFC と MIP-1 α の分泌を自己調整して肝臓内リンパ行性転移を制御していることを初めて示したものである。

2. 重要性

大腸癌肝転移の多くは、原発巣から血行性（経門脈性）に生じることが知られている。しかし本研究によって、二次的な肝臓内多発転移のメカニズムとして、血行性転移以外にリンパ行性転移が存在することが明らかとなった。臨床現場において、大腸癌肝転移に対する抗血管新生療法の効果は限定的である。故にその制御という点では、別の転移メカニズムを標的とした治療戦略が有効かもしれない。本研究の重要性は、抗リンパ管新生療法がその一役を担う可能性を示した点である。

3. 実験方法の正確性

まず本研究はデータ解析に必要とする最小限の数の C57BL6/J マウスを使用した。またそのマウスに syngeneic な大腸癌細胞 (MCA38) を移植することで、マウス自身の大腸癌細胞に対する allogeneic な拒絶反応の介入の可能性を除外している。*in vivo* の実験においては、対称群を適切に設定し、系統立った実験系を確立している。各種試薬や中和抗体の投与方法は、マウス生体の含有量や過去の報告を参考にするなど、根拠に基づいて設定している。さらに *in vitro* の実験では、ELISA、qRT-PCR、flow cytometry 等において、複数回 (triplicate) の検証を行っている。なお VEGFC ノックアウト癌細胞移植実験においては、CRISPR/Cas9 システムによる off target 効果を除外するために、2種類の癌細胞株を樹立し、同様の実験結果を得ている。

4. 表現の明確さ

研究の目的、方法と材料、結果、考察いずれも明確な英語表現で記載された論文である。

5. 主な質疑応答

Q1: リンパ管新生自体は癌細胞移植群とコントロール群とでさほど差がついていないように見える。この実験は癌細胞を移植してからある程度時間が経った後に評価しているが、癌細胞が門脈から肝臓に到達した時点で、すでに違いが生じていた可能性はないか？本当に癌細胞が生着して、その後リンパ管が広がったのか？

A1: 本研究では移植後 28 日目に剖検している。継時的なことでは、予備実験では移植後 7、14、21 日目にも剖検を行っており、いずれも癌細胞移植群でのリンパ管の増生を認めている。本実験よりも早期に肝臓内でリンパ管新生やリンパ行性転移が生じていることは間違いないと考えるが、最初の移植の段階でリンパ管が増加および拡張している可能性も否定はできない。

Q2: リコンビナント VEGFC を腹腔内に投与することで、VEGFC が血行性に全身に回っていると考えられる。肝臓以外で、例えば肺やリンパ節の転移に関してはどうだったか？

A2: 脳や肺などを含めて、肝臓以外の他臓器転移は不思議と認められなかった。リンパ節に関しては、肝門部リンパ節の転移を認めることがあったが、その他腹腔内のリンパ節に関しては明らかな転移は認めなかった。

Q3: 肝臓内マクロファージと VEGFC はどう繋がるのか？

A3: 大腸癌以外の癌種において、マクロファージが VEGFC を分泌し、増殖や転移に寄与しているという研究報告は存在する。本研究では新規性という点も含めて、肝臓内マクロファージが VEGFC を分泌し、肝臓内リンパ管新生に寄与しているというストーリーに仕上げたかった。そのためには肝臓内のマクロファージ枯渇モデルでの癌細胞移植実験が必要と考えた。クロドロン酸リポソームを投与すると、マウスの肝臓内マクロファージが著明に減少することは検証しているが、続けて癌細胞を移植するとマウスが致死となってしまうため、実験が頓挫してしまっている。

Q4: ストーリーとしては、癌細胞が VEGFC を分泌してリンパ行性転移を来し、さらにマクロファージを肝臓内に動員し、そのマクロファージが VEGFC を分泌してまたリンパ管新生・転移を助長する、ということか？

A4: 最後のメカニズムは証明できていないが、その可能性が高いと考えている。

Q5: VEGFC は染色していないのか？癌細胞が分泌しているのか、それが誘導したマクロファージが分泌しているのか判断がつかないのでは？

A5: VEGFC の染色は行っていない。小分子は染色が困難であると考えていた。

Q6: リンパ管新生が実際に起こっていることを証明する意味で VEGFR-3 の染色は行ったのか？

A6: 何度も行ってはみたが、結局うまく染色できなかった。

Q7: 腫瘍近傍に存在するのは単球なのか？マクロファージなのか？染め分けはどのようにしたのか？

A7: 炎症性の単球とマクロファージの両方が存在すると考えている。フローサイトリーでの区別はF4/80 標識の強弱で判断した。免疫染色による組織評価までは行っていない。

Q8: タイトルを見る限り動員されたマクロファージは骨髄由来細胞に限定しているようだが、脾臓や血液を介して動員されたものもあるのでは？

A8: その可能性もあるが、そこまで検証できていない。

Q9: この研究において言えるのは、この cell line における大腸癌肝転移についてであり、他の大腸癌細胞では違った結果になった可能性があるのでは？

A9: その可能性はある。使用したのは同種同型マウス由来の大腸癌細胞株であるが、複数の細胞株を移植して検証した方が、より汎用的だったと考える。

Q10: 多発性大腸癌肝転移はその広がり方として原発巣・血管内から肝臓内に多発性に散布して生着・増殖するパターンと、1 箇所生着した転移巣から 2 次的に複数箇所に広がるパターンとが考えられるが、どちらが主要か？パーセンテージなどは？

A10: 自分の知る限りは判明していない。

Q11: 本来血行性転移を来し易いはずの大腸癌細胞が、肝転移を生じることでリンパ行性転移を起こす、こういったリスクファクターのようなものが、例えば切除標本などで指摘されているか？

A11: 自分の知る限り、そういったマーカーのようなものはない。

Q12: リンパ管内に癌細胞がどれだけ認められたか検証すべきだったのでは？

A12: 確かに癌細胞に特異的な免疫染色を追加したり、レポータータンパク遺伝子改変型大腸癌細胞の移植実験を行ったりして、詳細に検証すべきだったと考えている。

以上の内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑応答の結果を踏まえ審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。