

氏 名（本籍）	お 小 山 <sup>あつし</sup> 淳
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 2 0 6 2 号
学位授与年月日	平 成 1 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学位論文題目	大腸癌リンパ節転移機構における CD44 とヒアルロン酸の関与

（主 査）

論文審査委員	教授 佐々木 巖 教授 八重樫 伸 生
	教授 笠 井 憲 雪

# 論文内容要旨

大腸癌においてリンパ節転移は最も重要な予後規定因子の1つである。リンパ行性転移の研究は、血行性転移の研究と比較して最近までほとんど進んでいなかった。しかし、近年リンパ管内皮に選択的に発現する膜貫通型チロシンキナーゼ受容体である vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 や、そのリガンドである vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C), VEGF-D が同定されたことに伴い、リンパ管新生の概念が提唱され、リンパ行性転移機構の研究が飛躍的に進行している。

当教室ではこれまで細胞接着分子 CD44 が大腸癌肝転移（血行性転移）に密接に関与していることを報告してきた。CD44 は、多くの腫瘍細胞上に存在し、リガンドであるヒアルロン酸やオステオポンチンとの相互作用により血行性転移、腹膜播腫性転移に関与していることが多く報告されている。一方、リンパ行性転移との関連については胃癌において CD44 の発現がリンパ管侵襲、リンパ節転移に重要であることが報告されているが、大腸癌のリンパ行性転移における CD44 の関与を検討した報告はない。

Jackson らによりリンパ管内皮上にヒアルロン酸の受容体が初めて同定され、lymphatic vessel endothelial HA receptor 1 (LYVE-1) と命名された。彼らは、血球あるいは腫瘍細胞がリンパ管内に吸収される（侵入する）機構として、細胞膜上の CD44 がヒアルロン酸と結合し、ヒアルロン酸が LYVE-1 を介してリンパ管内皮から吸収される際ともにリンパ管内に取り込まれるのではないかと、という仮説を提示している。しかし、この仮説を裏付けるような研究結果はこれまで報告されていない。

以上より、本研究は大腸癌リンパ節転移における腫瘍細胞の CD44 発現とそのリガンドであるヒアルロン酸との相互作用について、ヌードマウス同所移植自然転移モデルを用いて解析することを目的とした。

用いたヒト大腸癌細胞株は LS174T, LS174T-NEO, LS174T-AS1, -AS2, Colo320, CloneA である。LS174T-AS1, -AS2 は LS174T に antisense CD44 を組み込んだ発現ベクターを遺伝子導入して樹立された細胞株であり、LS174T-NEO はコントロールとして antisense CD44 を含まない発現ベクターを遺伝子導入した細胞株である。CD44 の発現は Flow Cytometry で確認した。Matrigel に浮遊させた大腸癌細胞株を、ヌードマウスの盲腸壁に移植して移植6週後に犠死させ、リンパ節転移、肝転移、腹膜播腫の形成率を評価した。マウス盲腸組織のリンパ管侵襲像を観察するために抗マウス VEGFR-3 抗体を用いて、免疫染色を行った。CD44 発現の程度とリンパ節との接着性を検討する目的で、正常リンパ節の凍結切片を用いて Stamper-Woodruff assay を行った。さらに、CD44 のリガンドであるヒアルロン酸の関与を検討する目

的で、リンパ節をヒアルロニダーゼで処理した場合の Stamper-Woodruff assay を行った。

CD44 は LS174T, LS174T-NEO が強発現株, LS174T-AS1 は弱発現株, LS174T-AS2 はほぼ完全に発現が抑制された細胞株, CloneA は弱発現株であり, Colo320 は無発現の細胞株であった。ヌードマウス同所移植の結果は, CD44 強発現株である LS174T, LS174T-NEO が 90% にリンパ節転移を形成した (n=10)。CD44 弱発現株である LS174T-AS1, CloneA はそれぞれ 40%, 30% (いずれも n=10) のリンパ節転移形成率であった。CD44 発現がほぼ完全に抑制された細胞株あるいは無発現株である LS174T-AS2, Colo320 はリンパ節転移を形成しなかった。リンパ管侵襲の程度を検討する目的で行ったマウス盲腸組織のリンパ管免疫染色では, CD44 強発現株である LS174T-NEO で高度のリンパ管侵襲像が観察された。一方, CD44 の発現がほぼ完全に抑制された細胞株, あるいは無発現株である LS174T-AS2, Colo320 ではリンパ管侵襲像をほとんど認めなかった。CD44 弱発現株である CloneA では, 中等度のリンパ管侵襲像が観察された。正常リンパ節との接着性を検討する目的で行った Stamper-Woodruff assay では, CD44 強発現株である LS174T, LS174T-NEO で正常リンパ節切片に対して著明な接着性を認めた。一方, CD44 発現抑制株である LS174T-AS1, -AS2 は, 正常リンパ節に対する接着性が有意に低下していた。ヒアルロン酸の関与を検討する目的で, 正常リンパ節切片をヒアルロニダーゼで処理したところ, CD44 強発現株である LS174T, LS174T-NEO の接着性は著明に抑制された。

ヒト大腸癌同所移植自然転移モデルにおいて, CD44 発現とリンパ節転移との間には強い相関関係が認められ, その機構には CD44 とそのリガンドであるヒアルロン酸の接着が関わっている可能性が初めて示された。

## 審査結果の要旨

大腸癌においてリンパ節転移は最も重要な予後規定因子の一つである。リンパ行性転移の研究は、リンパ管新生因子が同定されてから飛躍的に進行している。リンパ管新生因子の発現は、リンパ管侵襲、リンパ節転移と正の相関を持つとする報告が多いが、必ずしもそうではないという報告もあり、他因子の存在が考えられる。当教室ではこれまで CD44 が大腸癌肝転移に密接に関与していることを報告してきたが、大腸癌リンパ節転移と CD44 の関連を実験的に検討した報告はない。また、近年リンパ管内皮上に CD44 のリガンドであるヒアルロン酸の受容体 (LYVE-1) が同定され、腫瘍細胞がリンパ管内に吸収される機構として、CD44 がヒアルロン酸と結合し、ヒアルロン酸が LYVE-1 を介してリンパ管内皮から吸収される際ともにリンパ管内に取り込まれるのではないかという仮説が提示されている。しかし、この仮説を裏付けるような研究結果はこれまで報告されていない。

以上より、本研究は大腸癌リンパ節転移における腫瘍細胞の CD44 発現とそのリガンドであるヒアルロン酸との相互作用について、ヌードマウス同所移植自然転移モデルを用いて解析することを目的とした。

用いたヒト大腸癌細胞株の CD44 発現形式は、Flowcytometry の結果より、LS174T, LS174T-NEO が強発現株、LS174T-AS1 は弱発現株、LS174T-AS2 はほぼ完全に発現が抑制された細胞株、CloneA は弱発現株であり、Colo320 は無発現の細胞株であった。ヌードマウス同所移植の結果、LS174T, LS174T-NEO では、リンパ管免疫染色で著明なリンパ管侵襲が観察され、高率なリンパ節転移を認めた。一方 LS174T-AS2, Colo320 ではリンパ管侵襲をほとんど認めず、リンパ節転移も形成されなかった。LS174T-AS1, CloneA は、中程度のリンパ管侵襲、リンパ節転移率であった。また、正常リンパ節との接着性を検討する目的で行った Stamper-Woodruff assay では、LS174T, LS174T-NEO で著明な接着を認めた。一方、LS174T-AS1, -AS2 は、正常リンパ節に対する接着性が有意に低下していた。さらに、ヒアルロン酸の関与を検討する目的で、正常リンパ節切片をヒアルロニダーゼで処理したところ、CD44 強発現株である LS174T, LS174T-NEO の接着性は著明に抑制された。

ヒト大腸癌同所移植自然転移モデルにおいて、CD44 発現とリンパ節転移との間には強い相関関係が認められ、その機構には CD44 とそのリガンドであるヒアルロン酸の接着が関わっている可能性が初めて示された。

本研究は、大腸癌リンパ節転移機構における新しい知見を提示したものであり、今後臨床への応用も期待されると考えられ、十分学位に値するものである。