

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462078

研究課題名(和文) 癌細胞とクッパー細胞の相互作用に着目した血行性肝転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) mechanism of liver metastasis focused on the interaction between tumor cells and Kupffer cells

研究代表者

近藤 匡 (Kondo, Tadashi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00375495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体蛍光顕微鏡を用いてクッパー細胞と腫瘍細胞の動態を解析することにより、肝転移早期においてクッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を検討した。

腫瘍細胞とクッパー細胞との接着をリアルタイムで観察することが出来た。腫瘍細胞はクッパー細胞と接着し、その後腫瘍細胞は貪食された。クッパー細胞を除去することで接着腫瘍細胞数・転移結節数は増加し、クッパー細胞は肝転移を抑制する働きを持つことを示した。クッパー細胞が腫瘍細胞の肝転移早期プロセスを抑制する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the role of Kupffer cells (KCs) in the liver metastasis, we used intravital microscopy (IVM) to analyze the sinusoidal dynamics of both KCs and TCs in colon cancer metastasis to the liver. IVM showed that TCs adhered to KCs from the early time after TC injection. The KCs phagocytosed the TCs, which adhered with the KCs. In addition, we eliminated KCs at different time points before or after injection of tumor cells (TCs). The role of KCs was suppressive especially in the early stage of liver metastasis. It is suggested that KC phagocytosis of TCs in the early stage of liver metastasis strongly suppressed the formation of the liver metastatic nodules thereafter.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝転移 クッパー細胞 肝微小循環 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦においては、大腸癌の罹患者数は増加傾向である。大腸癌は肝転移を合併する頻度が高く、同時性肝転移・異時性肝転移を合わせると 23~29%の患者に肝転移が存在する。治療として外科切除が高い成績を上げているが、再発率が高いと報告されている。大腸癌肝転移再発の一因としては、手術操作によって増加する血中循環腫瘍細胞の存在が挙げられる。実際に、動物実験でも臨床研究でも、手術操作により循環腫瘍細胞が増加し、循環腫瘍細胞が予後に影響を与えると報告されている。

大腸癌肝転移は、血液中に遊離した腫瘍細胞が肝類洞内皮に接着し、類洞外へ浸潤・増殖することで発生すると考えられている。肝類洞を構成する細胞の一つであるクッパー細胞を除去すると肝転移が増加したと報告された。一方でクッパー細胞が放出するサイトカインが肝類洞内皮への腫瘍細胞の接着・浸潤・増殖を促進するという報告もある。転移を形成するには血中を循環する腫瘍細胞が類洞内に接着することが必須となる。クッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を明らかとするには、in vivo において、両細胞を染色し類洞内を腫瘍細胞が循環している状況下で観察する必要がある。過去の実験では固定標本による組織学的評価が中心であった。

2. 研究の目的

これまで、生体蛍光顕微鏡観察システムを構築し、各細胞の類洞内動態をリアルタイムに観察・解析する研究を行い報告してきた。この肝微小循環を可視化する技術を用いて、クッパー細胞と腫瘍細胞をそれぞれ生体内で同時に蛍光観察することに成功し、肝転移早期における両細胞の動態を観察することが可能となった。

本研究では、生体蛍光顕微鏡を用いてクッパー細胞と腫瘍細胞の動態を解析することにより、肝転移早期においてクッパー細胞が腫瘍細胞に与える影響を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝転移モデル

Fischer 344 ラット雄、200~250 g に頸動脈カテーテルを留置し、ラット大腸癌細胞株である RCN-H4 を 5×10^6 個投与した。

(2) クッパー細胞の染色

ホスファチジルコリンとコレステロールをクロロフォルムに溶解し、エバポレーターを用いて薄膜を作成した。NBD-C12-HPC を用いて蛍光封入りリポソームとし、腫瘍細胞投与 80 分前に肝転移モデルの頸動脈カテーテルから 4ml/kg 投与した。

(3) 腫瘍細胞の染色

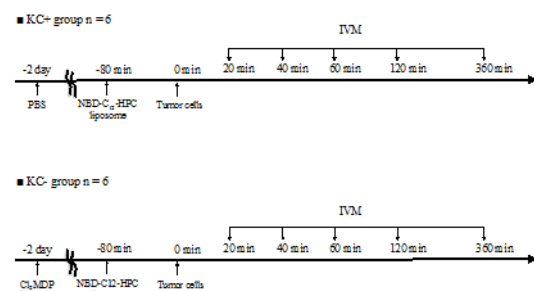
RCN-H4 を Rhodamine 6G と、血清を加えていない RPMI-1640 培地で 60 分間培養し洗浄した後に 5×10^6 個/ml の濃度となるように調整した。

(4) クッパー細胞の除去

ホスファチジルコリンとコレステロールをクロロフォルムに溶解し、エバポレーターを用いて薄膜を作成した。Cl₂MDP を用いてリポソームを作成した。クッパー細胞は、Cl₂MDP リポソーム投与 24 時間後にほぼ完全に除去され、投与 3 日後より増加が始まり、投与 8 日後に除去前と同数となることが報告されている。

(5) 生体蛍光顕微鏡観察

ラットを麻酔下に気管切開を行い人工呼吸器管理として、左頸動脈と左頸静脈にカテーテルを留置した。開腹を行い、肝左葉を脱転ステージで肝臓を固定した。腫瘍細胞は 60 秒かけて頸動脈から投与した。クッパー細胞を除去していない KC+群とクッパー細胞を除去した KC-群の 2 群を設定した。生体蛍光顕微鏡を用いて 10 腺房をランダムに選択し、腫瘍細胞投与 20 分後、40 分後、60 分後、120 分後、360 分後に肝微小循環の観察を行った。観察終了後に犠牲死を行い、肝組織を採取した (図 1)。



(図 1) 生体蛍光顕微鏡観察における実験群

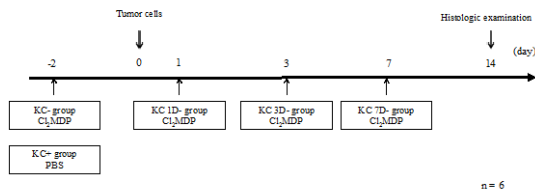
(6) クッパー細胞と腫瘍細胞の微小循環観察

観察視野は 0.2 mm² 以下であり、その視野に含まれる 1 腺房内の各細胞数をカウントした。(i) 接着腫瘍細胞数 (接着腫瘍細胞は、類洞に 20 秒以上留まっているものを接着と定義)、(ii) クッパー細胞と接着した腫瘍細胞数 (クッパー細胞と同部位に接着した腫瘍細胞) (iii) クッパー細胞数

(7) 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去した実験群

クッパー細胞の除去と腫瘍細胞の投与のタイミングがその後の転移形成にどのような影響を与えるのか検討するため、ラットを腫瘍細胞投与 2 日前から腫瘍細胞投与 7 日後までの異なるタイミングでクッパー細胞を除去するモデルを 5 群作成した (図 2)。腫瘍細胞投与 14 日後に肝臓を摘出し、左葉と中葉

の転移結節数を計測した。



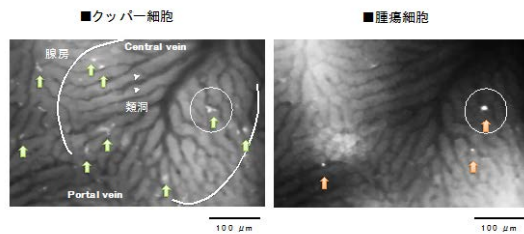
(図 2) 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去したモデルの実験群

4. 研究成果

(1) 生体蛍光顕微鏡観察

① 腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係

クッパー細胞が腫瘍細胞へ与える影響を検討するには、同一部位の腫瘍細胞とクッパー細胞を観察する必要がある。生体蛍光顕微鏡で腫瘍細胞とクッパー細胞が同時に観察可能か検討した(図3)。腫瘍細胞とクッパー細胞は、フィルターを切り替えることで、同一視野の両細胞が観察可能となる。黒色の枝状の線が類洞を表す。肝微小循環の最小単位である腺房はラグビーボール状に示すことができ、血流は門脈領域から中心静脈領域へ流れる。クッパー細胞と腫瘍細胞は各々同定できた。類洞を流れる腫瘍細胞は、類洞に接着するもの、類洞に接着しないもの、類洞に接着した後に離れるものが存在した。類洞に接着する腫瘍細胞は、クッパー細胞と別部位に接着する細胞、クッパー細胞と同部位に接着する細胞が存在した。転移形成に重要な影響を与えるクッパー細胞が腫瘍細胞接着にどのように関わっているか検討するには、*in vivo*において、クッパー細胞を染色し、腫瘍細胞が類洞内を循環している状況下で観察することで明らかになる。しかしながら、現在までに肝転移早期における腫瘍細胞とクッパー細胞の相互作用を生体蛍光顕微鏡で見たという報告はない。我々が構築した生体蛍光顕微鏡システムでは、腫瘍細胞およびクッパー細胞の両者を同時に蛍光染色し、同部位・同視野を経時的に観察できた。

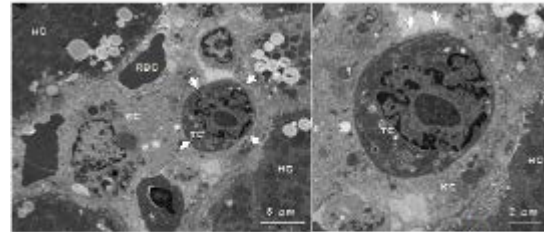


(図 3) 生体蛍光顕微鏡観察像

② 電子顕微鏡による腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係の評価

前の実験によりクッパー細胞と同部位の類洞に接着する腫瘍細胞を認めたため、腫瘍細胞投与2時間後の肝類洞内におけるクッパー細胞と腫瘍細胞を電子顕微鏡で詳細に観察した(図4)。類洞内には腫瘍細胞とクッパー

細胞を認め、両者は接着していた。拡大すると腫瘍細胞はクッパー細胞の細胞膜に覆われており、クッパー細胞に食食されていることが明らかとなった。生体蛍光顕微鏡で同部位に観察された両細胞は、腫瘍細胞がクッパー細胞に接着している現象を観察していると推定された。

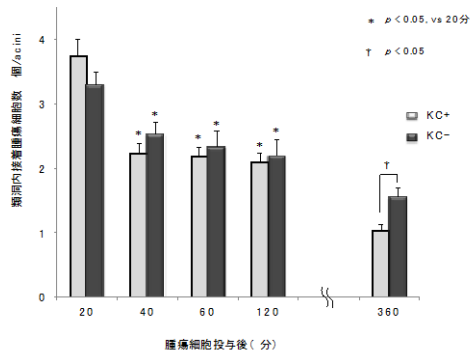


(図 4) クッパー細胞と腫瘍細胞の接着

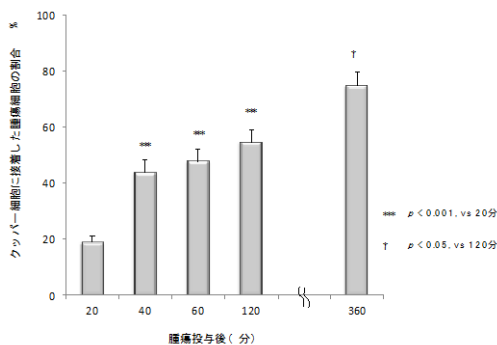
③ 生体蛍光顕微鏡による腫瘍細胞とクッパー細胞の相互関係の評価

類洞内に腫瘍細胞が接着することが明らかとなったため、クッパー細胞の存在が、腫瘍細胞の接着に影響を与えるか検討した(図5)。クッパー細胞を除去していないKC+群では、腫瘍細胞投与20分、40分、60分、120分、360分後の類洞内接着腫瘍細胞数は、それぞれ 3.75 ± 0.24 , 2.23 ± 0.16 , 2.19 ± 0.14 , 2.08 ± 0.13 , 1.03 ± 0.1 個/腺房であり、時間経過とともに減少した。クッパー細胞を除去したKC-群では、腫瘍細胞投与20分、40分、60分、120分、360分後の類洞内接着腫瘍細胞数はそれぞれ、 3.29 ± 0.20 , 2.52 ± 0.20 , 2.33 ± 0.24 , 2.19 ± 0.25 , 1.55 ± 0.14 個/腺房であり、KC-群でも時間経過とともに減少した。腫瘍細胞投与20分後から120分後までは、KC+群とKC-群の類洞内接着腫瘍細胞数は両群間で差を認めなかった。腫瘍細胞投与360分後、KC+群とKC-群で類洞内接着腫瘍細胞数に有意な差を認めた。クッパー細胞の有無が、類洞内に接着する腫瘍細胞数に影響をあたえることが明らかとなったため、KC+群において、類洞内に接着した腫瘍細胞のうちクッパー細胞に接着した腫瘍細胞がどれくらいの割合存在するのか検討した(図6)。20分後から360分後にかけて、 $18.6 \pm 2.5\%$, $43.6 \pm 4.8\%$, $47.5 \pm 4.8\%$, $54 \pm 4.7\%$, $74.4 \pm 5.2\%$ と時間経過とともにクッパー細胞と接着した腫瘍細胞の割合は増加していた。図7で類洞内皮細胞とクッパー細胞のそれぞれに接着した腫瘍細胞の割合を示す。KC+群では、クッパー細胞と接着する腫瘍細胞は増加する一方で、類洞内皮と接着する腫瘍細胞は減少した。この作用の詳細を解明するために先行実験で電子顕微鏡を用いて観察したところ、クッパー細胞が腫瘍細胞を食食していることが分かった。*in vitro* 研究において、クッパー細胞と癌細胞と共培養すると、クッパー細胞は偽足を出して腫瘍細胞と接着していると報告されており、また、クッパー細胞の偽足によって捉えられた腫瘍細胞はその

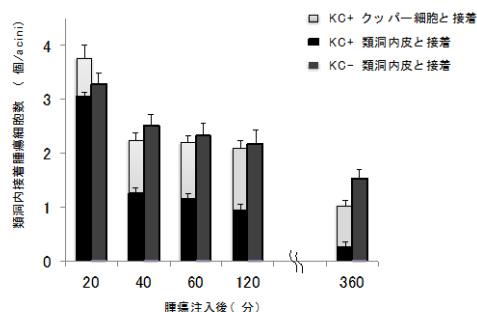
後貪食され、破壊されると報告されている。クッパー細胞と接着した腫瘍細胞はクッパー細胞の偽足にとらえられ離れにくいと、時間経過に従ってその割合が増加していると推測された。その後クッパー細胞と接着した腫瘍細胞は引き続き貪食されると考えられる。類洞内接着腫瘍細胞数は時間経過と共に減少した。その数は KC+群では KC-群と比較し、腫瘍細胞投与 360 分後で有意に低値であったが、腫瘍細胞がクッパー細胞に貪食された結果であると考えられた。肝転移早期においてクッパー細胞は循環腫瘍細胞を貪食し、肝転移形成を抑制していると考えられた。



(図 5) 類洞内接着腫瘍細胞数



(図 6) クッパー細胞に接着した腫瘍細胞の割合

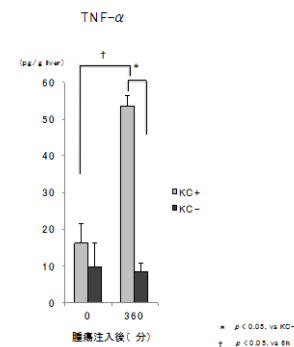


(図 7) 生体蛍光顕微鏡観察における腫瘍細胞が接着した類洞内構成細胞の内訳

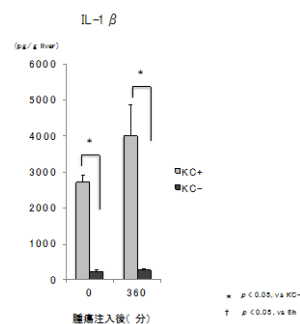
④クッパー細胞活性化の評価

腫瘍細胞投与によってクッパー細胞が活性化しているかどうか評価するため、肝組織中の TNF- α および IL-1 β を測定した (図 8、図

9)。クッパー細胞を除去していない KC+群において、腫瘍投与前と腫瘍細胞投与 360 分後の TNF- α は 16.4 ± 5.2 , 53.7 ± 2.81 pg/g liver であり有意に増加を認めた ($P < 0.05$)。IL-1 β は 2700 ± 223 , 3990 ± 262 pg/g liver であり、増加傾向を示した。一方で KC-群においては、TNF- α は 9.9 ± 6.25 , 8.5 ± 2.07 pg/g liver と腫瘍細胞投与による増加は認めず、IL-1 β においても 223 ± 39.5 , 280 ± 76.6 pg/g liver と増加を認めなかった。腫瘍細胞投与前の KC+群と KC-群を比較すると、TNF- α では両群間に差を認めなかったが、IL-1 β は KC+群が有意に高かった ($P < 0.05$)。クッパー細胞が腫瘍細胞を貪食するためにはクッパー細胞が活性化する必要がある。一方で、クッパー細胞関連サイトカインである TNF- α や IL-1 によって接着分子が発現すると報告されているが、本研究においては、最大 6 時間までの生体蛍光顕微鏡観察を行ったが、クッパー細胞由来のサイトカインが有意に増加した KC+群で接着腫瘍細胞が増加することはなかった。



(図 8) 肝組織中の TNF- α



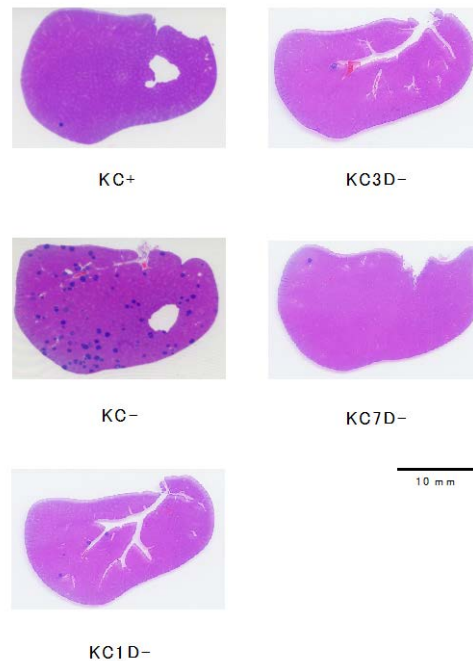
(図 9) 肝組織中の IL-1 β

(2) 腫瘍細胞投与前後にクッパー細胞を除去した実験群における転移結節数の評価

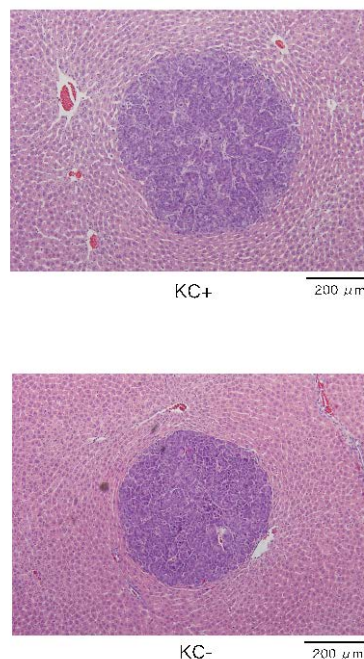
クッパー細胞の存在により生じた、腫瘍注入 360 分後における類洞内接着腫瘍細胞数の差が、その後の転移形成にどのような影響をあたえるのか、また、クッパー細胞はどのタイミングで転移の制御に深く関わっているのか検討するため、コントロール群である KC+群、腫瘍細胞投与 2 日前にクッパー細胞を除去した KC-群、腫瘍細胞投与 1 日後にクッパー細胞を除去した KC1D-群、腫瘍細胞投与 3 日後にクッパー細胞を除去した KC3D-群、腫瘍細胞投与 7 日後にクッパー細胞を除去し

た KC7D-群の 5 群に分け、クッパー細胞が肝転移結節形成に与える影響を検討した。上記 5 群において、腫瘍細胞投与 2 週間後の肝臓を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色したルーペ像を示す (図 10)。肝転移結節は、500~1000 μm の転移結節としてヘマトキシリンで青く染色され、容易に同定することが可能であった。腫瘍細胞投与前にクッパー細胞を除去した KC-群で多数の転移結節を認めた。群間で転移結節像に差があるか拡大像を検討した (図 11)。転移結節を拡大したところ、転移結節は、zone1 である門脈近傍に多く認められた。各群で転移結節の構造に明らかな違いは認めなかった。各群における転移結節数をグラフにしたものを示す (図 12)。KC+群、KC-群、KC1D-群、KC3D-群、KC7D-群は、それぞれ、 0.15 ± 0.04 , 57.6 ± 4.4 , 3.9 ± 0.4 , 0.19 ± 0.04 , 0.19 ± 0.05 個/切片であった。腫瘍細胞を投与した後にクッパー細胞を除去した群 (KC1D-群~KC7D-群) では、KC-群と比較して著明に転移結節数は減少していた ($p < 0.05$)。血液中を循環する腫瘍細胞は手術操作により増加すると報告されている。Nishizaki らは、ウサギと VX-2 細胞株を使った *in vivo* の実験において、手術操作によって血流に腫瘍細胞が流れ出ると報告した。Ito らは、切除可能大腸癌患者を対象とした臨床研究において、手術操作により血中循環腫瘍細胞が増加し、その循環腫瘍細胞は予後に影響を与えたと報告した。大腸癌肝転移患者を対象にした臨床研究では、術前におよそ 2 割~3 割の患者に循環腫瘍細胞を認め、手術中では循環腫瘍細胞を認めた患者は約 5 割に増加した。術中に循環腫瘍細胞が陽性であった患者は disease-free survival が悪く、その理由は手術操作で血流に腫瘍細胞が出て、再発したことが原因であると考察している。術後 24 時間以内の循環腫瘍細胞の存在が再発の有意な因子と述べている報告もある。このように手術操作によって増加した循環腫瘍細胞が、術後肝転移再発の一因であると考えられており、この循環腫瘍細胞に対してクッパー細胞は重要な肝転移抑制因子だと考えられる。

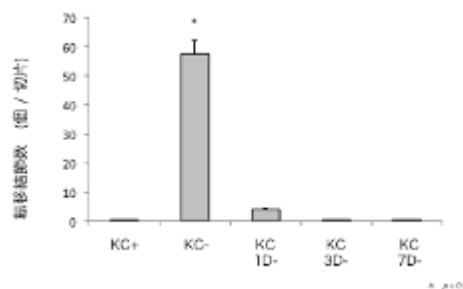
本研究では、生体蛍光顕微鏡により腫瘍細胞とクッパー細胞との接着をリアルタイムで観察することが出来た。腫瘍細胞はクッパー細胞と接着し、その後腫瘍細胞は貪食された。クッパー細胞を除去することで接着腫瘍細胞数・転移結節数は増加し、クッパー細胞は肝転移を抑制する働きを持つことを示した。今回の研究では、クッパー細胞が腫瘍細胞の肝転移早期プロセスを抑制する事が明らかとなった。今後、クッパー細胞の腫瘍細胞貪食メカニズムをより詳細に解明することで、大腸癌術後肝転移再発予防する新たな治療法に結びつく可能性がある。



(図 10) クッパー細胞の肝転移結節形成への影響 (腫瘍細胞投与 2 週間後)



(図 11) クッパー細胞の肝転移結節形成への影響 (拡大像)



(図 12) 転移結節数

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 松村英樹, 近藤匡, 小川光一, 田村孝史, 福永潔, 大河内信弘. 大腸癌肝転移型成早期において, Kupffer 細胞は転移抑制的に機能する. *Organ Biology*, Vol 22, 82-90, 2015 査読無
DOI: 10.11378/organbio.22.184
- ② H. Matsumura, T. Kondo, K. Ogawa, T. Tamura, K. Fukunaga, S. Murata, N. Ohkohchi: Kupffer cells decrease metastasis of colon cancer cells to the liver in the early stage. *International Journal of Oncology*, Vol. 45, 2303-2310, 2014 査読有
DOI: 10.3892/ijo.2014.2662.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 松村英樹, 近藤匡, 小川光一, 田村孝史, 福永潔, 大河内信弘. 血行性肝転移早期における Kupffer 細胞と腫瘍細胞の類洞内動態. 第 115 回日本外科学会定期学術集会. 2015. 4. 16~18. 名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ② 松村英樹, 近藤匡, 小川光一, 田村孝史, 福永潔, 大河内信弘. 血行性肝転移早期における Kupffer 細胞と腫瘍細胞の相互作用. 第 41 回日本臓器保存生物医学学会学術集会. 2014. 11. 28~11. 29. 千里ライフサイエンスセンター (豊中市)
- ③ 松村英樹, 近藤匡, 小川光一, 田村孝史, 福永潔, 大河内信弘. 癌の血行性肝転移の初期段階における Kupffer 細胞の役割. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014. 5. 29~30. ホテルニューオータニ (東京都千代田区)
- ④ 松村英樹, 近藤匡, 小川光一, 田村孝史, 福永潔, 大河内信弘. 癌の血行性肝転移の初期段階における Kupffer 細胞の役割. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013. 4. 11~13 福岡国際会議場 (福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 匡 (KONDO, Tadashi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：70615038

(2) 研究分担者

福永 潔 (FUKUNAGA Kiyoshi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20361339

田村 孝史 (TAMURA Takafumi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20633192

(3) 連携研究者

大河内 信弘 (OHKOHCHI Nobuhiro)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40213673