

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 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10277

研究課題名（和文）胸腔内に存在する癌細胞の進展に関する実験研究

研究課題名（英文）Study of spreading of residual cancer cells in the chest cavity

研究代表者

鬼塚 正孝（Onizuka, Masataka）

筑波大学・Tsukuba・准教授

研究者番号：40214176

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000 円

研究成果の概要（和文）：肺癌の外科治療で最も頭を悩ませるのは、術後再発である。手術時を反省するに、癌細胞が少数でも胸腔内に残存している可能性が懸念される場合、特に再発が多いように思われる。病期が進んでいないにもかかわらず再発をきたした場合、胸腔内の洗浄細胞診で癌細胞が陽性であった時など顕著である。

癌細胞がどのように胸腔内からリンパ管内に移動して転移を形成するかを、蛍光癌細胞をラットの胸腔内に移植し、継続的にその移動状況を、蛍光顕微鏡下に観察する実験を試みた。蛍光癌細胞の作製には以前から成功しており、血管内の移動状況は既に論文にしたが、今回の課題であるリンパ管内の移動状況は、ついに成功せず、研究期間が終了した。

研究成果の概要（英文）： Even after curative operation of lung cancer, I sometimes experienced metastasis to lymph nodes or other organs. In such a case, residual cancer cells might be stayed in the chest cavity. The cancer cells could enter the thoracic duct and flow away to other places, producing metastasis sites.

In this study I tried to see the phenomenon using fluorescent cancer cells introduced into the rat cavity and observed continuously under the fluorescent microscope. Before this experiment I succeeded to observe the cancer cells in the blood vessels and measured the velocity of the tumor blood flow. However, the attempted experiment how cancer cells move in the lymphatics was not succeeded.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 転移 リンパ管 胸管

1. 研究開始当初の背景

肺癌手術の施行時点で、胸腔内に癌細胞が存在していると予後が悪い。この事実は胸腔内細胞診の国内外の研究動向の結果で明らかである(文献、文献)。この癌細胞の一部は胸膜に播種し、また、一部は全身に広がる。最近我々は、免疫能が正常であるラットに自然発生した大腸癌を Green Fluorescent Protein (GFP) でラベルして胸腔内に注入し、胸膜播種を作成することに成功し、腫瘍血管の血流速度を測定した (*In Vivo* 23(2):291-5, 2009)。この実験で、臓側胸膜の播種巣内での血流速度は、流入前後よりも遅くなることが明らかとなった。

全身に癌細胞が広がるルートとしては、癌細胞がリンパ管開口部 (pleural lymph stomata) から胸管に流入して、静脈角から全身の血流に乗ることが考えられる。最近の我々のリンパ流の実験では、胸管に流入する肺リンパに注目している (*Lymphology* 42(3):112-22, 2009)。この実験では、肺水分の分布における肺リンパの役割について明らかにしている。肺切除後のリンパ流動態の変化を認識していることは、今回の研究において基礎的に重要である。

2. 研究の目的

肺癌を中心とした胸部悪性腫瘍に対して、外科療法を施行した後に再発して死亡することを防止できれば、文明人の寿命の延長にさらに寄与できる。そして、呼吸器外科医は手術治療のより高い成功率を得ることができる。再発の仕方には種々あるが、局所再発よりも全身への転移再発が、個体の生存率を左右する。そこで本研究では、手術時の前後に既に胸腔内に存在する癌細胞の、生理学的動態を研究して、それをもとにして癌の術後の再発を防止する方法を発見することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は以前、ラットの自然発生大腸癌細胞

を蛍光蛋白 (GFP) で標識して、これを免疫能が正常のラットの肝臓に注入し、肝病巣由来の肺転移を生じさせた。初期段階から観察して、癌細胞が1個の状態からどのように転移が形成されていくかを記録し、定量的にその特徴を明らかにした (*Microvasc. Res.* 73: 206-213, 2007)。今回の研究では、この標識癌細胞を免疫能正常ラットの胸腔内に注入し、播種の形成を試み、その成立過程を観察・記録するとともに、播種の初期段階からリンパ行性に転移していく病態を捉えて、定性的・定量的に検討することとした。その結果から、癌の発育・進展を阻止する有効な方法を考案し、実験的にその有用性を確認して、ヒト肺癌の治療に結びつける試みを行った。また、リンパ管内に流入した癌細胞が、どのような動態をとるかを、我々が開発して応用している実験系 (*J Physiol* 503: 223-234, 1997, *Acta Physiol* 188:139-49, 2006) を用いて検討を試みた。

4. 研究成果

(1) 癌細胞が胸腔内を浮遊して移動する状態をとらえたが、その動きに法則性や特殊性はなかった。フィッシャーラットの胸腔内に、ラット大腸癌細胞 RCN9 を投与したわけであるが、大腸癌細胞 RCN9 はフィッシャーラットに自然発生した癌であるため、コマーシャルに得ることができた。そして、正常な免疫能を持つフィッシャーラットに様々な割合で生着することを期待したが、今回は生着が見られなかった。この RCN9 には、あらかじめ GFP 遺伝子を導入して継代培養し、これを使用した。継代が進むにつれて癌細胞の活性 (悪性度) が減弱していくものと思われた。過去の肺転移の実験では、肺表面の観察のために、肺の動きを止めることに工夫を要したが、今回は胸腔深部の壁側胸膜や縦隔胸膜を観察するために、別の工夫が必要であった。

(2) 癌細胞が胸管に流入する瞬間は、画像

が不明瞭で捉えることができなかった。壁側胸膜直下のリンパ管内に癌細胞がどのように流入してゆくかを、可能な限り胸膜の全表面を実時間型共焦点レーザー走査顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope : CLSM) の深度を変化させて観察した。しかし、pleural lymph stomata を確認することは困難であった。この孔を通過して癌細胞が胸管に取り込まれる瞬間を観察したかったが、成功しなかった。

(3) 胸管と癌細胞を個別に識別することが困難であったために、胸管内を移動する癌細胞の動態は不明であった。末梢リンパ管の観察を中心とした実験に移行する予定であったが、リンパ管をそのまま確認することは不可能であった。胸腔内に注入した蛍光癌細胞がリンパ管に流入していく動態を捉えるには、リンパ管を標識しなければならないことが確実となった。経時的に、どのようにリンパ管・リンパ節に移行していくかを観察・記録するには、新たな実験方法の開発が必要である。

(4) 臓側胸膜表面から観察される標識癌細胞は、血管内及びリンパ管内双方で観察されず、胸膜の最薄部分でも可視できなかった。癌細胞の局在を正確に把握するには、血管及びリンパ管内皮細胞を蛍光染色して CLSM の多機能を応用し、画像を3方向から記録した後、3次元に再構築することが必要で、さらに、オリンパス社製 In vivo レーザー走査型顕微鏡 IV-100 を使用して、生体内での細胞レベルでの蛍光イメージング観察を In vivo で行うことも考えていた。しかし、これらの事をラットで行うには非常な困難があったために、実験動物の変更が必要であると思われる。

<引用文献>

E. Lim, A. Ali, P. Theodorou, A.G. Nicholson, G. Ladas and P. Goldstraw,

Intraoperative pleural lavage cytology is an independent prognostic indicator for staging non-small cell lung cancer, J Thorac Cardiovasc Surg 127: 1113-1118, 2004

K. Aokage, J. Yoshida, G. Ishii, S. Enatsu, T. Hishida, M. Nishimura, Y. Nishiwaki and Kanji Nagai, The impact on survival of positive intraoperative pleural lavage cytology in patients with non-small-cell lung cancer J Thorac Cardiovasc Surg 139: 1246-1252, 2010

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

菊池慎二、鬼塚正孝、他、Salvage surgery for pulmonary metastases in patients with testicular germ cell tumors、第18回世界肺癌学会、2017年10月7日

後藤行延、鬼塚正孝、他、霊長類体外循環モデルを用いた骨髓由来白血球の肺集積に対する CCL23/myeloid progenitor、第70回日本胸部外科学会定期学術集会、2017年9月26日

後藤行延、鬼塚正孝、他、肋間から椎間孔浸潤を伴う悪性胸膜中皮腫に対する手術、再建の工夫、第57回日本肺癌学会学術集会、2016年12月19日

中岡浩二郎、鬼塚正孝、他、非小細胞肺癌における肺葉別のリンパ節郭清度 (ND1/ND2) による予後の違い、第57回日本肺癌学会学術集会、2016年12月19日

菊池慎二、鬼塚正孝、他、Overexpression of CADM1 is Associated with Prognosis in Small Cell Lung Cancer、第16回世界肺癌学会、2015年9月9日

後藤行延、鬼塚正孝、他、系統的リンパ節郭清を伴う Complete VATS lobectomy の手技と安全確保のための工夫、第40回日本外科系連合学会学術集会、2015年6月18日

6、研究組織

(1)研究代表者

鬼塚正孝 (ONIZUKA, Masataka)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：40214176

(2)研究協力者

後藤行延 (GOTO, Yukinobu)
筑波大学・医学医療系・講師