

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21592189

研究課題名（和文） バイオアッセイモデルによる上咽頭癌リンパ節転移機構に関する研究

研究課題名（英文） Research of the mechanism of lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma with bio-assay model

研究代表者

脇坂 尚宏（WAKISAKA NAOHIRO）

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：70377414

研究成果の概要（和文）：

上咽頭癌では、腫瘍細胞においてリンパ管新生因子、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)-C が発現しており、その結果、リンパ管数が増加してリンパ節転移が促進される機構が存在する可能性が示唆された。しかし、EBV 潜伏感染や EBV 関連蛋白の発現とリンパ管新生因子の発現については、in vivo、in vitro ともに有意な結果は得られなかった。

そこで、舌癌症例について、予防的頸部郭清術後の pN0 リンパ節のリンパ管新生を検討した所、後にリンパ節転移再発を来した症例では既にリンパ管数が増加していることが判明した。以上から、舌癌のリンパ節転移が成立するまでに、所属リンパ節では既にリンパ管新生が起きている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The involvement of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C/VEGF receptor-3 axis in the induction of lymphangiogenesis results in lymphatic spread of nasopharyngeal carcinoma. However, Epstein-Barr virus-associated latent membrane protein-1 was not associated with the mechanism.

Knowing the status of lymphangiogenesis in the regional lymph nodes in tongue cancer would help in predicting which patients will develop nodal recurrence. Thus, therapeutic approach which blocks lymphangiogenic factors may be beneficial in suppressing the lymphatic spread of tongue cancer with intense intranodal lymphangiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：頭頸部癌の浸潤・転移

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：EBV, LMP1, VEGF-C, リンパ管新生, リンパ節転移, 上咽頭癌, 動物モデル, 胸管

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ管新生とは、既存のリンパ管から

新たにリンパ管が形成される過程で、発芽と過形成からなる。癌原発巣ではリンパ管新生

が生じる事、さらにこのリンパ管新生は、所属リンパ節への転移を促進する事がまず悪性黒色腫で示され、以後、腫瘍リンパ管新生とリンパ節転移の関連性が注目されている。ところで近年、乳癌においてセンチネルリンパ節の概念が提唱され、頭頸部癌でも口腔癌を中心に同様の概念が提唱されている。興味深い事に、病理標本として提出されたセンチネルリンパ節が腫脹してリンパ管の拡張や炎症および免疫細胞の集積が見られても、癌細胞を認めず転移陰性と診断される事は珍しくない。この事実は、センチネルリンパ節転移が成立してからリンパ管新生が始まるのではなく、むしろセンチネルリンパ節において転移以前にリンパ管新生が誘導されている可能性を示唆している。

リンパ管上皮細胞の培養は可能であるが、その細胞に管腔形成など3次元構造を変化させる技術はない。また、リンパ節転移動物モデルは存在するが、その過程を Real Time でリンパ管新生とともに観察する技術もない。

## 2. 研究の目的

- 1) in vitro 腫瘍リンパ管新生バイオアッセイモデルを開発すること
- 2) 蛍光蛋白技術および画像技術を駆使して、視覚的な上咽頭癌リンパ管新生およびリンパ節転移動物実験モデルを開発すること
- 3) 上咽頭癌のリンパ節転移における LMP1 の役割に焦点を当てつつ、開発した実験モデルを用い、仮説「上咽頭癌はリンパ節転移に先立って、所属リンパ節におけるリンパ管新生を促進する」、を検証すること
- 4) リンパ管新生阻害の立場から、上咽頭癌におけるリンパ節転移抑制および転移予防療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- 1) 上咽頭癌組織標本における、EBV 関連因子の発現、およびリンパ管、リンパ管新生因子の同定。さらに臨床背景因子との関連の検討
- 2) 培養細胞系における EBV 関連因子の発現とリンパ管新生因子の発現誘導に関する検討
- 3) 舌癌における所属リンパ節におけるリンパ管新生の同定と、原発巣におけるリンパ管新生因子発現に関する検討を行う。

## 4. 研究成果

上咽頭癌は初診時に高率に既にリンパ節転移を来しており、予後不良の一因となっている。本研究では、上咽頭癌のリンパ節転移にリンパ管新生が関連していると想定し、

まず、上咽頭癌組織標本におけるリンパ管数と N 因子の相関について検討した。その結果、組織内リンパ管数と N 因子の進行が有意に相関していることが判明した。さらに、代表的リンパ管新生因子である血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)-C、および、その受容体である VEGF receptor-3 (VEGFR3) の発現について検討した所、上咽頭癌組織におけるこれらのリンパ管新生因子の発現と N 因子の進行、リンパ管数も有意に相関することが判明した。以上から、上咽頭癌では、腫瘍細胞においてリンパ管新生因子が発現しており、その結果、リンパ管数が増加してリンパ節転移が促進される機構が存在する可能性が示唆された。しかし、上咽頭癌における EBV 潜伏感染の存在、さらには潜在膜蛋白の発現とリンパ管新生因子の発現については、in vivo、in vitro 双方において期待した結果は得られず、EBV 潜伏感染と上咽頭癌のリンパ管新生については有意な結果は得られなかった。

そこで上咽頭癌に限らず、頭頸部癌のリンパ管転移におけるリンパ管新生の役割について検討することにした。舌癌症例について、予防的頸部郭清術後の pN0 リンパ節のリンパ管新生を検討した所、後にリンパ節転移再発を来した症例では pN0 であっても既にリンパ管数が増加していることが判明した。さらに、リンパ節におけるリンパ管数と原発巣におけるリンパ管新生因子 (VEGF-C, D) の発現が有意に相関していることが判明した。以上から、舌癌のリンパ節転移が成立するまでに、所属リンパ節では既にリンパ管新生が起きている可能性が示唆された。

## 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 15 件)

- 1: Aga M, Kondo S, Yamada K, Sawada-Kitamura S, Yagi-Nakanishi S, Endo K, Wakisaka N, Murono S, Kawano M, Yoshizaki T. Warthin's tumor associated with IgG4-related disease. Auris Nasus Larynx. Epub 2012 Dec 12. doi:pii:S0385-8146(12)00229-5. 10. 1016 /j. anl. 2012. 11. 005. 査読有
- 2: Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, Zen Y, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Murono S, Yoshizaki T. Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: Novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett. Epub 2012 Dec 8. doi:pii:S0304-3835(12)00719-7. 10. 1016 /j. canlet. 2012. 12. 002. 査読有

- 3: Endo K, Ueno T, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Ito M, Kataoka K, Kato Y, Yoshizaki T. Tumor-targeted chemotherapy with the nanopolymer-based drug NC-6004 for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. Epub 2012 Dec 6. doi: 10.1111/cas.12079. 査読有
- 4: Murono S, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T. Oncological and functional outcome after transoral 532-nm pulsed potassium-titanyl-phosphate laser surgery for T1a glottic carcinoma. *Lasers Med Sci*. Epub 2012 May 17. doi: 10.1007/s10103-012-1121-4. 査読有
- 5: Hirota K, Wakisaka N, Sawada-Kitamura S, Kondo S, Endo K, Tsuji A, Murono S, Yoshizaki T. Lymphangiogenesis in regional lymph nodes predicts nodal recurrence in pathological N0 squamous cell carcinoma of the tongue. *Histopathology*. 2012 Dec;61(6):1065-71. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04341.x. 査読有
- 6: Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Murono S, Yoshizaki T. Adjuvant chemotherapy with an oral fluoropyrimidine, S-1, following reduced RADPLAT in advanced laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012 Aug;121(8):555-62. 査読有
- 7: Wakisaka N, Hirota K, Kondo S, Sawada-Kitamura S, Endo K, Murono S, Yoshizaki T. Induction of lymphangiogenesis through vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor receptor 3 axis and its correlation with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Aug;48(8):703-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.003. 査読有
- 8: Ito M, Maruyama Y, Murono S, Wakisaka N, Kondo S, Hatano M, Nakanishi S, Miwa T, Yoshizaki T. Efficacy and safety of garenoxacin in the treatment of upper respiratory tract infections. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Oct;39(5):512-8. doi:10.1016/j.anl.2011.09.004. 査読有
- 9: Kondo S, Wakisaka N, Muramatsu M, Zen Y, Endo K, Murono S, Sugimoto H, Yamaoka S, Pagano JS, Yoshizaki T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):11255-64. doi: 10.1128/JVI.00188-11. 査読有
- 10: Yoshizaki T, Ito M, Murono S, Wakisaka N, Kondo S, Endo K. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Apr;39(2):137-44. doi:10.1016/j.anl.2011.02.012. Epub 2011 May 17. 査読有
- 11: Kimura Y, Suzuki D, Tokunaga T, Takabayashi T, Yamada T, Wakisaka N, Yoshizaki T, Murata H, Miwa K, Shoujaku H, Watanabe Y, Yamada N, Ito Y, Yuta A, Takeuchi K, Hosokawa S, Mineta H, Hasegawa Y, Fujimoto Y, Nakashima T, Fujieda S. Epidemiological analysis of nasopharyngeal carcinoma in the central region of Japan during the period from 1996 to 2005. *Auris Nasus Larynx*. 2011 Apr;38(2):244-9. doi:10.1016/j.anl.2010.07.006. 査読有
- 12: Murono S, Nakanishi Y, Inoue D, Ozaki K, Kondo S, Wakisaka N, Matsui O, Yoshizaki T. Pseudoaneurysm of the lingual artery after concurrent intra-arterial chemotherapy with radiotherapy for advanced tongue cancer. *Head Neck*. 2011 Aug;33(8):1230-2. doi: 10.1002/hed.21372. 査読有
- 13: Smith C, Wakisaka N, Crough T, Peet J, Yoshizaki T, Beagley L, Khanna R. Discerning regulation of cis- and trans-presentation of CD8+ T-cell epitopes by EBV-encoded oncogene LMP-1 through self-aggregation. *Blood*. 2009 Jun;113(24):6148-52. doi:10.1182/blood-2009-02-203687. 査読有
- 14: Murono S, Hirota K, Kondo S, Wakisaka N, Furukawa M, Yoshizaki T. An extremely rare case of large Delphian node metastasis preceding primary laryngeal cancer. *Auris Nasus Larynx*. 2009 Oct;36(5):614-7. doi:10.1016/j.anl.2009.01.010. 査読有
- 15: Wakisaka N, Kondo S, Murono S, Minato H, Furukawa M, Yoshizaki T. A solitary fibrous tumor arising in the parapharyngeal space, with MRI and FDG-PET findings. *Auris Nasus Larynx*. 2009 Jun;36(3):367-71. doi:10.1016/j.anl.2008.05.010. 査読有

[図書] (計1件)

- 1: 脇坂尚宏, 吉崎智一, 中山書店 (がんを見逃さない—頭頸部癌診療の最前線) 上咽頭癌, 2012年, 200頁~205頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇坂 尚宏 (WAKISAKA NAOHIRO)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号：70377414

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

吉崎 智一 (YOSHIKAZI TOMOKAZU)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：70262582

室野 重之 (MURONO SHIGEYUKI)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号：20345622

近藤 悟 (KONDO SATORU)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：70436822