

主論文の要約

**Characterization of a novel lymph node metastasis
model from human colonic cancer and its preclinical
use for comparison of anti-metastatic efficacy between
oral S-1 and UFT/LV**

〔 新たな大腸癌リンパ節転移モデルの確立と S-1、UFT/LV による
抗転移効果の比較検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

伊藤 友一

【背景】

大腸癌において、リンパ節転移は最も重要な予後因子である。近年の化学療法や分子標的治療の進歩にも関わらず、リンパ節転移を伴う進行大腸癌の5年生存率は約70%である。遠隔転移と比較し、リンパ節転移は術後早期に生じるため、治療成績の向上のためにはリンパ節転移に対する治療が重視されるべきである。微小転移に対する治療効果が高いことはすでに示されており、リンパ節転移においても同様なことが期待されるが、再現性のある大腸癌リンパ節転移モデルは少ない。

これまでに、いくつかの大腸癌リンパ節転移モデル細胞株が報告されてきており、そのほとんどは同所性モデルである。同所性モデルはより臨床に近いモデルと言えるが、皮下移植などの異所性モデルは非侵襲的、簡便であり、治療効果の評価をし易いという利点もある。

UFT (uracil and tegafur)は5-FUのプロドラッグであり、LV (leucovorin)との併用療法は、5-FUとの併用と同等の治療効果があることが証明されている。従って、UFT/LV療法は本邦におけるStage III大腸癌に対する標準的な術後補助化学療法と認識されている。一方、S-1は5-FU誘導体であり、本邦における各種癌治療に対して広く使用されている。また、UFTよりも治療効果が優れているとされているが、リンパ節転移に対する効果に関してはよく知られていない。

われわれは、大腸癌患者の肝転移巣からCOLM-5という細胞株を樹立した。これは、低分化型腺癌株であり、皮下腫瘍からでさえ、高度のリンパ節転移をきたす細胞株である。この細胞株を用いて大腸癌リンパ節転移のヌードマウスモデルを作成し、S-1とUFT/LVのリンパ節転移抑制効果の比較検討を試みた。

【方法】

7-8週の雄ヌードマウスを使用した。COLM-5にはGFPを遺伝子導入したCOLM5-EGFP株を用いた。対照として、リンパ節転移能の低いCOLM-2細胞株（中分化型腺癌）を用いた。Migration assayはBoyden chamber invasion assayにより行い、腫瘍細胞のMMP-2およびMMP-9活性はgelatin zymographyにより測定した。VEGF-Cはwestern blot法により、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、DPD、TS、TP、OPRTの発現は定量RT-PCR法により測定した。皮下腫瘍および鼠径リンパ節転移組織に対する免疫染色は、P53、MLH-1、MSH-2、VEGF-C、DPD、TSに対する特異抗体を用いて間接酵素抗体法により行った。

また、COLM-5を左側腹部に皮下注射して皮下腫瘍モデルを作成し、静脈、腹腔内注射により、肺転移、腹膜播種モデルをそれぞれ作成した。皮下注射から2週間後を微小転移ステージ、4週間後を肉眼転移ステージとし、S-1、UFT/LVを5週間経口投与した。

最終投与から1週間後にマウスをと殺し、転移抑制効果は鼠径リンパ節のH&E染色と腫瘍体積によって評価した。

【結果】

COLM-5 細胞株の特徴

COLM-5 の皮下腫瘍を免疫染色すると、P53、MLH-1、MSH-2 が核染色され (Fig. 1a)、microsatellite stable (MSS) phenotype であると考えられた。COLM-5 は COLM-2 と比較し、有意に fibronectin に対する高い遊走能を認めた (Fig. 1b)。同様に、MMP-9 と MMP-2 活性の上昇を認めた (Fig. 1c)。また、VEGF-C の RNA 発現増加も認め (Fig. 1d)、これはタンパクレベルでも細胞質において発現の増加を確認できた (Fig. 1e)。

ヌードマウスにおける COLM-5 細胞株のリンパ節転移能

COLM-5 は、リンパ節・肺・腹膜転移を、それぞれ 89%・75%・100% に認め、一方、COLM-2 は、それぞれ 11%・0%・38% と低率であった (Table 1)。COLM-5 は容易に鼠径、腋窩リンパ節に転移を来し (Fig. 2a)、GFP の蛍光観察により、接種後 2-3 週で鼠径部の微小リンパ節転移を、1-2 ヶ月で肉眼的リンパ節転移 (Fig. 2b, 2c) を、さらに 2-3 ヶ月後には腋窩リンパ節転移を認めた。微小リンパ管造影では、腫瘍周囲には拡張したリンパ管の増生を認め (Fig. 2d)、免疫染色で、podoplanin 陽性のリンパ管を確認した (Fig. 2e)。さらに、腫瘍周囲へのリンパ管浸潤も、接種 2 ヶ月後に H&E 染色で観察された (Fig. 2f)。

S-1、UFT/LV による抗腫瘍効果およびリンパ節転移抑制効果

微小転移モデル (早期投与群) と肉眼転移モデル (後期投与群) において、薬剤による効果を検証した (Fig. 3a, 3b)。微小転移モデルにおいて、原発巣に対する S-1 の効果は UFT/LV と同等であるのに対し (Fig. 4a)、リンパ節転移抑制効果においては、S-1 は UFT/LV と比較してより高い効果を認めた (Fig. 5a, 5c)。また、S-1 は腫瘍周囲のリンパ管塞栓においてアポトーシスを誘導しており、線維化により置換されている部分も認めた (Fig. 4c)。一方、肉眼転移モデルでは、抗腫瘍効果、リンパ節転移抑制効果は、両薬剤において有意な差を認めなかった (Fig. 4b, Fig. 5b, 5d)。

5-FU 代謝酵素の発現

COLM-5 は COLM-2 と比較し、100 倍以上の DPD 発現を示したのに対し、TS と OPRT に関しては、差は軽度であった (Fig. 6a)。さらに、免疫染色でも同様の結果であった (Fig. 6b)。逆に、COLM-5 における TS 発現は COLM-2 と同様に低かった。S-1、UFT/LV による DPD 発現の変化は認められなかった。

【考察】

われわれが確立した大腸癌リンパ節転移モデルは、以下の利点があると考えられる。
①リンパ節転移率が約 90% と高く、再現性がある。
②腹膜播種を作らないため、より正確である。
③非侵襲的、簡便であり、腫瘍の切除により補助化学療法の検証も可能である。
④微小転移モデルとして利用でき、GFP により in vivo imaging も可能である。

COLM-5 細胞株は低分化型腺癌株であり、MLH-1/MSH-2 陽性、急速発育、転移能が高いという特徴がある。これは欧米の低分化型大腸癌の特性と異なっており、VEGF-C

を高発現し、腫瘍周囲にリンパ管増生を来し、高いリンパ節転移能を示す。また、MMP-2/MMP-9 活性が高く、高い遊走能を認める。

本研究では、原発巣に対しては S-1 と UFT/LV は同等の抗腫瘍効果であったが、治療が微小転移のレベルで開始された場合には、S-1 のリンパ節転移抑制効果は UFT/LV と比較して高い傾向を認めた。さらに、「complete regression」である腫瘍細胞の消失と線維化による置換は、S-1 治療群で多く認めた。この結果は、COLM-5 リンパ節転移においては、S-1 がより治療効果が高いことを示している。従って、大腸癌患者におけるリンパ節転移再発の抑制には、S-1 が有用であることを示唆している。

COLM-5 は高い DPD 活性を有していたが、TS/OPRT に関しては低値であった。この意味でも、高い DPD 阻害作用を有する S-1 はリンパ節転移の抑制に有用と考えられる。胃癌では、低分化型腫瘍で高-中分化型腫瘍と比較して DPD 活性が高いことが報告されている。多くの大腸癌は高-中分化型腫瘍であることより、DPD 活性が低いと言われている。このことは、S-1 が COLM-5 のような高い DPD 活性を有する低分化型腫瘍に対して有効であることを示唆している。

【結語】

われわれは有用な大腸癌リンパ節転移モデルを確立し、S-1 の高いリンパ節転移抑制効果を証明した。この結果は、高い DPD 活性を有する低分化型大腸癌において、補助化学療法としての S-1 が、術後リンパ節再発を抑制する効果を示す根拠となると考えられた。