

乳癌におけるリンパ血管擬態の存在と 乳癌 stem cell 治療の可能性

白川 一男、吉本 賢隆、林原 紀明、
辻 英一、金内 一、小川 利久、上西 紀夫

東京大学 代謝栄養内分泌外科学講座

1. はじめに

われわれは炎症性乳癌 (IBC) において特異な高率のリンパ行性転移と悪性度に注目し、マウス移植モデルを作成し、血管内皮細胞 (EC) の存在なく、癌細胞に直接取り囲まれた腫瘍内血管・血流を同定し、血管擬態 (VM) と称して報告してきた (*Cancer Res.* 61 445-51, *Cancer Res.* 62 560-6, *Cancer Res.* 62 860-6, *Breast Cancer Res.* 5 136-9)。今回、VM についてリンパ血管擬態 (LVM) と再定義し、発現の検討と共に、IBC39症例、非 IBC335症例の手術施行例についてリンパ管新生関連遺伝子、血管新生関連遺伝子について解析した。LVM とは、癌巢内でリンパ管、腫瘍血管がそれらの構成細胞の存在なく癌細胞に被覆された状態でリンパ流、血流を認めることと定義した。

Translational research として VM 提示乳癌細胞は血行性・リンパ行性再発率が高く、5 年生存率が低いことを報告し、基礎研究として同細胞内における autocrine VEGF-Flt-1 pathway に注目して、同 signal block による抗腫瘍効果と新規分子標的薬の可能性について報告してきた (*Br J. Cancer.* 87 1454-61, *Int J. Cancer.* 99 821-8, *Int J. Cancer.* 99 344-51)。今回は、乳癌細胞膜上のリン酸化 (p) Flt-1 の発現証明と、Flt-1 自己リン酸化の可能性について検討し、さらには、乳癌 stem cell 治療の可能性について言及する。

2. 方法

(1) 免疫組織染色 (IHC) 法による乳癌細胞のリンパ管・血管新生関連分子発現検討

IBC39症例、非 IBC335症例の手術施行例について HE, Elastica-vanGieson 染色にて LVM の存在を仮確認後、LVM 症例とコントロール症例について、VEGF-A, Flt-1, pFlt-1, VEGF-D, Flt-4, KDR, Angiopoietin-1,

Tie-2, CD34, c-kit 分子を標的として免疫組織染色を施行した。Flt-1, CD34, c-kit は LVM marker のみならず、乳癌 stem cell の marker と仮定した。

(2) RT-PCR followed by laser-captured microdissection (LCM) 法による乳癌細胞におけるリンパ管・血管新生関連分子発現検討

LVM 症例とコントロール症例について乳癌細胞を LCM の後、VEGF-A, Flt-1, KDR, VEGF-D, Flt-4, Angiopoietin-1, -2, Tie-2, CD34, c-kit 分子を標的として RT-nestedPCR を行い、発現の有無・程度を検討した。

3. 結果

(1) IHC 法による乳癌細胞のリンパ管・血管新生関連分子発現検討

HE, Elastica-vanGieson 染色にて IBC 切除症例の 23% (9/39)、non-IBC 症例の 6.9% (23/335) に LVM の存在を確認した。LVM32症例とコントロールとしての non-LVM (内訳: IBC10症例、non-IBC10症例) を対象として VEGF-A, Flt-1, pFlt-1, VEGF-D, Flt-4, KDR, Angiopoietin-1, Tie-2, CD34, c-kit 分子の IHC を施行した。

LVM 構成乳癌細胞は VEGF-A 強陽性 100% (32/32)、Flt-1 陽性 78% (25/32)、pFlt-1 陽性 78% (25/32)、KDR 陽性 9% (3/32)、Tie2 陽性 72% (23/32)、Flt-4 陽性 75% (24/32)、CD34 陽性 56% (18/32)、c-kit 陽性 56% (18/32) であった。コントロールは VEGF-A 強陽性 15% (3/20)、Flt-1 陽性 10% (2/20)、pFlt-1 陽性 0% (0/20)、KDR 陽性 5% (1/20)、Tie2 陽性 10% (2/20)、Flt-4 陽性 5% (1/20)、CD34 陽性 10% (2/20)、c-kit 陽性 10% (2/20) であった (Table 1)。

LVM 提示乳癌細胞において VEGF-A, Flt-1, pFlt-1,

Table 1. Vasculogenic molecule expressions by immunohistochemical analys

	VEGF-A*	Flt-1*	pFlt-1*	KDR	Tie-2*	Flt-4*	CD34*	c-kit*
LVM cells	32/32	25/32	25/32	3/32	23/32	24/32	18/32	18/32
%	100	78	78	9	72	75	56	56
Non LVM cells	3/20	2/20	0/20	1/20	2/20	1/20	2/20	2/20
%	15	10	0	5	10	5	10	10

(*; <0.05 by paired T-test)

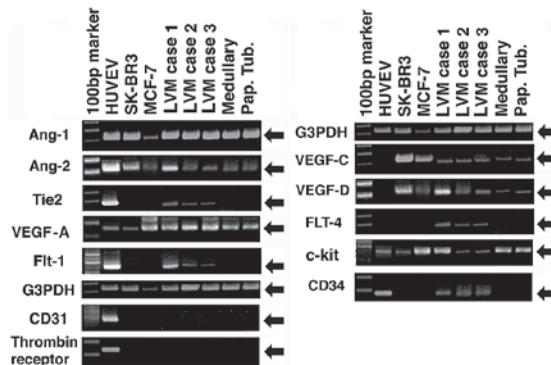


Figure 1. Vasculogenic gene expressions of microdissected LVM cells

Flt-4, Tie-2, CD34, c-kit 分子の発現頻度は有意であった。VEGF-D、Angiopoietin-1については、すべての検体、positive control において染色を認めなかった。

(2) RT-PCR followed by LCM 法による乳癌細胞におけるリンパ管・血管新生関連分子発現検討

IHCを施行したLVM32症例とコントロール (non-LVMのうちIBC10症例、non-IBC10症例) を対象として乳癌細胞をLCMの後、*VEGF-A*, *Flt-1*, *KDR*, *VEGF-D*, *Flt-4*, *Angiopoietin-1, -2*, *Tie-2*, *CD34*, *c-kit* 分子を標的としてRT-nestedPCRを行い、発現の有無・程度を検討した。

LVM 構成乳癌細胞は *Flt-1*陽性84% (27/32)、*KDR*陽性22% (7/32)、*Tie2*陽性78% (25/32)、*Flt-4*陽性84% (27/32)、*CD34*陽性78% (25/32)、*c-kit* 陽性59% (19/32) であった。コントロールは *Flt-1*陽性5% (1/20)、*KDR*陽性10% (2/20)、*Tie2*陽性10% (2/20)、*Flt-4*陽性0% (0/20)、*CD34*陽性10% (2/20)、*c-kit* 陽性15% (03/20) であった。LVM 提示乳癌細胞において *Flt-1*, *Flt-4*, *Tie-2*, *CD34*, *c-kit* 分子の発現頻度は有意であった (Figure 1)。

VEGF-A, -D, *Angiopoietin-1, -2*の発現は全検体に認め、LVM 構成乳癌細胞はコントロールと比較して *VEGF-A*, *VEGF-D*, *Angiopoietin-2*の産生亢進が有意に

示された。

4. 考察

これまで報告してきたVMについての報告内容は、Flt-1, Tie-2, CD34, c-kit など乳癌 stem cell の概念と重なる分子が多く、おそらく、乳癌細胞分化過程で非常に未分化な段階で発癌に至った症例群であると考えられる。腫瘍内微小環境から考えるとVM 提示乳癌細胞に高率に認められるFlt-1の発現とそのリン酸化は、乳癌細胞におけるFlt-1分子の自己リン酸化の可能性が高いと推測されるが、同 pathway は血管内皮・リンパ管前駆細胞群では認められる。その形態が病理学的に特徴的なVMとして表現されたのではないかと考えている。これまで、臨床学的に炎症性乳癌と診断されてきた症例群は stem cell に近い分化段階で発癌の on set がなされたため、リンパ管、血管に非常に近い分子群を発現し、その親和性から高率のリンパ行性・血行性転移がなされた一重型ではないかと考えている。今後は、乳癌細胞に発現する pFlt-1および、恐らく存在するであろう pTie-2を full sequence することで、signal block を目的とした新規小分子化合物の作製や、molecular imaging を目的とした新規造影剤の作製を目指したい。