

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09589

研究課題名(和文)リンパ脈管筋腫症におけるリンパ管内皮間葉転換の病態関与の証明

研究課題名(英文) Investigation on the endothelial-mesenchymal transition in lymphangioliomyomatosis

研究代表者

瀬山 邦明 (Seyama, Kuniaki)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：10226681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ脈管筋腫症(lymphangioliomyomatosis; LAM)患者の肺組織からLAM細胞、リンパ管内皮細胞(LAM-LEC)を分離・培養し、正常肺組織から分離したLEC(N-LEC)との細胞生物学的特性を解析した。また、*in vitro*培養系でリンパ管内皮間葉転換(L-EndoMT)がLAM-LECに起こりうるか、N-LECと比較検討した。培養条件やLAM病態に関わる刺激因子を添加して検討したが明らかなL-EndoMTは誘導できなかった。LAM-LECは増殖能、遊走能が亢進し、VEGFR-3発現増加、LYVE-1発現低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAM病巣は、病理組織学的にはLAM細胞とリンパ管内皮細胞(LEC)の増殖により特徴付けられるが、LAM病巣中のLECには疾患に応じた機能的変化(フェノタイプの変化)を認めた。従って癌細胞と癌関連線維芽細胞との関係に類似した病態があり、両細胞の機能連関が病態形成や疾患進行に意義を持つことが示唆される。両者の機能連関のメカニズムを解明することは新規治療戦略の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Since two types of LAM cells, cells with TSC2 mutations and those with wild-type TSC2, are known to exist in LAM lesions, we hypothesized that LAM cells with wild-type TSC2 might be derived from LAM-associated lymphatic endothelial cells (LAM-LEC) through endothelial-mesenchymal transition (EndoMT). To elucidate the pathobiology of LAM with special reference to the cell-cell interaction between LAM cells and LAM-LEC, we isolated LAM-LEC using flow cytometry-based method from explanted LAM lungs and resected LAM lung tissues by surgery. We investigated whether EndoMT can be induced in LAM-LEC by adding VEGF-D, TGF-beta, GPNMB, or fibronectin *in vitro* culture system, but no EndoMT occurred. On the other hand, LAM-LEC showed distinct characteristics as compared normal lung LEC, suggesting phenotypic changes through interaction with LAM cells; LAM-LEC showed increased proliferation and migration with increased VEGFR-3 as compared with those of normal lung LEC.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：リンパ脈管筋腫症 リンパ管内皮細胞 内皮間葉転換 内皮細胞増殖因子 TSC遺伝子 リンパ管新生フローサイトメトリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ脈管筋腫症 lymphangioliomyomatosis (LAM) は、異常な平滑筋様細胞 (LAM 細胞) が肺、体軸リンパ系で増殖して病変を形成し、病変内にリンパ管新生を伴う腫瘍性疾患である。肺には多発の嚢胞が形成され、気胸、呼吸困難などの呼吸器症状で発症し、重症例では呼吸不全に至り肺移植を必要とする。生殖可能年齢の女性に発症し、その発症頻度は約 1.9~4.5 人/100 万人と少数であるが、日本の脳死肺移植施行例の基礎疾患として最も多く、その病因・病態の解明・新規治療法の開発は重要な課題である。

2000 年代、孤発性 LAM 患者の病変部 LAM 細胞から、結節性硬化症の原因遺伝子で腫瘍抑制遺伝子として機能する *TSC2* 遺伝子異常が検出され、LAM 細胞は mTOR シグナル伝達系の過剰な活性化により腫瘍性増殖を来す可能性が報告された (Goncharova EA, et al. J Biol Chem. 2002; 277: 30958)。病態解明の進歩により mTOR 阻害剤であるラパマイシンが LAM の分子標的薬として期待され、臨床試験により有用性や安全性が証明された (McCormack FX, et al. N Engl J Med 2011; 364: 1595)。しかし、mTOR 阻害剤は LAM 細胞に対して静細胞的であるため治癒をもたらす薬剤ではなく、内服中止とともに効果が失われることも明らかとなり、さらなる病態解明や治療標的の開発が必要とされている。

最近、LAM 病巣中の LAM 細胞を顕微鏡下に microdissection し次世代シーケンサー (NGS) で *TSC2* 遺伝子異常を検討したところ、LAM 病巣での変異 *TSC2* アレル頻度は平均で 20% 程度と少ないことが明らかとなった (Badri et al. AJRCCM 2013; 187: 663)。申請者自身も横浜市大遺伝学講座との共同研究により同様の結果を確認している (Fujita A et al. Hum Genet. 2016;135:61-8)。また、病理組織学的検討からも LAM 病巣には、形態学的には LAM 細胞と区別できないが、線維芽細胞マーカーを発現する野生型間葉系細胞を多数含んでいること、*TSC2*^{-/-} の LAM 細胞と間葉系細胞がケモカイン (CXCL12) とその受容体 (CXCR4) を介して LAM 病巣を形成する可能性が報告された (Clements D et al. PLoS One 2015; 10: e0126025)。しかし、野生型間葉系細胞の由来は何か、は不明である。LAM 病巣構成細胞に関するこれらの知見は、癌研究領域における癌幹細胞や癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts; CAF) の研究成果に類似している。すなわち、CAF の由来は、もともと存在する線維芽細胞の増殖、骨髄からの動員、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) あるいは内皮間葉転換 (endothelial-mesenchymal transition; EndoMT) による細胞形質転換、3 つが考えられているが、近年では様々な増殖因子やサイトカインにより誘導される が重要視されている。

申請者は、最近、LAM 患者の肺移植時に摘出された肺組織から、LAM 細胞、間葉系細胞、リンパ管内皮細胞 (LEC)、等の LAM 病巣構成細胞を分離し培養することに成功した (Ando K et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016;310:L899-908)。さらに、LAM 肺の LEC (以下、LAM-LEC) は健常肺 LEC (以下、N-LEC) と比較して VEGF-D を強く発現しオートクライン的に増殖する可能性が示唆された。一方、ヒト皮膚 LEC を内皮細胞培地 (EBM-2) を用いて低酸素下に培養を継続すると線維芽細胞様の形態へ変化し、 α -smooth muscle actin や desmin の発現が上昇する一方、podoplanin、VEGFR-3 の発現が低下すること、等の事象が確認された (unpublished data)。これら予備実験の結果から、LEC は、特定の条件下でリンパ管内皮間葉転換 (lymphatic-endothelial mesenchymal transition: L-EndoMT) を起こし、間葉系細胞へ形質転換する可能性を考えた。実際、血管内皮細胞を用いた研究では、血管内皮増殖因子 (VEGF-A) を添加し特定の条件下に培養することで EndoMT が生じると報告されている (Ning Q et al. PLoS One e65217, 2013; Zhang W et al. Br J Pharma 170; 1210-20, 2013)。すなわち、申請者の観察事項と他研究報告からは、LAM-LEC が L-EndoMT を生じ LAM 病巣の形成に関与している可能性、LAM 病態に関与する増殖因子やサイトカインが L-EndoMT を誘導している可能性が想起される。

LAM 病巣の形成に L-EndoMT が関与する可能性は、LAM に関する既報からも推測できる。LAM 病巣には間質結合型 TGF- β が豊富に存在することが報告されているが (Evans SE et al. Chest 2004; 125: 1063) TGF- β は上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) とともに EndoMT を誘導する重要なサイトカインとして知られている。さらに、LAM 細胞と野生型間葉系細胞の相互作用に重要な CXCL12-CXCR4 系は、回腸カルチノイドでは低酸素環境下で EndoMT を誘導すること (Arvidsson Y et al. Endocrine-related cancer 2010; 17: 303) VEGF-C (VEGF-D とともに、代表的なリンパ管内皮細胞増殖因子の一つ) 刺激下に LEC の CXCR4 発現が亢進し、VEGF-C/VEGFR-3 シグナル経路と異なる経路を介してリンパ管新生を誘導すること、等が報告されている。LAM では、血清や乳び液中の VEGF-D が高値 (Seyama K et al. Lymphat Res Biol 2006; 4: 143) 血清 VEGF-D 値は疾患重症度や治療効果のバイオマーカーとなる可能性 (Young L, et al. Lancet Respir Med 2013; 1: 445)、等が報告され、“LAM は VEGF-D

関連疾患”と指摘されるほど重要な機能分子であるが (Seyama K et al. Lymphat Res Biol 2010; 8: 21) その産生・分泌の機序は未解明のままである。L-EndoMT に関与する可能性も示唆されるため、LAM 細胞や LAM-LEC が VEGF-D を産生する機序は重要な検討課題である。

2. 研究の目的

LAM 病巣の病理学的特徴である豊富なリンパ管と患者血清中に増加するリンパ管内皮増殖因子 (VEGF-D) に着目し、野生型間葉系細胞はリンパ管内皮細胞から間葉系細胞への形質転換 (リンパ管内皮間葉転換; L-EndoMT) により生じて LAM 病巣を形成する、という仮説を立てた。すなわち、LAM 細胞が分泌する VEGF-D の豊富な環境で刺激されて増殖する LAM-LEC は、通常の肺 LEC (N-LEC とする) と異なる phenotype に変化し、L-EndoMT を起こしている可能性を考えた。そこで、1) N-LEC、LAM-LEC での VEGF-D 産生の有無、2) LAM 病巣形成に L-EndoMT が関与すること、3) L-EndoMT には VEGF-D、TGF- β 、CXCL12-CXCR4 系、mTOR シグナル伝達系が密接に関与すること、を明らかにし、未知の病態解明と新規治療標的の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) FACS sorting による LEC、間葉系細胞、LAM 細胞の分離・培養

肺移植や気胸手術時に LAM 患者から摘出された肺組織、及び、対照者肺組織 (肺癌患者から摘出された肺の非癌部) をそれぞれ、蛋白分解酵素で消化して細胞浮遊液を調整する。その後、CD45、CD34、CD90、EpCAM、podoplanin に対する抗体を用いて、BD FACS AriaII cell sorter により、EpCAM 陰性 podoplanin 陽性 (EpCAM - /podoplanin +) の LEC、EpCAM - /podoplanin - /CD34 + の間葉系細胞、EpCAM - /podoplanin - /CD34 - /CD90 + の LAM 細胞、を分離する。分離後の LEC、間葉系細胞、LAM 細胞は、内皮細胞培養液 (Endothelial Basal Medium; EBM-2)、DMEM、平滑筋細胞培養液 (Smooth muscle basal medium; SmBM) をそれぞれ用いて培養し、凍結保存する。

(2) *in vitro* 培養系における LEC の L-EndoMT の証明と培養条件の確立

LAM-LEC、N-LEC、皮膚組織由来 LEC (S-LEC) を用いて L-EndoMT が誘導される条件を検討する。培養液 (内皮細胞用の EBM-2 vs. 平滑筋細胞用の SmBM)、酸素濃度 (5% の低酸素 vs. 21% の通常酸素濃度)、および、増殖因子や刺激物質 (VEGF-D、TGF- β 、fibronectin、GPNMB など) の添加等の条件を検討する。L-EndoMT の評価は、細胞形態変化、 α -smooth muscle actin (α -SMA)、vimentin、VEGFR-3、LYVE-1 等の発現を検討した。

(3) LAM-LEC の細胞生物学的特徴の検討

LAM-LEC、N-LEC、S-LEC について増殖能、遊走能、増殖因子に対する反応性、機能タンパク質や表面マーカーの発現を検討する。さらに、LAM-LEC、N-LEC については網羅的遺伝子発現アレイ解析を行い、フェノタイプの変化をより詳細に比較検討する。

(4) LAM-LEC、LAM 細胞の hTERT 導入による不死化細胞株樹立の試み

ヒト初代培養細胞を市販の hTERT 導入キットを用いて細胞株化することを試みる。

4. 研究成果

(1) 肺組織からリンパ管内皮細胞 (LEC) の分離と初代培養系の再構築

肺組織から肺構成細胞をフローサイトメトリー (FACS) を用いて分離、その後初代培養を行う系は、Fujino らの方法に準じ申請者の研究グループでも確立済みであったが、LEC を組織から分離し後、なかなか LEC が *in vitro* 培養系で増殖せず、実験に用いることができない事態が続いた。a) もともと肺組織中の LEC は肺胞上皮細胞、気道上皮細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞などと比べて少数であること、b) 蛋白分解酵素による肺組織の消化、抗体による表面マーカーへの刺激、レーザー光による損傷、等の要因で *in vitro* 培養系に到達するまでに LEC がかなりダメージを受けていること、等が原因と考え、FACS による分離法を改良した。すなわち、肺組織を蛋白分解酵素で消化し細胞浮遊液を調整し、CD45 + 血球系細胞を除去し、ついで CD31 + 陽性細胞のみを CD31 抗体でラベルした磁気ビーズを用いて回収し、この時点で *in vitro* 培養系に持ち込み、操作関連ダメージを早めに回復させ増殖フェーズにのせることを考えた。CD31 + 陽性細胞は血管内皮細胞 (VEC) とリンパ管内皮細胞 (LEC) を含む細胞分画

であり、*in vitro* 培養系で順調に増殖している時期にハーベストし、podoplanin⁺/CD31⁺陽性細胞を FACS でソートして回収し、LEC を純化した。得られた podoplanin⁺/CD31⁺陽性細胞は培養系で cobblestone 様形態を呈して増殖し、LEC の特異的マーカーである prox-1 陽性、LYVE-1 陽性を確認し、類似する細胞形態を呈する中皮細胞マーカー (CK5/6 や calretinin) は陰性であることを確認し、LEC であると結論した。

(2) リンパ管内皮細胞間葉転換 (L-EndoMT) の検討

皮膚微小血管リンパ管内皮細胞 (S-LEC)、LAM 肺から分離したリンパ管内皮細胞 (LAM-LEC)、肺癌患者の非癌部肺組織から分離した対照リンパ管内皮細胞 (N-LEC) に対し、一般に内皮間葉転換を誘導するサイトカインとして TGF- β を添加し、L-EndoMT が起こるか検討した。TGF- β 添加後には細胞形態に軽度の変化は認められたが、 α -SMA、vimentin、VEGFR-3、LYVE-1 等を指標に条件検討したが、EndoMT は認めなかった。一方、TNF- α を用いるとより顕著な形態変化とともに、 α -SMA、vimentin の発現増加、VEGFR-3、LYVE-1 の発現減少があり EndoMT を示唆するデータが得られた。しかし、TNF- α は proinflammatory cytokine であり、炎症所見のない LAM 病態とは関連性のないサイトカインであるため適切な実験系ではないと判断した。次いで S-LEC、LAM-LEC、N-LEC について、LAM 細胞から分泌されるタンパク質として GPNMB や fibronectin で L-EndoMT が誘導されるかを検討したが、明らかな変化は 3 種類の LEC で認めなかった。VEGF-D 添加、各増殖因子や機能タンパク質を組合わせた共刺激、培養液の変更等も試みたが、明らかな形態変化を伴うような L-EndoMT を誘導できなかった。

(3) LAM-LEC の細胞生物学的特徴の検討

肺移植を受けた重症 LAM 患者の肺組織から分離した LAM-LEC (以下、LAM-LEC(T))、LAM の診断目的に生検した肺組織の一部から分離した LAM-LEC (以下、LAM-LEC(V))、N-LEC (対照 LEC) との細胞生物学的違いを検討した。

まず、通常の *in vitro* 培養系で増殖能について検討したところ、LAM-LEC(T)は LAM-LEC(V)、N-LEC に比して増殖能が約 2 倍亢進していた。次に培養系について 3 種類の増殖因子刺激 (VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D) や GPNMB に対する増殖反応特性を比較検討した。増殖因子の中では VEGF-A が顕著に増殖を刺激したが、VEGF-C と VEGF-D の増殖刺激は非常に弱かった。また、ベースライン (無刺激状態) からの反応性に各 LEC 間での有意差はなかった。さらに、3 種類の増殖因子の組み合わせによる増殖刺激の検討も行ったが、基本的に VEGF-A による増殖刺激に付加的な効果は認めなかった。

次に遊走能を検討したところ、無刺激のベースラインの培養条件でも LAM-LEC(T)では N-LEC に比べて遊走能が約 1.5 倍亢進していた。3 種類の増殖因子刺激 (VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D) を添加して遊走能を評価したところ、VEGF-C > VEGF-D > VEGF-A の順に LEC の遊走能を亢進したがベースライン (無刺激状態) からの反応性に有意差はなかった。

LAM-LEC(T) (n = 4) と N-LEC (n = 2) で遺伝子発現アレイ解析を行った。遺伝子発現レベルが N-LEC に対して 2 倍以上変化している遺伝子は増加 366 遺伝子 / 減少 378 遺伝子認め、遺伝子オンロジー解析では cell migration に関する遺伝子群での変化がもっとも顕著であった (LAM-LEC で発現亢進 47 遺伝子 / 減少 33 遺伝子)。一方、VEGF-D、TGF- β 、CXCL12、CXCR4、mTOR シグナル系の遺伝子発現において LAM-LEC と N-LEC に差を認めなかった。網羅的発現解析の結果、および既知の LEC の細胞機能上重要なタンパク質から候補を絞って real-time PCR あるいは FACS にて発現レベルを検討したところ、CD31、podoplanin、VEGFR-2、Prox-1 の発現に LAM-LEC と N-LEC 間に有意差はなかった。一方、VEGFR-3 の発現が LAM-LEC では 2 倍以上に増加し、LYVE-1 発現が約 1/3 程度に低下していた。

(4) リンパ管内皮細胞の hTERT 遺伝子導入による不死化

LAM 細胞や LAM 病巣中の LEC を安定して研究に使用できるよう、生理的条件により近い状況で不死化細胞株を樹立することが重要と考え、hTERT 遺伝子導入による細胞数樹立をめざし、遺伝子導入用ウイルスを作成した。肺組織から分離した間葉系細胞でまず検討したが、細胞株樹立には至らなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Shoji T, Konno S, Niida Y, Ogi T, Suzuki M, Shimizu K, Hida Y, Kaga K, Seyama K, Naka T, Matsuno Y,

Nishimura M. Familial multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia with a novel splicing mutation in TSC1: Three cases in one family. PLoS One. 2019;14:e0212370.

Kato M, Kanehiro Y, Yoshimi K, Kodama Y, Sekiya M, Sato T, Takahashi K, Seyama K; Multicenter Lymphangiomyomatosis Sirolimus Trial for Safety Study Group. COPD assessment test as a possible tool for evaluating health-related quality of life in lymphangiomyomatosis. Respir Investig. 2018;56:480-488.

Kobayashi K, Miki Y, Saito R, Adachi K, Seyama K, Okada Y, Sasano H. Roles of human epidermal growth factor receptor family in pulmonary lymphangiomyomatosis. Hum Pathol. 2018;81:121-130.

Oishi H, Watanabe T, Matsuda Y, Noda M, Ejima Y, Saiki Y, Seyama K, Kondo T, Okada Y. Single lung transplantation for lymphangiomyomatosis: a single-center experience in Japan. Surg Today. 2018;48:944-950.

Tobino K, Hirai T, Johkoh T, Fujimoto K, Kawaguchi A, Tomiyama N, Takahashi K, Seyama K. Difference of the progression of pulmonary cysts assessed by computed tomography among COPD, lymphangiomyomatosis, and Birt-Hogg-Dubé syndrome. PLoS One. 2017;12:e0188771.

Kurihara M, Mizobuchi T, Kataoka H, Sato T, Kumasaka T, Ebana H, Yamanaka S, Endo R, Miyahashira S, Shinya N, Seyama K. A Total Pleural Covering for Lymphangiomyomatosis Prevents Pneumothorax Recurrence. PLoS One. 2016;11:e0163637.

〔学会発表〕(計11件)

瀬山邦明 LAMの病態解明から日本におけるLAM診療. 第59回日本呼吸器学会学術講演会. 2019年4月 東京.

岡本 翔一, 村木 慶子, 長岡 鉄太郎, 林 大久生, 植草 利公, 西野 宏一, 関本 康人, 瀬山 邦明, 高橋 和久. リンパ脈管筋腫症に対する経気管支肺生検診断の検討. 第21回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会総会. 2017年9月 久留米.

関本 康人, 鈴木 一廣, 林 大久生, 西野 宏一, 江花 弘基, 三谷 恵子, 栗原 正利, 熊坂 利夫, 瀬山 邦明, 高橋 和久. 非典型的なCT画像を呈したリンパ脈管筋腫症. 第57回日本呼吸器学会学術講演会. 2017年4月 東京.

神 幸希, 朝川 勝明, 高田 俊範, 飛野 和則, 瀬山 邦明, 平井 豊博, 高橋 和久. CT画像解析を用いた、リンパ脈管筋腫症(LAM)におけるシロリムスの効果の検討. 第57回日本呼吸器学会学術講演会. 2017年4月 東京.

瀬山 邦明. リンパ脈管筋腫症に対するシロリムス治療. 第57回日本呼吸器学会学術講演会. 2017年4月 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。