

平成21年 3 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590406
 研究課題名（和文） リンパ脈管筋腫症細胞集塊における細胞接着機構の解明とその治療戦略への応用
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism for cell adhesion between LAM cells and lymphatic endothelial cells in the LAM cell clusters
 研究代表者
 熊坂 利夫（KUMASAKA TOSHIO）
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号：00286709

研究成果の概要：

転移する良性腫瘍である平滑筋腫様細胞であるリンパ脈管筋腫症（LAM と略す）細胞はリンパ管新生能を有するため、自ら新生したリンパ管により腫瘍結節がリンパ管内皮細胞に覆われたまま細片化され、リンパ管腔ならびに体腔内に放出される。本研究では患者 LAM 細胞集塊（LCC と略す）には特異的な細胞接着分子や細胞外マトリックスの発現が見られ、人工的に作製された LCC 様細胞集塊にもその一部の細胞外マトリックスが発現していた。人工 LCC は今後の LAM の研究に重要なツールとなる可能性がある。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：リンパ脈管筋腫症、リンパ脈管筋腫症細胞集塊、リンパ増殖因子、リンパ内皮細胞、細胞接着分子、細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

リンパ脈管筋腫症 (Lymphangiomyomatosis, LAM) は、肺・体軸リンパ節群における平滑筋様細胞 (LAM 細胞) の増殖と肺の嚢胞化・反復性気胸・乳び体腔液貯留を特徴とし、肺組織の破壊に伴う進行性の肺機能障害による呼吸不全がしばしば致命的となる生殖可能年齢の女性に発症するまれな疾患である (有病率人口 100 万対 3-6 人)。この疾患は腫瘍抑制遺伝子 TSC (Tuberous sclerosis

complex) の異常により発症し、結節性硬化症に合併する TSC-LAM と孤発性 LAM がある。TSC-LAM は脳、腎、心、皮膚などに多発性過誤腫症 (良性腫瘍) を合併する。TSC 関連良性腫瘍群はその組織学的な特徴として豊富な血管新生を伴うことが知られている。TSC 関連良性腫瘍群のひとつであるリンパ脈管筋腫症は名前の通り血管よりリンパ管に親和性があり、かつ良性腫瘍でありながらリンパ節・肺を系統的に侵す他に類を見ない特異な

疾患である。

2. 研究の目的

本研究はリンパ脈管筋腫症細胞集塊 (Lymphangioliomyomatosis cell cluster: LCC) の形成と分裂に関与する因子を明らかにするために、以下の3点について検討する:

- 1) LCCにおけるLAM細胞ーリンパ内皮細胞相互に関与する接着分子
- 2) LCCにおける接着分子の発現を制御する因子
- 3) LAM細胞・リンパ内皮細胞によるLCC再構成およびLCC分裂における細胞外マトリックスの発現および分解とその決定因子を検討する。

3. 研究の方法

1) LAM患者体腔液中LCCの検討

本施設ならびに全国協力施設のLAM患者13症例から採取された体腔液(胸水8検体、腹水8検体、心嚢液1検体、計17検体)について検討した。体腔液は遠心し10 μ lづつスライドグラスにスメアを引き、100%エタノール中10分間固定後、できる限りLCCの個数、大きさを測定した。また、体腔液沈渣からセルブロックを作製した。これらの検体を用い以下の免疫染色および電子顕微鏡的検索を施行した。

①メラノーマ関連抗原

HMB45, Melan-A, PNL-2, CD63, Microphthalmia transcription factor (Mitf)

②筋系抗原

α -smooth muscle actin (α SMA), Desmin

③リンパ内皮細胞特異抗原

Vascular endothelial growth factor (VEGFR)-3, Podoplanin, Prox-1

④女性ホルモンレセプター

Estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR)

⑤電子顕微鏡によるの検討

LCCは10%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液にて4 $^{\circ}$ C17時間ゆっくり回転させながら固定する。アルデヒド固定後オスミウム酸固定後脱水し、エポキシ樹枝に包埋し超薄切片を作製する。超薄切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛にて染色する。電子顕微鏡(H-7100, HITACHI)にて観察、撮影する。

2) 培養LAM細胞による人工LCCの作製

- ①初代培養LAM細胞および初代ヒトリンパ内皮細胞を用いて5%CO₂および5%O₂の低酸素条件下で、混合し最低24時間混合培養する(LAM-spheroid)。
- ②初代培養LAM細胞からNeuroCultヒト神経幹細胞培養培地(STEM CELL Technologies)を用い、LAM-Neurosphere

を作製する。さらに作製したLAM-Neurosphereと初代リンパ内皮細胞を混合培養する。

3) LCCおよび人工LCCによる接着分子発現の検討

1)、2)により採取されたLCCおよび人工LCCを用いて、免疫蛍光染色法を用いてLAM細胞間、LAM細胞ーリンパ内皮細胞間に発現する以下の接着分子および細胞外マトリックスを検討する。

①LCC関連抗原

HMB45, α SMA, VEGFR-3

②接着分子(インテグリンファミリー)

α 2, α 3, α 4, α 5

③細胞外マトリックス

Fibronectin, Laminin, type4 collagen

4. 研究成果

1) LAM患者体腔液中LCCの検討

13症例、17検体すべてにLCCを認めた(表)。LCCは体腔液中0.02~10個/mlと症例によりかなりのばらつきがあり、大きさは径約50~100ミクロンであった。検出されたLCCはすべてリンパ内皮細胞により覆われていた(表、図1, 2)すべてLAM細胞の特徴であるメラノーマ関連抗原、筋系抗原の発現を認めた。女性ホルモンレセプターの発現ではERの発現が33.3%であった。以上より、LCCはLAM患者の体腔液中に普遍的に存在することが証明できた。さらにその細胞学的形状は肺組織やリンパ節組織内に見られるLCCと同一であり、すべてリンパ内皮細胞により被われていることから、おそらくすべての症例においてLAM細胞のリンパ管新生能(我々はVEGF-Dの強い関与を示唆した。)によるLAM結節のFragmentationがこれらのLCCの発生に関与し、LAMの病態にきわめて深く連携することが強く示唆された。

表

Case	Age	Specimens	α -SMA	HMB45	VEGFR-3	Estrogene receptor	Progesteron receptor
1	27	Pleural, left	+	+	+	NE	NE
2	27	Ascites	+	+	+	NE	NE
3	28	Pleural, left, Ascites	+	+	+	-	+
4	29	Pleural, right, Ascites	+	+	+	-	+
5	30	Pleural, left, Ascites	+	+	+	-	+
6	32	Ascites	+	+	+	-	+
7	33	Pleural, right	+	+	+	NE	NE
8	36	Pleural, right	+	+	+	NE	NE
9	37	Ascites	+	+	+	NE	NE
10	37	Pleural, right	+	+	+	+	+
11	38	Ascites	+	+	NE	NE	NE
12	41	Pleural, left, Pericardial	+	NE	NE	NE	NE
13	42	Ascites	+	+	NE	+	+
Positive / Total number of cases (Percentage)			13 / 13 (100%)	12 / 12 (100%)	10 / 10 (100%)	2 / 6 (33.3%)	6 / 6 (100%)

2) 培養 LAM 細胞による人工 LCC の作製

① LAM-spheroid の作製

5 系統ある初代培養 LAM 細胞について Spheroid の作製を施行したが、培養 LAM 細胞の増殖が悪く、あらたな LAM-spheroid の作製が困難となった。

② LAM-Neurosphere の作製

①の方法に変わり、あらたに幹細胞培養法による人工 LCC の作製を試みた。それによりできた LAM-Neurosphere が作製できた。LAM-Neurosphere は径 500~1000 μ 程度の大きさがあり LCC より約 10 倍の大きさであった (図 3)。この LAM-Neurosphere を用いて、初代培養リンパ内皮細胞との混合培養を試みたが、まだリンパ内皮細胞に覆われた LAM-Neurosphere はできていない。

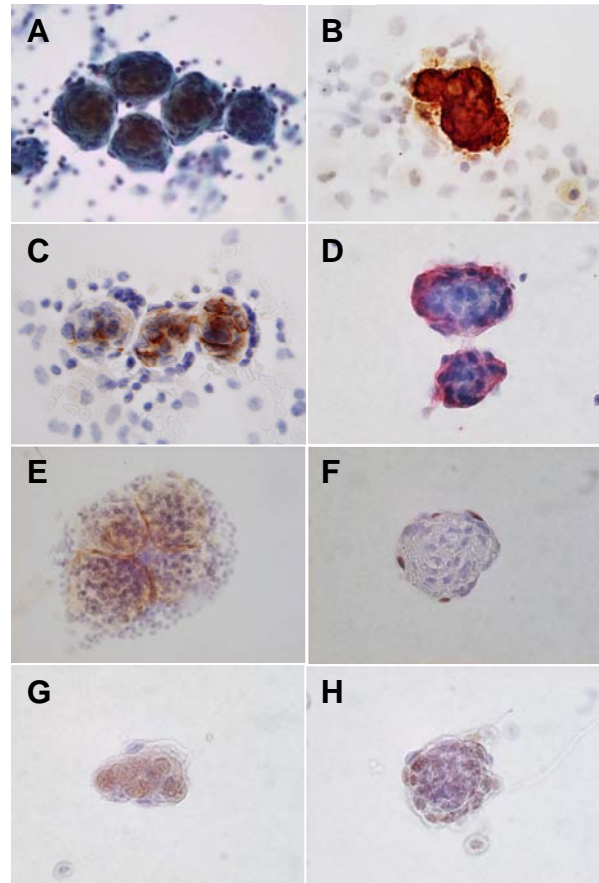
3) LCC および人工 LCC による接着分子発現 (図 4)

患者 LCC では接着分子のひとつであるインテグリンファミリーに属する alpha2, 4, 5 の発現が LAM 細胞間、リンパ内皮細胞下に認められる一方で、alpha3 はリンパ管内皮細胞直下に発現し LAM 細胞間では弱かった。さらに細胞外マトリックスである Laminin, Fibronectin の高度の発現を LAM 細胞間に認めた。Laminin はリンパ内皮細胞直下にもよく発現していた。基底膜物質である 4 型コラーゲンは血管周囲には高度に発現していたが、リンパ管周囲での発現はほとんど認めなかった。以上より、1) LAM 細胞は alpha2, 4, 5-Laminin および Fibronectin により接着し、2) LAM 細胞-リンパ内皮細胞は alpha2, 3, 4, 5, Laminin により接着していることがわかった。4 型コラーゲンは LCC の細胞接着への関与はほとんど見られなかった。これらにより LCC における LAM 細胞-リンパ内皮細胞相互の接着機構の一端が示された。

一方、LAM-Neurosphere の接着分子の検討は充分に行われていない。細胞外マトリックスである Fibronectin および Laminin のうち Fibronectin のみが LAM 細胞間に極めて良く発現していることがわかった。しかし、Laminin は条件設定がうまくいかず発現の確認が取られていない。

今後、患者 LCC の採取ならびに人工 LCC の作製を継続し LAM 細胞間ならびに LAM 細胞-リンパ内皮細胞間の接着機構の病理学的解析を継続することにより、LAM の病態進展に重要な役割を果たすと考えられる LAM 細胞のリンパ管新生能と LCC の Fragmentation の機構の解明と治療法開発への応用を目指す。

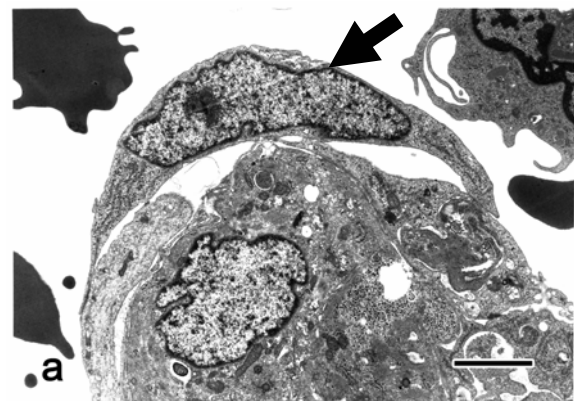
図 1



LAM cell cluster の免疫細胞学的特長

A. Papanicolaou 染色、B. α -smooth muscle actin (茶)、C. HMB45 (茶)、D. VEGFR-3 (赤)、E. Podoplanin (茶)、F. Prox-1 (茶)、G. Estrogen receptor (茶)、H. Progesterone receptor (茶)。

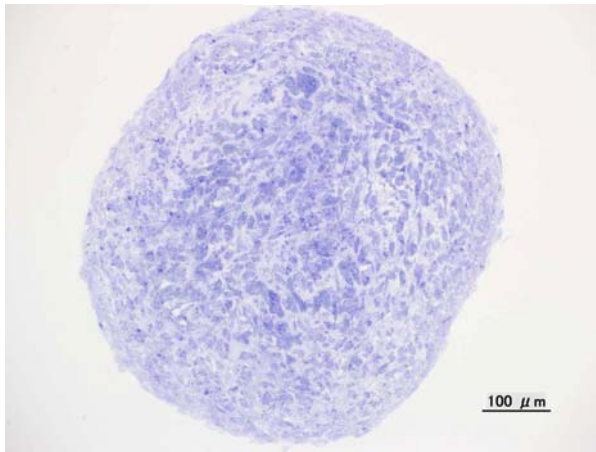
図 2



LAM cell cluster の電子顕微鏡学的特長

細胞集塊の表面には扁平なリンパ内皮細胞が覆っている (矢印)。

図 3



LAM-Neurosphere (超薄切片標本, トルイジン青染色)

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 2件)

Mitani K, Kumasaka T, Takemura H, Hayashi T, Gunji Y, Kunogi M, Akiyoshi T, Takahashi K, Suda K, Seyama K. Cytological, Immunocytochemical, and Ultrastructural Characterization of LAM Cell Clusters in the Chylous Effusion of Patients with Lymphangioleiomyomatosis. Acta Cytologica, in press.

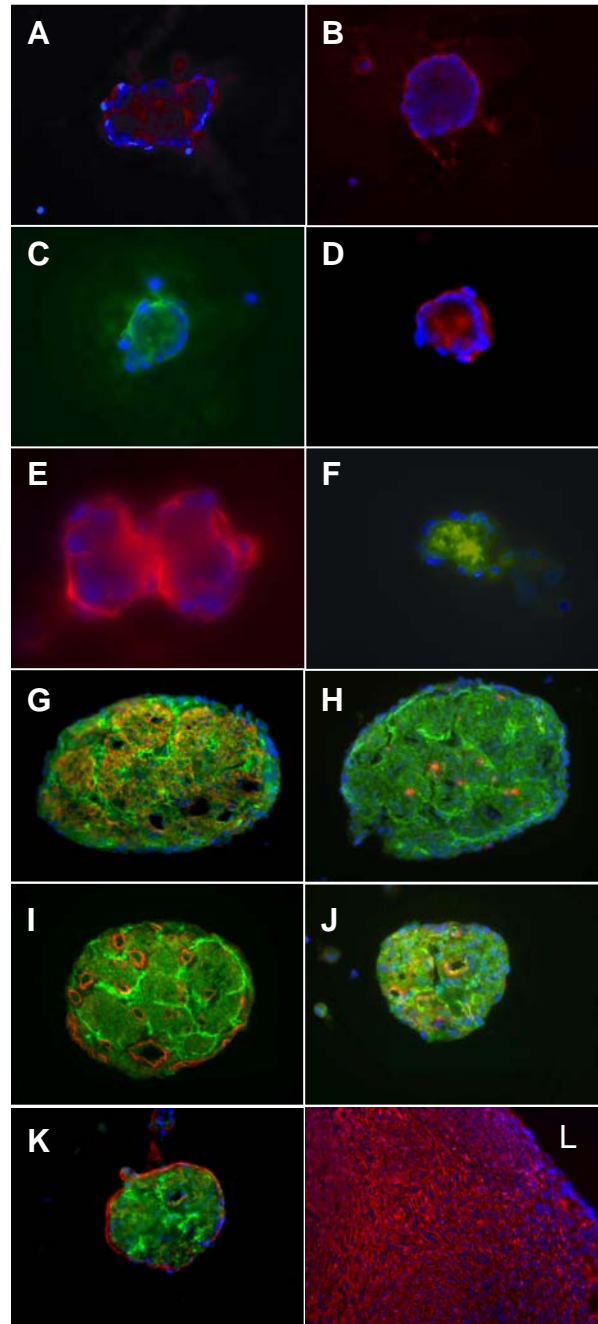
Hirama M, Atsuta R, Mitani K, Kumasaka T, Gunji Y, Sasaki S, Iwase A, Takahashi K, Seyama K. Lymphangioleiomyomatosis diagnosed by immunocytochemical and genetic analysis of lymphangioleiomyomatosis cell clusters found in chylous pleural effusion. Intern Med. 46:1593-6, 2007

[学会発表] (計 6件)

Seyama K, Sato T, Gunji Y, Kumasaka T, Mitani K, Akiyoshi T, Tobino K, Hayashi T. Effect of long term administration of gonadotropin-releasing hormone analogues on chylous effusion in patients with lymphangioleiomyomatosis. The LAM Foundation 2007 lymphangiogenesis international research conference 87, 2007

Mitani K, Kumasaka K, Takemura H, Hayashi T, Hosokawa Y, Suda K, Gunji Y, Akiyoshi T, Seyama K: Cytological,

図 4



接着分子および細胞外マトリックスの発現:

- A. インテグリン α 2 (赤)
 - B. インテグリン α 3 (赤)
 - C. インテグリン α 4 (緑)
 - D. インテグリン α 5 (赤)
 - E. Fibronectin (赤)
 - F. Laminin (緑)
 - G. α SMA+VEGFR-3 (赤+緑)
 - H. HMB45+VEGFR-3 (赤+緑)
 - I. Type4 collagen+VEGFR-3 (赤+緑)
 - J. Fibronectin+VEGFR-3 (赤+緑)
 - K. Laminin+VEGFR-3 (赤+緑)
 - L. Fibronectin (赤)
- (A-F: LCC, G-K: Lung tissue,
L: LAM-Neurosphere, 青は細胞核)

immunocytochemical, and ultrastructural characterization of LAM cell clusters in Chylous Effusion in patients with Lymphangiomyomatosis. The LAM Foundation 2007 lymphangiogenesis international research conference 80, 2007

Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, Gunji Y, Suda K, Seyama K: Loss of Heterozygosity of the TSC Genes and Overexpression of mTOR-related Proteins in Multifocal Micronodular Pneumocyte Hyperplasia (MMPH) of the Lung. The LAM Foundation 2007 lymphangiogenesis international research conference 73, 2007

熊坂利夫, 三谷恵子, 林大久生, 山鳥一郎, 瀬山邦明: 重症リンパ脈管筋腫症における中枢気道の病理学的解析. 日本病理学会総会 2008年5月17日 金沢

三谷恵子, 熊坂利夫, 林大久生, 須田耕一, 山鳥一郎, 郡司陽子, 秋吉妙子, 瀬山邦明: 乳び体腔液中 LAM cell cluster (LCC) の細胞学的特徴とその意義. 日本呼吸器学会総会 2007年5月12日、東京

郡司陽子, 瀬山邦明, 熊坂利夫, 三谷恵子, 佐藤輝彦, 秋吉妙子, 小池建吾, 高橋和久: 乳糜胸水合併 LAM 症例における低用量 GnRH 療法の効果. 日本呼吸器学会総会 2007年5月12日、東京

[図書] (計 1件)

Lymphangiomyomatosis. Seyama K, Kumasaka T, Sato T, Mitani K. Lymphangiogenesis and Cancer Metastasis. edited by Stacker SA and Achen MG. Springer London in press.

[その他]

気胸・肺嚢胞スタディグループホームページ
: <http://kikyostudy.wordpress.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊坂 利夫 (KUMASAKA TOSHIO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 00286709

(2) 研究分担者

瀬山 邦明 (SEYAMA KUNIAKI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 10226681

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

林 大久生
順天堂大学・医学部・大学院生

三谷 恵子

順天堂大学・医学部・技術員