

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590436

研究課題名(和文) 体腔傷害における反応性中皮細胞の機能解析と病態診断および再生治療への応用

研究課題名(英文) Phenotypic alterations of reactive mesothelial cells during various peritoneal disorders; applications for diagnosis and treatments

研究代表者

本田 一穂 (Honda, Kazuho)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10256505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌性腹水や腹膜透析(PD)排液の中皮やマクロファージの表面分子発現をフローサイトメトリー法で解析した。癌性腹膜炎では、中皮のポドプラニンやCD44の発現増強傾向があり、マクロファージのポドプラニン、CD44、CD14の発現が有意に上昇した。PD排液では、中皮のCD44発現が一部の長期透析症例で増強した。また、マクロファージのCD44発現はPD期間に相関した。ポドプラニンやCD44は細胞膜に共発現し、細胞内骨格の構造変化を誘導して、炎症細胞の遊走や癌細胞の浸潤などに関与している。今回の結果は、種々の体腔病変でマクロファージや中皮の細胞応答に関わる表面分子の発現が増強することが示された。

研究成果の概要(英文)：The phenotypic alterations of mesothelial cells and macrophages in cancer ascites and peritoneal dialysis fluid (PDF) were investigated by flowcytometry. In cancer ascites, the expressions of podoplanin and CD44 in mesothelial cells tended to be increased but not significant, whereas the expressions of podoplanin, CD44 and CD14 were increased significantly. In PDF, the expression of CD44 in mesothelial cells was increased in some of long-term PD patients. The CD44 expression in macrophages was positively correlated with PD duration. CD44 is a hyaluronic acid receptor and works with podoplanin. They interact with ERMs and Rho GTPases affecting intracellular actin rearrangement. These interactions are associated with cell motility and migration in various processes of development, inflammation and cancer. These results indicated that the expression of surface molecules associated with cellular responses increased in mesothelial cells and macrophages in various peritoneal disorders.

研究分野：病理学

キーワード：癌 腹膜播種 腹水 腹膜透析 中皮 マクロファージ フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

体腔の種々の病的状態において、反応性の中皮細胞がしばしば観察される。このような反応性中皮細胞は、形態学的に核や胞体の腫大や核クロマチンの増加を示し、細胞増殖や種々の生理的物質(サイトカイン、細胞外基質など)の産生能が亢進していることが知られている。このような病的現象時の中皮細胞の形質転換は、炎症や腫瘍浸潤の現象において何らかの防御的役割を果たしていると考えられているが、その詳細は解明されていない。一方、癌の播種過程では、中皮細胞と癌細胞が何らかの相互作用を果たしている可能性が想定されているが、その詳細についてもまだ未解明の問題である。

2. 研究の目的

本研究では、体腔の恒常性維持や病的現象における中皮細胞の多面的な反応様式に焦点をあて、中皮細胞の生体防御的反應様式(組織修復・再生能力・抗腫瘍作用・抗炎症作用など)を明らかにし、体腔の病的現象の診断や治療に役立つ知見に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 癌性腹水中の中皮細胞の免疫組織学的検討

担癌患者の腹水や腹腔洗浄液の腹水細胞塗抹標本に各種免疫染色を実施し、癌陰性検体(Class I or II)と癌陽性検体(Class V)における反応性中皮細胞の形態と免疫組織学的特性を検討した。

(2) 培養中皮細胞の癌細胞に対する反応様式の検討

癌細胞株(HCT116)とラット腹膜より分離した培養中皮細胞をトランスウェル(上: HCT116、下: ラット中皮)で培養し、Day0, 1, 3, 7でRMCの細胞形態変化を観察し、RNA・蛋白を採取。培養中皮細胞の発現分子をRT-PCR法およびWesternプロット法で検討した。また、Day2の培養中皮細胞から抽出したmRNAをGeneChipで解析した(バイオマトリックス研究所)。

(3) マウス癌性腹膜炎モデルの免疫組織学的検討

Balb/c nu-/nu- にヒト大腸癌細胞株(HCT116)を1個体あたり3-10x10<sup>6</sup>個を腹腔内移植し、マウス癌性腹膜炎モデルを作成し(参考文献 - )腹膜癌播種巣を免疫組織学的に検討した。また腹水のサイトスピン標本を作成し、免疫組織学的に検討した。

(4) ヒト癌性腹水のフローサイトメトリーによる検討

卵巣癌患者13例の術中腹水や穿刺腹水(細胞診判定は陽性8例、疑い2例、陰性3例)を10-50mlの細胞成分を溶血後に有核細胞数を測定し、FACSでpodoplanin (pod)やCD14が陽性の分画(%)を同定し、細胞表面上のpod, CD14, CD44, EMA, E-cadherin,

ICAM-1などの発現率や発現強度を測定した。沈渣の一部でセルブロックを作成し、免疫染色で発現分子を検出した。

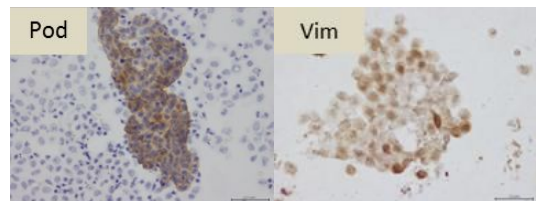
(5) 腹膜透析排液中の細胞のフローサイトメトリーによる検討

腹膜透析患者(導入期3例、維持期13例)の排液1000-2000mlを遠心分離し細胞成分を集め、溶血後に有核細胞数を測定し、FACSで細胞表面上のpod, CD14, CD44, EMA, E-cadherin, ICAM-1などの発現率や発現強度を測定した。沈渣の一部でサイトスピン塗抹標本を作成し、免疫染色で発現分子を検出した。

4. 研究成果

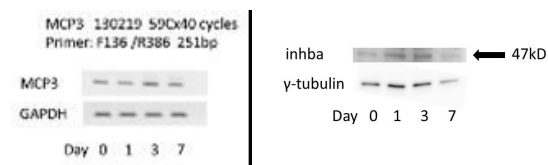
(1) 癌性腹水中の中皮細胞の免疫組織学的検討

中皮細胞のマーカーはCytokeratin AE1/AE3, HBME-1の発現が強く、Podoplaninの発現は、シート状の分化した細胞や単離状態の一部の細胞で陽性であった。Vimentinは一部のシート状中皮細胞で陽性であった。これらは中皮の分化マーカーと考えられ、幼弱な反応性中皮では発現がむしろ微弱していた。また、癌細胞との共存で発現が誘導されることはなかった。一方、悪性細胞の指標となるIMP-3(Insulin like-growth factor II messenger RNA binding protein-3)の発現は癌細胞で時に陽性となるが、反応性中皮では癌細胞との共存の有無に関わらず、発現は見られなかった。



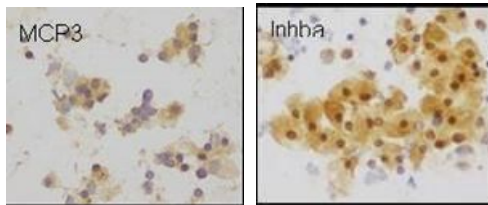
(2) 培養中皮細胞の癌細胞に対する反応様式

中皮は癌細胞との共培養でやや肥大傾向を示したが、形態的には顕著な差は認められなかった。癌細胞との共培養2日目の中皮細胞に誘導されるmRNAの網羅的解析では、癌細胞(-)の中皮細胞に比べて、発現が2倍以上に増加した分子は、CCL7(monocyte chemotactic protein 3: MCP3): X2.59とInhibin -A: X2.79であった。この結果に基づき、MCP-3とInhibin -Aの発現を検討したところMCP-3のmRNA発現はday0より検出され、day3でわずかに増加傾向を示した。Inhibin -Aの蛋白発現も増加した。

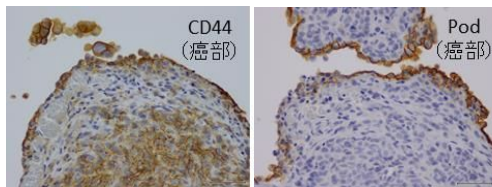


(3) マウス癌性腹膜炎モデルの免疫組織学的検討

ヒト大腸癌細胞株 (HCT116) の腹腔内移植を受けたマウスは移植後 2w より腹部膨満が出現し腹腔内で腫瘍の発育が認められた。癌は腹腔内に限局し局所浸潤のみで、遠隔臓器転移はない。血性腹水の塗抹標本では、癌細胞や反応性中皮細胞が観察された。免疫染色では、反応性中皮細胞に MCP 3 や Inhba が陽性であった。

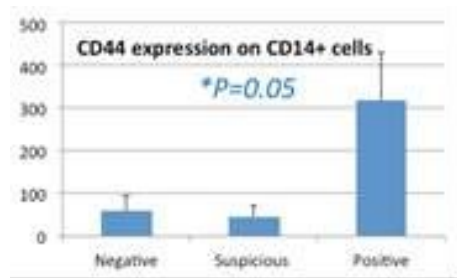
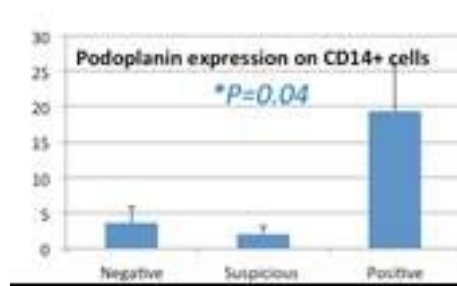
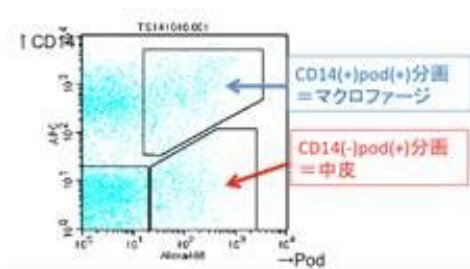


腹膜癌播種組織の免疫染色では、中皮には MCP-3 や Inhibin A を発現していたが、癌部と非癌部の差は不明瞭であった。また、癌巣の周辺部の中皮で podoplanin や CD44 の発現が亢進していた。これらの結果は、癌細胞と中皮の間にヒアルロン酸 (HA) - CD44 - Pod を介する相互反応が存在している可能性を示唆している。



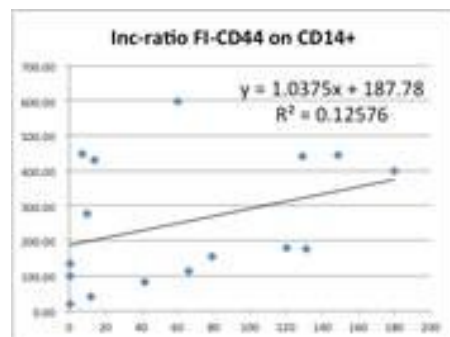
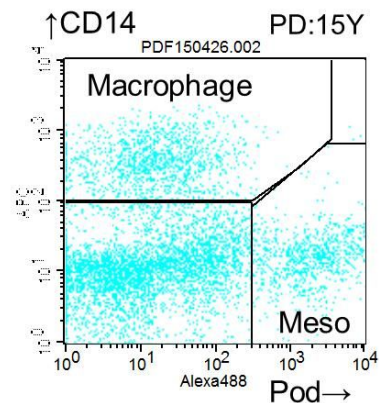
(4) ヒト癌性腹水のフローサイトメトリーによる検討

癌性腹膜炎では、癌細胞との反応により、マクロファージの podoplanin, CD44, CD14 の発現が有意に上昇する。中皮の CD44 の発現が上昇する症例もあるが、有意の傾向は見出せなかった。また、中皮では E-cadherin, EMA の発現を、マクロファージでは ICAM-1 の発現を認めたが、一定の傾向を見出せなかった。セルブロットの免疫染色では、中皮で podoplanin と CD44 の発現を認めた。一部は EMA も陽性の可能性がある。マクロファージでは、CD44 が強く発現し、podoplanin も微弱に発現している。癌細胞では、EMA や E-cadherin が強く発現し、一部で podplanin も発現していた。



(5) 腹膜透析排液中の細胞のフローサイトメトリーによる検討

腹膜透析排液中の中皮細胞は、長期透析症例で CD44 発現が亢進している症例があり、除水不全との関連性が示唆された。マクロファージの CD44 発現も亢進しており、透析期間に従って増加していた。中皮やマクロファージのポドプラニン発現に有意な変化は見られなかった。また、中皮では E-cadherin, EMA の発現を、マクロファージでは ICAM-1 の発現を認めたが、一定の傾向を見出せなかった。サイトスピン塗抹標本の免疫染色で、中皮やマクロファージで CD44 の発現亢進が認められた。



<引用文献>

Nakagomi O and Nakao Ishida. Gann 1980; 71:213-219.

Wetzel K: Int.J.Cancr 120: 1364-1371, 2007

Hashimoto S, Takeda M, Taniguchi S. Int, J. Cancer 107: 557-563, 2003

Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. Front Immunol. 2012; 3: 283.

Martin-Villar E, et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. Mol. Biology of the Cell 2010: 21: 4387-4399.

McDonald B and Kubes P. Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking. Front Immunol. 2015; 6: 68.

Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis. Int J Mol Sci. 2011; 12: 1009-29.

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 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

本田一穂: 癌性腹水中の中皮細胞とマクロファージの対癌反応: フローサイトメトリーによる解析, 第104回日本病理学会学術総会, 2015/4/30、名古屋国際会議場(名古屋市)

本田一穂: 腹膜透析排液中の中皮細胞とマクロファージの変化: フローサイトメトリーによる解析, 第58回日本腎臓学会学術総会, 2015/6/6、名古屋国際会議場(名古屋市)

本田一穂: 腹膜透析排液のフローサイトメトリー解析法の確立と病態評価への応用, 第60回日本透析医学会学術総会, 2015.6.26、パシフィコ横浜(横浜市)

Kazuho HONDA: Flowcytometric analysis of mesothelial cells and macrophages in peritoneal dialysis effluent. 52<sup>nd</sup>European Renal Association-European Dialysis and Transplantation Association, 2015/5/29, London (UK)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田一穂 (HONDA, Kazuho)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10256505

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし