

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670501

研究課題名(和文)リンパ管内皮細胞：新規培養技術に基づくVEGF-Cシグナル機構の解明

研究課題名(英文)Biological effect of VEGF-C on cultured lymphatic endothelial cells

研究代表者

平川 聡史(Hirakawa, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50419511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト皮膚から単離した培養リンパ管内皮細胞は、VEGFシグナルを研究する上で一定の役割を果たしている。しかし、組換えVEGF-Cに対する応答性は乏しく、リンパ管内皮細胞が本来持つシグナルを反映するものではない。そこで、本研究では3次元培養皮膚を構築する積層化技術を応用し、線維芽細胞上にリンパ管内皮細胞を培養した。すると、積層化したリンパ管内皮細胞は、生理的な濃度の組換えVEGF-Cに応答し、脈管様の構造を形成した。従って、脈管が存在する間質組織を模した培養系でリンパ管内皮細胞を培養すると、内皮細胞が本来持つ機能が生じることが本研究から明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cultured lymphatic endothelial cells (LEC) show marked response to recombinant VEGF-A in a physiological condition, whereas LEC show a minimum response to highly-concentrated recombinant VEGF-C in mono-layered culture condition. Therefore, we decided to generate a novel three-dimensional culture system that gives rise to the biological effect of recombinant VEGF-C to cultured LEC. Cultured LEC were seeded on the fibroblasts, and incubated for 48 hours in the presence or absence of recombinant VEGF-C at 50 ng/ml. The three dimensional tissues showed that cultured LEC develop highly organized networks in the presence of VEGF-C as compared with controls. Our results indicate, for the first time, that physiological lymphatic vessel growth is induced by VEGF-C in the three dimensional tissue, and that our novel culture system may clarify the biological mechanism of lymphangiogenesis in physiological and pathological condition.

研究分野：脈管新生

キーワード：リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

1 - 1. VEGF-C: 癌組織におけるリンパ管新生因子

癌は、本邦における死因の第一位であり、その病態解明は危急の課題である。癌細胞は急速に増殖し、リンパ行性及び血行性に転移することが多い。癌の増殖には、豊富な酸素と栄養分が必要である。従って、癌細胞は vascular endothelial growth factor (VEGF)-A を始めとする多様な血管新生因子を産生する。このうち VEGF-C は、選択的かつ強力なリンパ管新生因子であることが、動物実験により明らかになった (Skobe et al. *Nature Med.* 2001)。そこで申請者は、表皮特異的 VEGF-C トランスジェニック・マウスを用いて皮膚化学発癌を行った。この結果、過剰な VEGF-C は皮膚原発巣のみならずリンパ節のリンパ管新生を誘導し、癌転移の進展を助長することを見いだした (Hirakawa et al. *Blood.* 2007)。その後、複数の癌腫で VEGF-C が患者予後と密接に関わることが明らかとなった。即ち、VEGF-C は癌転移に関わる極めて重要な増殖因子であり、VEGF-C に始まるシグナル伝達機構を解明することは、癌転移に関わるメカニズムを同定する上で必要不可欠である。

1 - 2. 培養ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞の樹立

本研究の先がけは、ヒト新生児皮膚から培養リンパ管内皮細胞を単離し、細胞内シグナル伝達を解明する実験系の創出に始まる (Hirakawa et al. *Am J Pathol.* 2003)。この結果、リンパ管内皮細胞は血管内皮細胞と内皮特異性を共有しつつ、複数のリンパ管特異的遺伝子を発現し、VEGF-C へ応答することが期待された。さらに、培養リンパ管内皮細胞は、管腔形成も示した。しかし、培養リンパ管内皮細胞に効率良く刺激を与えることが期待された VEGF-C は、単層培養では全くその効果を示さなかった (Hirakawa et al. *Am J Pathol.* 2003)。その要因を考えると、従来行われているプラスチック・ディッシュ上の単層培養は、内皮細胞が本来有する細胞機能を十分評価出来ない可能性がある。そこで、VEGF-C に応答するリンパ管内皮細胞の培養系を新たに樹立し、生体を模倣した培養モデルの1つである積層化技術をリンパ管内皮細胞で確立することが必要である。新たな培養モデルを確立することが必要である

2. 研究の目的

本研究の目的は、リンパ管新生に関わる最も重要な増殖因子の1つである VEGF-C の生理的至適濃度を明らかにし、リンパ管内皮細胞におけるシグナル伝達経路を同定することである。

さらに、リンパ管内皮細胞の細胞内シグナル解析を、新規積層化培養技術を応用するこ

とにより、VEGF-C のシグナル伝達経路を明らかにすることが、本研究の目標である。積層化培養技術は、線維芽細胞を多層化してリンパ管内皮細胞の下床に用いるものであり、内皮細胞の接着性と膜蛋白の発現が亢進する有用なものである。本技術に立脚し、リンパ管内皮細胞のシグナル伝達機能の一端を明らかにすることにより、癌治療の科学的基盤を創出することに寄与したい。

3. 研究の方法

3 - 1. 積層化培養系の樹立

従来行われているプラスチック・ディッシュ上の単層培養は、内皮細胞が本来有する細胞機能を十分評価出来ない可能性がある。実際、リンパ管内皮細胞に効率良く刺激を与えることが期待された VEGF-C は、単層培養では全くその効果を示さなかった。(Hirakawa et al. *Am J Pathol.* 2003)。

細胞積層化は、リンパ管内皮細胞が本来持つ機能を評価する上で、極めて重要な技術である。ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞を、積層化した線維芽細胞上に培養する方法を示す。

ファイブロネクチンとゼラチンについて、それぞれ 0.2mg/ml の溶液を調整する。

12 穴カルチャーインサートの底面を、ファイブロネクチンでコーティングする。線維芽細胞をトリプシン処理し、細胞懸濁液を作る (6×10^6 個)。遠心後、上清をファイブロネクチン溶液に置換する。線維芽細胞を攪拌し、細胞表面にファイブロネクチン薄膜を形成させる。

同様に、細胞表面にゼラチン薄膜を形成させる。

カルチャーインサートに線維芽細胞 (1×10^6 個) を播種し、培養を開始する。培養液は、ウシ血清 10% 添加 DMEM を用いる。24 時間後、4 層の線維芽細胞層が形成される。リンパ管内皮細胞の懸濁液を作る。その後、線維芽細胞の表面に播種する (2×10^5 個)。2 日間、培地交換を行いながら培養する。培地は、ウシ血清 10% 添加 DMEM を用いる。

固定後、病理組織標本として染色する。抗体は、内皮細胞の指標である CD31、あるいはリンパ管内皮細胞が特異的に発現する膜蛋白 podoplanin 及び LYVE-1 に対する特異抗体を用いて、蛍光免疫染色法で観察する。

3 - 2. VEGF 受容体の機能評価

リンパ管内皮細胞は、VEGF-C に対する受容体 VEGF-R2 及び R-3 を細胞膜表面上に発現する。VEGFR-2 及び R3 は膜型チロシンキナーゼであり、細胞外領域に VEGF-C または VEGF-D が結合すると、細胞内領域にチロシンのリン酸化が起きる。リンパ管新生に関わる VEGF リガンドと受容体の関係を図 1

に示す。

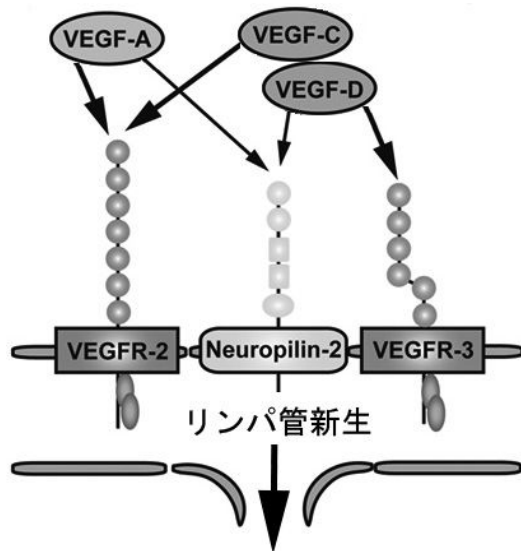


図 1 リンパ管新生に関わる VEGF シグナル
VEGF-A,C,D は、リンパ管新生作用を持つ増殖因子である。リンパ管内皮細胞は、その受容体である VEGFR-2,R-3 及び Neuropilin-2 を発現する。VEGF-A が VEGFR-2 に選択的に結合するのに対して、VEGF-C は、VEGFR-2 及び R-3 に結合する。VEGFR-3 に関するシグナル伝達機構は、不明な点が多い。Hirakawa S. *Cancer Sci.* 2009 より改変。

本研究では組換え VEGF-C を用いて、cord formation を行った。その方法を以下に示す。リンパ管内皮細胞を線維芽細胞に積層化した後、血清濃度を 10 パーセント未満に低下させた。その後、組換えヒト VEGF-C を生理的濃度で溶解し、培養液に添加した。リンパ管内皮細胞を 48 時間刺激し、cord formation が濃度依存的に誘導されるか観察した。観察は、培養細胞を 4%パラホルム/リン酸緩衝液で固定した後、免疫蛍光抗体法を用いて行った。シグナルの特異性は、リンパ管内皮細胞を VEGFR-2 または R-3 に対する中和抗体で前処理することにより検出した。

3 - 3 . 細胞増殖試験

積層化培養系で、VEGF-C に対する応答をリンパ管内皮細胞の増殖により評価した。方法を以下に示す。

リンパ管内皮細胞を線維芽細胞に積層化した後、血清濃度を 10 パーセント未満に低下させた。培養液に組換え VEGF-C を添加し、48 時間にわたりリンパ管内皮細胞を刺激した。培養細胞を 4%パラホルム/リン酸緩衝液で固定し、Ki-67 に対する特異抗体で標識し、蛍光抗体法を用いて細胞増殖活性を検出した。

4 . 研究成果

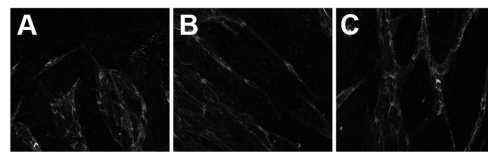
4 - 1 . 積層化培養系の樹立

ヒト皮膚線維芽細胞上にリンパ管内皮細胞を積層化した。リンパ管内皮細胞の特異性は、蛍光抗体法により膜蛋白 podoplanin 及び

LYVE-1 の発現を確認することにより検出した。

4 - 2 . VEGF 受容体の機能評価

Cord formation を観察することにより、リンパ管内皮細胞に対する組換え VEGF-C の効果を測定した。組換え VEGF-C は、生理的濃度である 10 ng/ml または 100 ng/ml を用いてリンパ管内皮細胞を刺激した。低血清状態では、リンパ管内皮細胞の cord formation は抑制された (図 2 A)。しかし、組換え VEGF-C で刺激すると、リンパ管内皮細胞は発芽し、cord formation を示した (図 2 B 及び 2 C)。従って、積層化によりリンパ管内皮細胞は cord formation を示し、組換え VEGF-C に生理的濃度で応答することが示唆された。



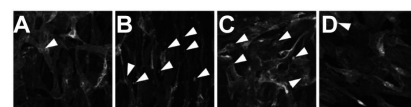
濃度：0 10 100 (ng/ml)

図 2 積層化における cord formation
(A)組換え VEGF-C を添加していない対照群。Cord formation は認めなかった。(B)組換え VEGF-C 10 ng/ml を添加し、リンパ管内皮細胞を刺激した。Cord formation を認めた。(C) 組換え VEGF-C 100 ng/ml を添加した場合も、同様に cord formation を示した。

次に、VEGF-C シグナルの特異性を検討するために、リンパ管内皮細胞を抗 VEGFR-2 抗体または抗 VEGFR-3 抗体で前処理してから組換え VEGF-C を添加し、cord formation を行った。この結果、中和抗体で前処理した群では cord formation が抑制された。従って、VEGF-C シグナルは VEGFR-2 または VEGFR-3 を介して行われることが示唆された。

4 - 3 . 細胞増殖試験

単層培養では検出できなかった組換え VEGF-C による細胞増殖活性を、積層化により検出する目的で実験を行った。この結果、積層化したリンパ管内皮細胞は、組換え VEGF-A と同様 VEGF-C に対して応答し、増殖することが示唆された (図 3)。



組換え蛋白：なし VEGF-A VEGF-C VEGF-C
中和抗体：なし なし なし 抗VEGFR-3

図 3 . 積層化による細胞増殖試験

(A)組換え蛋白非添加の対照群では、リンパ管内皮細胞の増殖は、ほとんど認めなかった。(B) 組換え VEGF-A 10 ng/ml を添加し、細

胞増殖活性を検出した。(C)組換え VEGF-C 添加群でも、組換え VEGF-A 同様の細胞増殖活性を認めた。(D) 抗 VEGFR-3 抗体で前処理すると、組換え VEGF-C による細胞増殖は抑制された。

<引用文献>

1. Skobe et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. Nat Med. 2001;7:192-8.
2. Hirakawa et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood and lymphatic endothelial cells. Am J Pathol. 2003;162:575-586.
3. Hirakawa et al. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. Blood. 2007;109:1010-1017.

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1件)

Hirakawa S, Detmar M, Karaman S. Lymphatics in nanophysiology. Adv Drug Deliv Rev. 2014;74:12-18.

〔学会発表〕(計3件)

1. Hirakawa S, Iwasaki M, Mishiguchi A, Matsusaki M, Akashi M. Biological effect of vascular endothelial growth factor-C on cultured lymphatic endothelial cells. The 39th Japanese Investigative Dermatology annual meeting. Osaka, December 12-14, 2014.
2. Hirakawa S. Nanophysiology to better understand the function of the vasculature in health and skin disease. The 24th Annual Meeting of The Korean Society for Investigative Dermatology. Seoul, South Korea. March 28-29, 2014.
3. 平川聡史. 三次元培養：癌リンパ行性転移を評価する実験系の構築. シンポジウム. 第38回日本リンパ学会総会. 東京. 平成26年6月20日、21日.
- 4.

〔図書〕(計1件)

Hirakawa S, Shirakata Y, Hashimoto K. Human living skin equivalents as a promising model for skin grafts. Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application. Akashi M, Akagi T, Matsusaki M, eds. Springer. 2014;183-190.

〔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

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

平川 聡史(HIRAKAWA, Satoshi)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50419511

(2)連携研究者

松崎 典弥(MATSUSAKI, Michiya)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号：00419467

明石 満 AKASHI, Mitsuru)

大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：20145460