

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390243
 研究課題名 (和文) 肺リンパ脈管筋腫症 (LAM) における LAM 細胞の増殖および
 病変形成機構の解明
 研究課題名 (英文) Study on the mechanism of LAM cell proliferation and disease
 progression in lymphangiomyomatosis
 研究代表者
 瀬山 邦明 (SEYAMA KUNIAKI)
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号：10226681

研究成果の概要：

肺リンパ脈管筋腫症 (LAM) の病因である LAM 細胞の増殖や転移機構の解明をめざし、LAM 細胞クラスター (LCC) や組織より LAM 細胞を分離培養し、その細胞生物学的特性を検討した。また、LAM 細胞を高度免疫不全マウスに移植し、治療や病態解明に役立つ LAM モデルマウス作成を試みた。LAM 細胞の多様性、培養中の性質変化、マウス内で生着の困難さなど、今後の LAM 研究の発展への課題が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 4,500,000 | 0 | 4,500,000 |
| 2007年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 2008年度 | 4,000,000 | 1,200,000 | 5,200,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 12,600,000 | 2,430,000 | 15,030,000 |

研究分野：呼吸器

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、呼吸器内科学

キーワード：リンパ脈管筋腫症、がん抑制遺伝子、TSC 遺伝子、リンパ管新生、結節性硬化症、自然気胸、嚢胞性肺疾患、リンパ行性転移

1. 研究開始当初の背景

肺リンパ脈管筋腫症 pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM) は生殖可能年齢の女性 (平均 30 歳前後) に発症し、重症例では約 10 年の経過で進行性の呼吸不全により死亡する予後不良な疾患である。病理学的には肺内に平滑筋様細胞 (LAM 細胞) の過誤腫性増殖をび慢性、かつ不連続性に認め、肺実質構造の破壊と嚢胞形成を特徴とする。LAM の発症はほぼ女性に限られ、妊娠や出産により増悪する症例が報告されることより、LAM の発生・進展には女性ホルモンの関与が推測されている。従って、治療としては抗エストロゲン療法が行われるが、十分な

治療効果を得られない症例が多く、進行例では肺移植の適応となる。

LAM は、常染色体優性遺伝性疾患である結節性硬化症 tuberous sclerosis complex (TSC) の肺病変として発症する場合 (TSC 合併 LAM、TSC-LAM)、TSC を背景疾患とせず単独で生じる場合 (孤発性 LAM、sporadic LAM)、の 2 種類がある。病気の原因となる LAM 細胞は TSC 遺伝子変異により形質転換した一種の腫瘍細胞であり、病理形態学的には良性でありながら悪性腫瘍と同様に遊走・転移して新たな病巣を形成する点である。すなわち、両肺内に不連続性に分布する各 LAM 病変、LAM に高頻度に合併する腎血管筋脂肪腫やリンパ節

病変 lymphangioliomyoma 等の LAM 細胞には同一の *TSC* 遺伝子変異が検出されること、血液・尿などの体液中から LAM 細胞が証明されること、片肺移植例で移植したドナー肺に再発した LAM 病変は遺伝学的にはレシピエント由来であること、等々の事実から、腫瘍化した LAM 細胞はクローン性増殖して転移する。

LAM はその病名のとおりリンパ管新生により特徴づけられる病態であるが、LAM 細胞の産生するリンパ管内皮細胞増殖因子 (VEGF-C および-D) により病変部位において豊富なリンパ管が新生されること、さらに、LAM 細胞がリンパ管内皮細胞で被われた LAM 細胞クラスター (LAM cell cluster, LCC) として断片化され、新生リンパ管内に遊離され、骨盤腔から鎖骨上窩リンパ節に至る体軸リンパ流路に沿って不連続性に病変を形成すること、並びに、LAM 病変内のリンパ管新生により LCC が形成されリンパ流中に放出されることが、肺内にびまん性・不連続性に病巣を形成する (= 転移巣を形成する) メカニズムであること、等を報告してきた。

2. 研究の目的

LAM のリンパ管新生を介した進展・転移機序を、LAM 細胞の細胞生物学的特性を検討することにより、細胞レベルで生化学的、分子生物学的に明らかにすることである。LAM 細胞レベルでの増殖・転移機構を明らかにすることは、本疾患の病態を解明するのみならず、有効な治療法もない本疾患にとって新たな治療法の開発につながることを期待される。

(1) 肺移植時の摘出肺やリンパ節の LAM 病変、ならびに乳糜胸水・腹水中の LCC から LAM 細胞を分離し、初代培養および cell line 化 (細胞株化) する。

(2) LAM 細胞の形態学的多様性、分生物学的多様性、および機能的多様性を明らかにする。

(3) 株化 LAM 細胞の移植による実験モデル動物の作製、を行う。

3. 研究の方法

(1) LAM 症例、LAM 検体の集積

LAM 患者の紹介施設、肺移植施設、等の協力のもと、紹介患者の診療と検体の集積を継続する。

(2) LAM 細胞の初代培養系の確立

胸腔鏡下肺生検 (VATS)、肺移植等の診断・治療的手術時に得られた肺組織片より、症例の同意を得て LAM 細胞の初代培養を行う。肺組織片を実体顕微鏡下に観察し、嚢胞部分に認められる LAM 細胞結節を切離し、I 型 collagen で被覆された 12 well culture plate の各 well に組織片を浸し、平滑筋細胞用培養液 SmBM を使用して培養する。

(3) LAM 細胞多様性の解析

(免疫細胞化学染色と分子生物学的解析)

LAM 肺組織では少なくとも 3 種類の形態学的に異なる LAM 細胞の存在が指摘されているため、異なる形態を示す細胞が増殖してくることが期待される。増殖因子に対する反応や発現遺伝子の相違を免疫染色や RT-PCR、LOH 解析などの手法により検討する。

(4) LAM 細胞の不死化細胞株の樹立

LAM 細胞は *TSC* 遺伝子変異により形質転換した腫瘍細胞であるが、*in vitro* で安定して増殖・分裂を維持できるように hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子導入し、もとの細胞特性を変化させることなく不死化することを試みる。hTERT 遺伝子発現プラスミドベクターは京都大学医学部石川冬樹教授よりすでに供与されている。

(5) LAM 細胞の 3 次元培養による機能解析

3 次元レベルでの globular cell culture (spheroid culture) を試みる。Spheroid 形成後、LAM 細胞とリンパ管内皮細胞 (LEC) の各々の spheroid を混合培養し、相互作用を観察する。すなわち、肺・リンパ節などの LAM 病変組織中のリンパ管内、乳糜胸水・腹水中に認められる LAM 細胞クラスター (LCC) を人工的に作成し、機能的相互作用の解析と 6) の LAM モデルマウス作成に使用する。

6) LAM モデルマウス作成の試み

免疫不全マウスを使用し、乳び腹水・胸水より分離した LCC、初代培養した LAM 細胞、不死化した LAM 細胞、人工的に作成した LCC、等を皮下、腹腔などに接種し、LAM 細胞結節の形成、LAM 細胞周囲へのリンパ管新生、所属リンパ節への LAM 細胞のリンパ行性転移、肺へのヒト類似肺病変の形成、等々の有無を検討する。

4. 研究成果

(1) LAM 症例、LAM 検体の集積

3 年間の研究期間中に、80 例の新規 LAM 症例の診療を開始し、28 例の LAM 症例の臨床検体 (生検や肺移植時の肺組織、乳糜胸水・腹水など) を集積した。研究利用を目指して血清・血胸・尿・細胞株の保存、初代培養細胞系の樹立、を継続して行っている。

TSC-LAM1 例について胚細胞遺伝子変異 (exon 36, Ile1614 の欠失) を確定した。

(2) および(3) LAM 細胞の初代培養系の確立、および LAM 細胞多様性の解析

LAM 症例の臨床検体から LAM 細胞の初代培養を試みた。LCC、肺組織、リンパ節組織、等を材料として培養を行ったが、どの材料においても細胞の増殖を確認できた。しかし、細胞形態的には、紡錘形で間葉系細胞を示唆するが、大別して 2 種類の細胞 (大型と小型の紡錘形細胞) が得られた (図 1)。大型の紡錘形細胞は・-smooth muscle actin (・SMA) 陽性、HMB45 も弱陽性、*TSC2* LOH 陽性、

細胞増殖のスピードは遅く、継代とともに増殖は低下し静止期を迎えるようであった。一方、小型の、星芒状～紡錘形細胞は増殖が比較的早く、長期間継代が可能であるが、 α -SMA 陰性のものがほとんどで、また、HMB45 もほぼ陰性、*TSC2* LOH 陰性であった (図 2)。

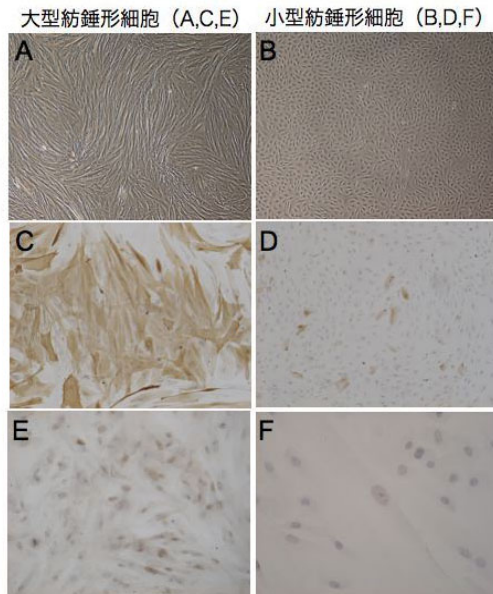


図 1. 初代培養 LAM 細胞の多様性
A, C, E、大型の紡錘形細胞；B, D, F、小型の星芒状～紡錘形細胞；A, B、倒立顕微鏡下観察；C, D、 α SMA 染色；E, F、HMB45 染色

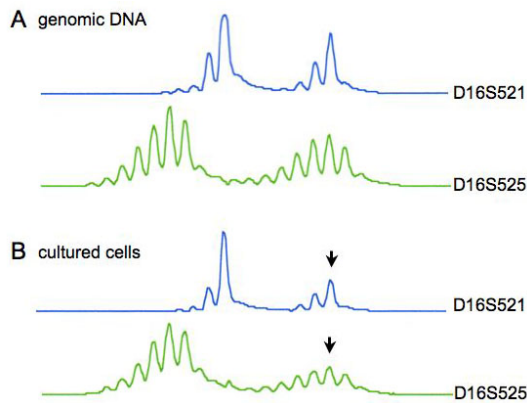


図 2. LOH 解析
A. ゲノム DNA、B. 大型培養細胞の DNA、を用いた LOH 解析。大型の紡錘形細胞では D16S521 および D16S525 の両者で調査のアレルの欠失が認められる

増殖因子として estradiol-17 β 、増殖阻害因子として rapamycin、AG1296 (PDGF 受容体阻害剤)、AG1478 (EGFR 阻害剤) を添加して大型紡錘形細胞と小型紡錘形細胞の増殖特性を比較検討したところ、rapamycin による増殖抑制は大型細胞で顕著であるが小型細胞では抑制効果が弱かった。estradiol-17 β

では増殖は刺激されなかった。PDGFR 阻害剤である AG1296、および EGFR 阻害剤である AG1478 では、高濃度で増殖が抑制されたが、AG1478 でより顕著な増殖抑制効果が認められた。

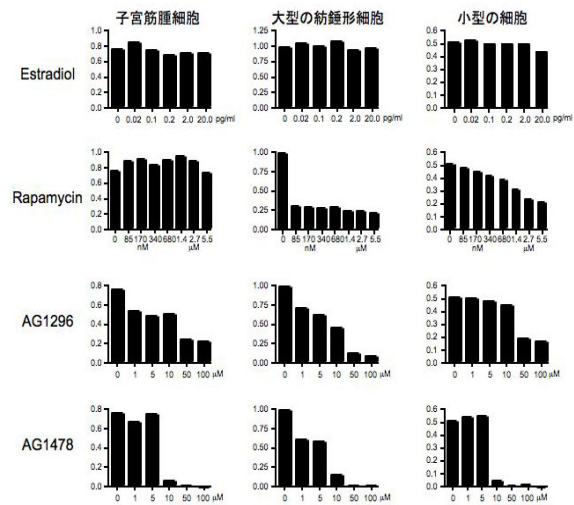


図 3. 培養細胞の増殖因子、増殖阻害因子添加による増殖特性の検討

このように、遺伝子解析や増殖因子・増殖阻害因子に対する反応性を検討した結果、両細胞に相違が認められ、LAM の病変は形態学的・機能的異なる複数種類の細胞より成り立つ可能性が示唆された。小型紡錘形細胞は、米国 Harvard 大学の Dvid Kwiatkoffski に依頼して *TSC* 胚細胞遺伝子変異の有無を高精度な方法で検討してもらったが、検出できなかった。また、病理標本において観察される LAM 細胞の免疫組織化学的特性 (HMB45(+))、 α -SMA(+)、MMP9(+)、VEGF-C・-D(+))などは、継代培養中に失われてしまうようで、*in vitro* 培養系においての LAM 細胞を得ることは複数の困難な問題点があることが明らかとなった。このような減少は、3次元の組織中とは異なり、通常の培養系は二次元の単層培養系であることが大きな要因ではないかと考え、3次元培養系の構築を試みることにした。

LAM 患者の乳糜体腔液中 LCC の検討を行った。当院ならびに全国協力施設の LAM 患者 13 症例から採取された乳糜体腔液 (胸水 8 検体、腹水 8 検体、心嚢液 1 検体、計 17 検体) を材料とした。乳糜液を遠心して細胞成分をみつめ、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を施行した。13 症例、17 検体すべてに LCC を認め、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 (図 4)。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。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た。従って、LCC はすべての LAM 症例で普遍的に認められる LAM 特異的な細胞集塊であり、LAM 細胞のリンパ管新生能による LAM 結節の断片化とリンパ流への放出は、LAM の病態、すなわち転移による新規肺内病変の形成にきわめて深く連携すると考えられる。

乳糜腹水や胸水から分離した LCC の RNA を抽出し、RT-PCR により VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、HMG2 (間葉系細胞マーカーとなる転写因子)、

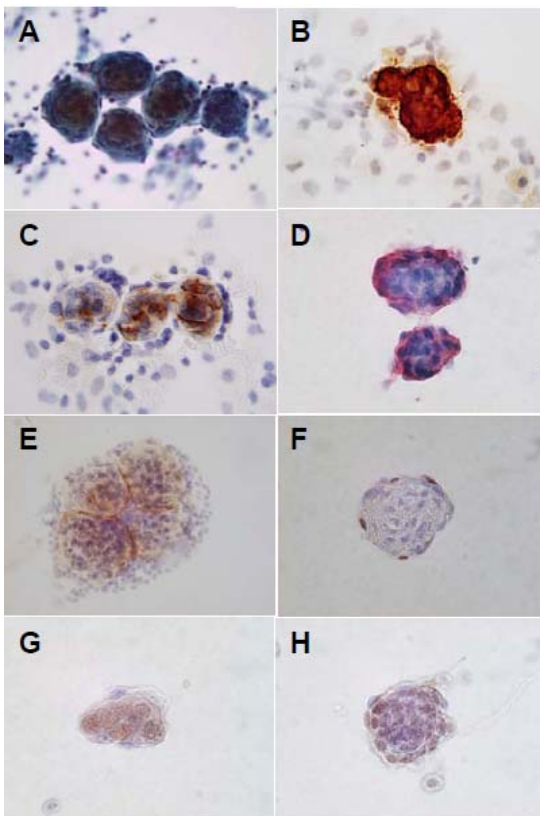


図 4. LCC の免疫細胞染色の特徴
A, Papanicolaou 染色; B, α SMA (茶); C, HMB45 (茶); D, VEGFR-3 (赤); E, Podoplanin (茶); F, Prox-1 (茶); G, Estrogen receptor (茶); H, Progesterone receptor (茶)

HMB45、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、GnRH receptor (GnRH-R) の発現を検討した。4 例の LCC の RT-PCR の結果では、全例とも同一の発

現パターンを示し、GAPDH(+)、VEGF-A(-)、VEGF-C(-)、VEGF-D(+)、ER(わずかに+)、PR(-)、HMB45(+)、HMG2(-)、GnRH-R(-)であった。組織中の免疫染色では、VEGF-C の発現を認めるが、LCC を形成した状況では発現パターンが組織中と異なる可能性が示唆され、興味深い。凍結肺組織標本より LAM 細胞を microdissection して組織中の LAM 細胞の RT-PCR も検討し、発現プロファイルが本当に異なるかどうか、検討する予定である。

(4) LAM 細胞の不死化細胞株の樹立

初代培養 LAM 細胞を大型～小型紡錘形細胞の混合状態で、hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子導入し、不死化細胞株の作成を試みた。hTERT 遺伝子導入細胞も耐性薬剤にて選択して生存し続けた細胞が 3 クローン分離できた。これらのクローンの LOH 解析を行ったが、TSC2 LOH を示す細胞は得られなかった。

(5) LAM 細胞の 3 次元培養による機能解析

一方、初代培養 LAM 細胞を大型～小型紡錘形細胞の混合状態でリンパ管内皮細胞 (LEC) と混合して in vitro で 3 次元培養 (spheroid culture) を試みたところ、LCC 様細胞集塊を得ることができた (図 5)。

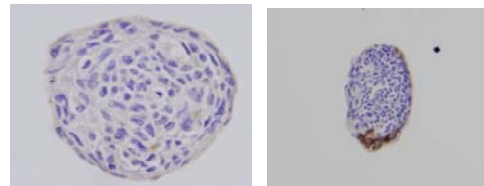


図 5. 左は HMB45、右は LEC マーカーの D2-40 による免疫染色。人工的に、HMB45 陽性細胞が中心に存在し表層は LEC で覆われた LCC 様細胞集塊を作成できた。人工 LCC は大量に作成することが困難で、また spheroid を形成した後の生存期間が短い印象を受けたため、十分量の LCC を人工的に作成しモデル動物作成の確立に使用することができなかった。

(6) LAM モデルマウス作成の試み

高度免疫不全マウスとして雌 SCID マウスを使用し、NK 細胞活性を完全に除去するため抗 NK 細胞モノクローナル抗体を月に 1 回腹腔内投与した。移植する LAM 細胞としては、①乳糜体腔液から分離した LCC、②LCC や肺組織から培養した初代培養 LAM 細胞、を用いた。SCID マウスの皮下、腹腔などに①ないし②を接種し 2 ヶ月後にマウスを解剖して生着の有無を検討したが、生着は確認できなかった。マトリゲル®に①あるいは②を混和してマウスの背中側から直接マウス肺に注入してみたが、同様に生着は得られなかった。

マウスを SCID マウスからより高度の免疫不全マウスである NOG マウスに変更し、以下の A から C の方法で LAM モデルマウス作成を試みた。(A)培養 LAM 細胞、あるいは患者から採取した LCC を腹腔内へ投与する。(B)培養 LAM 細胞とリンパ管内皮細胞をが増殖する足場としてマトリゲルを用いて腹腔内投与する。(A) (B)ともに週 1 回増殖因子として VEGF-D を豊富に含んだ乳び液を 1cc ずつ腹腔内投与する。6 週間後に解剖する。(C) VEGF-D 発現プラスミドを transfection した 293cell を NOG マウスの皮下もしくは腹腔内へ打つ数週間後に腫瘍細胞の周囲にリンパ管が増生しているかどうかを確認する。NOG マウスへ VEGF-D 発現プラスミドを transfection した 293cell を皮下に投与し、4 週間後に腫瘍と皮膚の間に LCC を投与する。さらに 4 週間後解剖して評価する。方法 (A) では腹腔内に腫瘍性病変は認められず、増殖しやすい足場としてマトリゲル®を用いたが、方法 (B) でも病変は認められなかった。リンパ管を増生させた状態にして LAM 細胞が生育しやすい環境を作るため方法 (C) を行った。皮下投与の方がリンパ管内皮細胞をもったリンパ管が形成されていたため、そのリンパ管内めがけて LAM 細胞を注入したが、LAM 病変は認められなかった。腫瘍細胞の増殖速度が速く LAM 細胞の生着や増殖は阻害されたこと、などが原因と考えられた。

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 8 件)

- ① 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 chylous effusion of patients with lymphangiomyomatosis. *Acta Cytologica* (in press) 査読有り
- ② Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med*. 103:124-129, 2009. 査読有り
- ③ Sugimoto R, Nakao A, Yamane M, Toyooka S, Okazaki M, Aoe M, Seyama K, Date H, Oto

T, Sano Y. Sirolimus amelioration of clinical symptoms of recurrent lymphangiomyomatosis after living-donor lobar lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 27:921-924, 2008. 査読有り

⑤ Makino Y, Shimanuki Y, Fujiwara N, Morio Y, Sato K, Yoshimoto J, Gunji Y, Suzuki T, Sasaki S, Iwase A, Kawasaki S, Takahashi K, Seyama K. Peritoneovenous shunting for intractable chylous ascites complicated with lymphangiomyomatosis. *Intern Med*. 47:281-285, 2008. 査読有り

⑥ Hirama M, Atsuta R, Mitani K, Kumasaka T, Gunji Y, Sasaki S, Iwase A, Takahashi K, Seyama K. Lymphangiomyomatosis diagnosed by immunocytochemical and genetic analysis of lymphangiomyomatosis cell clusters found in chylous pleural effusion. *Intern Med*. 46:1593-1596, 2007. 査読有り

⑦ Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, Fujimoto K, Kubo K; Respiratory Failure Research Group of the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare. The epidemiology of lymphangiomyomatosis in Japan: a nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respiology*. 12:523-530, 2007. 査読有り

⑧ Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, Tominaga S, Fukuchi Y. Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangiomyomatosis. *Lymphat Res Biol* 4:143-52, 2006. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① Seyama K. Lymphangiogenesis in lymph-angioliomyomatosis -Lymphangiogenesis and GnRH therapy-. LAM Foundation 2008 International Research Conference, April 5th, 2008, in Cincinnati USA.
- ② Seyama K. LAM and Lymphangiogenesis. Global LAM summit, February 25, 2007, in Stockholm.
- ③ 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 lymphangioliomyomatosis. LAM Foundation 2007 International Research Conference, April 20th, 2007, in Cincinnati USA.
- ④ Mitani K, Kumasaka T., Takemura H, Hayashi T, Hosokawa Y, Suda K, Gunji Y, Akiyoshi T, Seyama K. Cytological, immunocytochemical, and ultrastructural characterization of LAM cell clusters in chylous effusion in patients with lymphangioliomyomatosis. LAM Foundation 2007 International Research Conference, April 20th, 2007, in Cincinnati USA.
- ⑤ Hayashi H, 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 of the lung. LAM Foundation 2007 International Research Conference, April 20th, 2007, in Cincinnati USA.
- ⑥ Seyama K. Genetic and Molecular Mechanism of Diffuse Lung Diseases 2. Lymphangioliomyomatosis. The 4th international meeting of WASOG. Oct. 20th,

2007, Tokyo.

[図書] (計 1 件)

- ① Seyama K., Kumasaka T., Sato T, and Mitani K. Chapter 8. Lymphangioliomyomatosis. In: Cancer and lymphatic metastasis. Stacker SD and Achen MG (eds) Springer London (in press)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

気胸・肺のう胞スタディグループ
ホームページ :
<http://kikyoustudy.wordpress.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 研究分担者

児玉 裕三 (KODAMA YUZO)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号 : 30384069

(4) 連携研究者

なし