

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21659210

研究課題名（和文）リンパ脈管筋腫症（LAM）幹細胞と LAM モデルマウス作成への応用

研究課題名（英文）Isolation of LAM stem cells and its application for the establishment of mouse LAM model.

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

研究成果の概要（和文）：リンパ脈管筋腫症（LAM）幹細胞と LAM モデルマウス作成への応用
LAM 患者の肺組織、LAM 細胞クラスター（LCC）からの LAM 幹細胞、LAM 細胞、リンパ管内皮細胞、等の細胞を分離・初代培養し、それらの細胞による三次元再構成、相互作用の検討、そして LAM モデルマウス作成への応用を目指した。しかし、肺組織構成細胞の生存率を維持しながら、肺組織から効率よく細胞浮遊液を調整する技術の確立に時間を要し、十分な成果が得られなかった。一方、他グループでの研究成果を応用し、最終年度には 2 例の LAM 肺組織から FACS sorting により肺構成細胞（肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、間葉系細胞、LAM 細胞であると示唆される細胞核分）を分取可能となり、今後への展望が開けた。

研究成果の概要（英文）：Isolation of LAM stem cells, LAM cells, LAM-associated lymphatic endothelial cells (LCC) was tried from LAM-affected lung tissues LAM cell cluster (LCC). Establishing this technique will be expected to contribute to the in-depth analysis of interaction among LAM stem cell, LAM cells and LCC with three-dimensional reconstitution *in vitro* culture system and to the possible application for the development of LAM mouse model. However, we experienced difficulty to prepare cell suspension with an acceptable level of cell viability from LAM-affected lung tissues. At the 3rd year of our project, we adopted the method published by the other group in which FACS sorting was utilized to fractionate alveolar epithelial cells, vascular endothelial cells, LCC, and mesenchymal cells. LAM and its application for the establishment of mouse LAM model. By applying this method to two LAM-associated lung tissues, we could reproducibly prepare cell suspension with high cell viability and successfully fractionate cell fraction which was likely to be unique to LAM-affected lung tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	240,000	3,040,000

研究分野：呼吸器病学

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、LAM 細胞、リンパ管内皮細胞、初代培養

1. 研究開始当初の背景

リンパ脈管筋腫症 lymphangiomyoma-

tosis (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難病である。有病率は100万人あたり約1.2~2.3人と推定される稀少疾患だが、脳死肺移植実施52例の基礎疾患では最多の21例を占め(2008年9月24日現在)、LAMの病態解明・治療法の開発は重要な課題である。

LAMは形態学的には未熟な平滑筋様細胞(LAM細胞)が肺や体軸リンパ節・リンパ管系に沿って増殖することにより生じる。LAM細胞は、腫瘍抑制遺伝子であるTSC(TSC1あるいはTSC2)遺伝子の変異により形質転換した腫瘍細胞であり、一層のリンパ管内皮細胞に被われたLAM細胞クラスター(LAM cell cluster, LCC)となってリンパ行性に肺に転移し、進行性に肺を破壊する。

LAM細胞の単離培養が困難を極めているため、LAM細胞の複製・増殖がどのような機序で成り立っているかは依然として不明である。最近では、正常組織のみならず腫瘍においても幹細胞(自己複製能・多分化能をもつ腫瘍細胞)の存在が示され、ニッチ(幹細胞の生物学的適所となる微少環境)と呼ばれる細胞や機能分子との相互作用により自己複製能・多分化能が維持されるとの概念が受け入れられている。現在までの我々の臨床的観察事項や研究成果では、LAM幹細胞の存在が強く示唆される。すなわち、①乳糜体液中ではLAM細胞は常にリンパ管内皮細胞と相互作用したLCCとして存在し、LAM細胞単独で浮遊することがない、②LCCを試料とした*in vitro*培養系では、異なる形態(紡錘形、星芒状など)や大きさを示す複数の細胞種が出現する、③免疫細胞学的特性が病理組織での免疫組織学的特性と異なる、④免疫不全マウスに培養LAM関連細胞を移植しても生着しない、等である。

2. 研究の目的

本研究では、LAM幹細胞の存在、およびリンパ管内皮細胞がニッチとしてLAM幹細胞の維持と増殖の微少環境を提供している、との仮説のもとに、①LCCやLAM肺組織などからLAM幹細胞、LAM細胞、LCC、等を分離して*in vitro*培養系で増殖させる系を確立する、②①においてLAM幹細胞やLAM細胞が分離できれば、リンパ管内皮細胞とともに免疫不全マウスにリンパ行性に移植し、LAMモデルマウスを作成することを目指す。

3. 研究の方法

1) LAM組織(肺、リンパ節など)は、LAMの診

断のための生検時、あるいは肺移植時に患者の同意を得て取得する。LCCは乳糜胸水や腹水を合併するLAM症例から同意を得て採取する。

組織からの細胞分離に際し、組織のホモジナイズ、消化、その後の細胞の単離方法の検討が必要であり、既報を参考に各種プロテアーゼを対照ヒト肺組織(肺癌のため葉切除を受けた患者より同意を得て使用)を用いて検討した。

LCCは一般の培養ディッシュ、3次元培養ディッシュ(低吸着培養ディッシュ)等に静置し、その後の増殖を観察した。

2) 1)で得られた培養細胞は、LAM細胞以外に多種類の細胞の混入した状態であるため、メラノーマ幹細胞マーカーであるABC5、神経系腫瘍幹細胞のマーカーであるCD133、nestin、等の抗体ビーズを用いてpositive selectionを行い、得られる細胞画分にLAM細胞、LAM幹細胞候補となる細胞が含まれるかどうか、検討する。

3) 3年間の研究期間内で、1)に関しては問題が大きく、細胞のviabilityを保ったまま肺組織由来の細胞懸濁液を調整することに困難を極めた。同時期に、東北大学先端医学研究講座久保裕司博士らのグループが肺組織からFACS sortingにより、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、間葉系細胞、等を分取する方法が発表されたため、同グループの指導・研究協力のもと、肺組織の保存方法、プロテアーゼ消化方法と浮遊細胞懸濁液調整の技術改良、CD133ビーズによる細胞分取ではなく表面マーカーに基づくFACS sortingによりLAM細胞を分離することを試みた。

4. 研究成果

1)平成21・22念までの肺組織からの細胞分離方法の検討結果

移植時に得られたLAM肺組織からできるだけ胸膜、血管などの結合組織を除き、その後フードプロセッサとハサミでできるだけ細かく肺組織を細切した。細切した組織をほぼ0.5g程度に分け、それぞれ50mlの遠心管に入れて以下の酵素混合培地を用いて、所定時間、37℃で振盪反応した後遊離細胞を回収し、回収された細胞数の比較とその後の培養の正否により、より効果的な条件はどれか検討した(酵素混合培地:① elastase 1.5 mg/ml + collagenase D 2.0 mg/ml + trypsin Inhibitor 1.0 mg/ml + 0.2 mM CaCl₂ in M199 培地; ② ①で elastase を 0.2 mg/ml、collagenase D を 0.2 mg/ml、trypsin Inhibitor を 0.1 mg/ml としたもの; ③ dispase II 1000 U/ml + コラゲナーゼヤクルト 120 U/ml + 0.005% トリプシンインヒビター in 5%牛胎児血清を含む SmBM 培地; ④ ③に

elastase を 1.5 mg/ml 加えたもの; ⑤ ③に elastase を 0.2 mg/ml 加えたもの/反応条件A 37°Cで1時間振盪反応; 反応条件A 37°C O/N(16.8 時間)振盪反応)。反応後、100 μm のセルストレイナーを通して遊離細胞を含むろ液を 50 ml 遠心管に回収した。collagen (Type I)-coated 6 well microplate の 1 well に移し、37°C、5% CO₂+5% O₂で培養したところ、①③④が最も良好で 1 x 10⁶ 個が回収でき、反応時間を変えても回収される細胞数にそれほど大きな違いはなかった。いずれの場合も培養をはじめた細胞は生着し、細胞形態の異なる複数種の細胞が増殖してくることを確認できた。

dispase II 1000 U/ml + コラゲナーゼ-ヤクルト 120 U/ml + 0.005% トリプシンインヒビター + 0.2 mg - 1.5mg/ml elastase in 5%牛胎児血清を含む SmBM 培地に肺組織を細切したものを懸濁し、37°C O/N(約 16 時間振盪)インキュベーターした後、100 μm のセルストレイナーを通して遊離細胞を含むろ液を 50 ml 遠心管に回収し、培養に移行する方法が細胞の生存率や回収率がよいと結論した。この方法を、4 例の LAM 摘出肺に適応し、collagen (Type I)-coated 6 well microplate の 1 well に移し、37°C、5% CO₂+5% O₂で培養、その後 CD133ビーズで CD133 陽性細胞の分離を目指した。しかし、原因ははっきりしないが、LAM 肺組織からは十分な生育細胞数が得られず、実質的な結果が得られなかった。

2) FACS による細胞分取

正常肺組織で検討した組織消化条件は LAM 肺組織では同様の結果を得られなかったため、東北大学先端医学研究講座久保裕司博士の指導・研究協力のもと、肺組織の保存方法、プロテアーゼ消化方法と浮遊細胞懸濁液調整の技術改良、FACS sorting により LAM 細胞を分離することを試みた。具体的には、LAM 症例の肺移植時に摘出した肺組織を細切し、dispase II、collagenase、DNase により消化して細胞浮遊液を調整した。細胞浮遊液は蛍光色素でラベルされた 4 種類の表面マーカー抗体 (抗ヒト CD45-Alexa700 抗体、抗ヒト EpCAM-PE 抗体、抗ヒト T1・-Alexa647 抗体、抗ヒト VE-cadherin FITC 抗体) と Live-dead discriminator 7-AAD で標識後、FACS cell sorter で細胞を分画した。その結果、II 型肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、間葉系細胞を分離しえた。さらに、2 例の LAM 症例の肺組織からは、正常肺組織では通常得られない細胞分画として、EpCAM(-)/T1・low/VE-cadherin very low 細胞分画を同定した。この分画は α SMA 陽性であり、LAM 細胞である可能性が高い。現状では、LAM 細胞であることの唯一の根拠は TSC2 LOH を証明することしかないが、2 例から分離された EpCAM(-)/T1・low/VE-cadherin

very low 細胞分画では、TSC2 LOH は検出できなかった。

3) LCC からの分離培養

乳び胸水を合併した LAM 症例から乳び液中の LAM 細胞クラスター (LCC) を分離し、3 次元培養により幹細胞を維持ならびに分離培養する試みを 2 例で開始した。1 例では LCC 数が少なく継代困難であったが、他の 1 例では LCC はプレート内で球状構造を維持しながら成育・増殖し続け、定期的に一部を採取して凍結細胞標本作製した。経時的に保存した LCC 標本で HMB45、SMA、ER、PgR、VEGFR-3、CD133、などの機能分子の発現を免疫染色により検討したが、SMA、HMB45 の発現は確認できたが、ともに弱く、クラスター表面全面が LCC で覆われている訳ではなかった。それ以外のマーカーの発現は認めなかった。

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 14 件)

1. Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, Terao Y, Watanabe M, Oide T, Nakatani Y, Hebisawa A, Konno R, Takahashi K, Yao T, Seyama K. Prevalence of Uterine and Adnexal Involvement in Pulmonary Lymphangiomyomatosis: A Clinicopathologic Study of 10 Patients. Am J Surg Pathol. 2011; 35: 1776-1785. (査読有)
2. Tobino K, Hirai T, Johkoh T, Kurihara M, Fujimoto K, Tomiyama N, Mishima M, Takahashi K, Seyama K. Differentiation between Birt-Hogg-Dubé syndrome and lymphangiomyomatosis: Quantitative analysis of pulmonary cysts on computed tomography of the chest in 66 females. Eur J Radiol. 2011 May 5. [Epub ahead of print] (査読有)
3. 林田美江, 瀬山邦明, 井上義一, 平井豊博, 三嶋理晃, 厚生労働省難治性疾患克服研究事業呼吸不全に関する調査研究班. 特定疾患治療研究事業対象疾患リンパ脈管筋腫症 (LAM) 認定基準の解説. 日本呼吸器学会雑誌 49; 67-74, 2011. (査読有)
4. 安藤克利, 市川昌子, 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症とは COPD との鑑別が重要. Medicina 49; 420-423, 2012 (査読無)
5. 安藤克利, 瀬山邦明. 新しい局面を迎えた LAM 治療. Annual Review 呼吸器 2012; 199-208, 2012. (査読無)

6. 安藤克利, 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症 (LAM). 総合臨床 60; 2500-2510, 2011. (査読無)
7. 佐藤輝彦, 飛野和則, 瀬山邦明. LAMの病像. 日本胸部臨床 70; 1007-1016, 2011. (査読無)
8. 安藤克利, 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症の病態と治療. 最新医学 66; 1851-1859, 2011. (査読無)
9. 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症. 日本医事新報 4540; 69-76, 2011. (査読無)
10. 瀬山邦明. LAMの病因論. 呼吸と循環 58; 1201-1210, 2010. (査読無)
11. 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症 (LAM) 薬シロリムス(ラパミューン). 日本内科学会雑誌 99; 1617-1622, 2010. (査読無)
12. 星加義人, 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症. 成人病と生活習慣病 40; 693-698, 2010. (査読無)
13. 瀬山邦明. 診断メモ リンパ脈管筋腫症. 内科 105; 974, 2010. (査読無)
14. 佐藤輝彦, 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症 (LAM)における細胞増殖メカニズム. THE LUNG-perspectives 18; 141-145, 2010. (査読無)

[学会発表] (計2件)

1. 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症の展望ー特定疾患認定をうけてー 認定基準とその問題点. 第50回日本呼吸器学会 特別報告5 平成22年4月 京都.
2. Goto N, Seyama K, Yoshimoto K, Kurihara M, Kikuchi T, Kokubu F, Gunji Y, Kunogi M, Takahashi K. Pregnancy and childbirth after the establishment of the diagnosis of lymphangiomyomatosis American Thoracic Society Meeting, Denver, May 2011.
3. 瀬山邦明. リンパ脈管筋腫症 第52回日本呼吸器学会 教育講演 平成24年4月 神戸.

[その他]

ホームページ等:

気胸・肺のう胞スタディグループ

<http://lungcare.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬山 邦明 (KUNIAKI SEYAMA)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号: 10226681