

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792340

研究課題名(和文)細胞間接着複合体に着眼した癌新生リンパ管の特質性の解明

研究課題名(英文)Characterization of junctional complex of lymphatic endothelial cells in cancer lymphangiogenesis

研究代表者

明石 昌也(Akashi, Masaya)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40597168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管内皮細胞は正常な機能を維持するため細胞間結合により調節されている。本研究の目的の一つは、リンパ管内皮細胞の細胞間結合の特質性を明らかにし、炎症性サイトカインTNF- α の細胞間結合に対する影響を解析することであった。

培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(HDLEC)を密着結合マーカー、接着結合マーカー(VE-cadherin)で免疫染色し、TNF- α 処理HDLECで同じ免疫染色と経内皮電気抵抗値を測定した。

その結果、野生型HDLECにおいて連続的・非連続的細胞間結合が混在していること、TNF- α は野生型における細胞間結合を変化させ、リンパ管内皮細胞のバリアに影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To maintain normal function, the lymphatic endothelium is regulated by cell-cell junctions. One of objectives of this study was to characterize cell junctions in lymphatic endothelial cells and to investigate the effects of the inflammatory cytokine TNF- α on altered cell-cell junctions. Cultured human dermal lymphatic endothelial cells (HDLEC) were immunostained with the tight junction marker, and adherens junction markers, VE-cadherin. In TNF- α -treated HDLEC, we evaluated changes in endothelial cell junctions by immunostaining and through the use of transendothelial electrical resistance (TER).

The results revealed a heterogeneous distribution of cell junctions in HDLEC involving continuous and discontinuous junctions. Our data also suggest that TNF- α alters the normal distribution of cell junctions and affects the endothelial barrier of cultured lymphatic endothelial cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 リンパ管内皮細胞 細胞間接着複合体

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の所属リンパ節転移は患者の予後に関わる最重要因子である。近年悪性腫瘍がリンパ管新生能を有し、その結果癌のリンパ節転移を促進しているとの報告がマウスなどを用いた実験により証明されて来たが、悪性腫瘍による新生血管が正常血管とはその強度や走行の直線性など幾つかの点で大きく異なる性質を有しているのが判明しているのに比べ、癌新生リンパ管と正常リンパ管の相違性についてはいまだ完全には理解されていなかった。

1970年代悪性腫瘍が血管新生能を有し、それにより腫瘍自体の成長と遠隔転移を促進していることが分かり、1980年代になって VEGF(血管内皮細胞増殖因子)が同定され、現在では血管新生阻害剤(VEGFの中和抗体:ベバシズマブ)が本邦においても転移性大腸癌患者に対し使用されている。このように急速に進化した血管研究に続き、1992年リンパ管に特異的に発現している VEGF 受容体ファミリーの一つ VEGFR3 が発見され、その後さらに多くのリンパ管新生因子が同定されるに至った。その結果、発生過程におけるリンパ管形成から遺伝性リンパ浮腫等の臨床医学研究まで、リンパ管研究について様々な報告がなされている。

口腔粘膜上皮に最も多い扁平上皮癌の主な転移経路は所属リンパ節で、リンパ節転移の有無は患者の予後に大きく関与する。また転移リンパ節の個数や腫瘍の節外浸潤の有無等が、外科的切除後の追加治療の選択基準となる。血管新生能と同様、腫瘍原発巣において VEGF-C 等のリンパ管新生誘導因子が産生され、それらが原発巣及び流入領域リンパ節双方においてリンパ管新生を促進し、結果としてリンパ節転移を惹起している可能性が示唆されている。臨床応用に向けたリンパ管新生阻害剤の腫瘍転移抑制効果を検討した担癌マウスを用いた実験も現在数多く行われている。しかし癌、及び糖尿病等に起因する新生血管がその強度や走行の直線性といった幾つかの点において正常血管と異なった性質を有しており、これらの特質性が腫瘍内での新生血管の発育や抗癌薬の腫瘍深部への到達等に大いに影響していることが近年の研究結果により解明されているのに比べ、癌新生リンパ管と正常リンパ管との比較、及び癌新生リンパ管の特質性の解明はいまだ十全ではなかった。

血管においては、静的で安定化した状態では VE-cadherin(接着結合構成分子)や Claudin(密着結合構成分子)が血管内皮細胞間で細胞間接着複合体を構成しているが、血管新生を惹起するような低酸素状態等の不安定化した状態では、内皮細胞間接着複合体は remodeling を起こし細胞間接着複合体構成分子の発現や局在は安定時とは異なる。一方で、正常リンパ管における内皮細胞間接着複合体に関する詳細な観察、および炎症性サイ

トカインや増殖因子等に暴露された状態におけるリンパ管内皮細胞間接着複合体の remodeling に関する検討は、研究開始当初希少であった。

2. 研究の目的

本研究は癌新生リンパ管の特質性の解明を最終目的とし、その端緒としてまず(1)正常リンパ管内皮細胞における細胞間接着複合体の詳細な観察を行い、次に(2)炎症性サイトカインや増殖因子等に暴露された状態におけるリンパ管内皮細胞間接着複合体の変化について検討を行った。

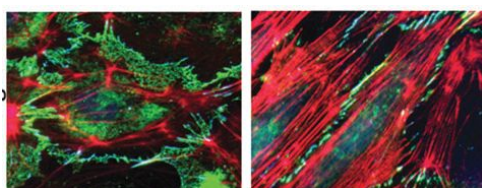
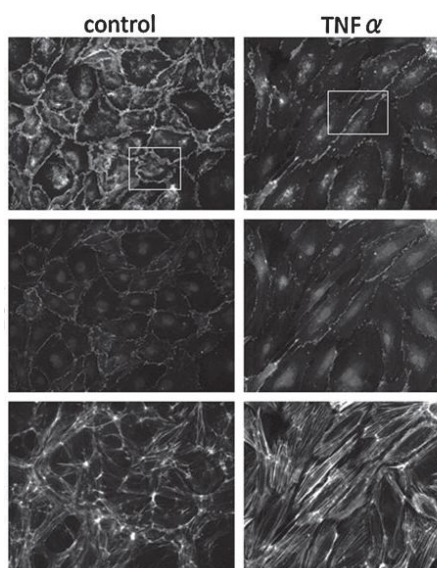
3. 研究の方法

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(HDLEC)を用い、正常における細胞間接着複合体の詳細な観察を接着結合主要構成分子 VE-cadherin・ β -catenin・PECAM-1、密着結合構成分子 ZO-1 について、細胞骨格の観察を actin について、蛍光免疫染色で行った。炎症性サイトカイン、及び増殖因子には TNF- α 、VEGF-C を用いた。炎症性サイトカイン、及び増殖因子暴露時の細胞間透過性の変化を評価するため、経内皮電気抵抗(TER)を測定した。また、炎症性サイトカイン、及び増殖因子暴露時の VE-cadherin の総タンパク量の変化を評価するためウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

血管内皮細胞に比べ、リンパ管内皮細胞における細胞間接着複合体に関する詳細な研究は、研究開始当初希少であった。私は、正常リンパ管と癌新生リンパ管を比較し、癌新生リンパ管の特質性を明らかにすることを最終目的とし、その端緒としてまず正常リンパ管内皮細胞における細胞間接着複合体の詳細な観察を行った。ヒトリンパ管内皮細胞を用いた蛍光免疫染色の結果、(1)正常リンパ管内皮細胞において幾つかの細胞間接着関連分子(VE-cadherin、PECAM-1、ZO-1)の局在が異なることが判明した。野生型 HDLEC において細胞間結合は主に連続的・直線状のものと断続的でジグザグ型のものに区別される。両細胞間結合において接着結合構成分子 VE-cadherin と密着結合構成分子 ZO-1 は共局在していた。一方で細胞間辺縁に VE-cadherin が幅広に局在する領域(VE-cadherin-positive broad area と呼称した)が存在することに着目、同領域では ZO-1 の共局在は認めなかった。VE-cadherin と PECAM-1 の蛍光二重免疫染色を行った結果、連続的・直線状細胞間結合と VE-cadherin-positive broad area において両者は共局在したが、非連続的・ジグザグ型細胞間結合においては PECAM-1 の明らかな発現は認めなかった。過去の *in vivo* の研究においてもリンパ管内皮細胞の細胞間結合は主に2種類に区別され、生体内におけるリ

ンパ管の機能に關与している可能性が示唆されている(集合管における細胞間結合は連続的で血管内皮細胞のそれと類似しており、毛細リンパ管では非連続な細胞間結合が構成され組織液の流入を許容している)が、HDLEC という単一の培養細胞においてもリンパ管内皮細胞の細胞間結合は非常に heterogeneous であることが示唆された。(2)炎症性サイトカインや増殖因子等に暴露された状態におけるリンパ管内皮細胞間接着複合体の変化について検討を行った結果、TNF- α 刺激下で正常細胞における特有の VE-cadherin の局在 (VE-cadherin-positive broad area と呼称した) はほぼ消失し、細胞間透過性の亢進 (TER の低下) を認めた。また正常細胞と TNF- α 刺激細胞とで VE-cadherin の総タンパク量は不変であったことから、TNF- α により VE-cadherin の細胞膜への局在が変化していることが示唆された。



上図：ヒトリンパ管内皮細胞 (HDLEC) の細胞間結合。炎症性サイトカイン TNF- α 刺激下で細胞間透過の亢進を示唆する変化を見せた (上左図)。

上段：VE-cadherin (接着結合構成分子)

中段：ZO-1 (密着結合構成分子)

下段：actin (細胞骨格分子)

下図：拡大図 (merged)

(Kakei Y, et al. Lymphat Res Biol. 2014)

以上の研究成果を 2014 年査読付き海外雑誌でリンパの専門誌である Lymphatic Research and Biology に報告した。一方で、癌リンパ管新生に大きく關与している VEGF-C 刺激下 HDLEC における細胞間接

着複合体の変化 (蛍光免疫染色、及び TER 測定) については TNF- α 程顕著でなく (unpublished data)、VEGF-C 刺激下 HDLEC 特質性の解明には細胞増殖アッセイや管腔形成アッセイ等、幾つかの検討を追加する必要があることが判明し今後の課題と考えている。

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)

Yasumasa Kakei, Masaya Akashi, Takashi Shigeta, Takumi Hasegawa, Takahide Komori; Alteration of cell-cell junctions in cultured human lymphatic endothelial cells with inflammatory cytokine stimulation., Lymphatic Research and Biology. 2014; 12(3): 136-143.査読有

DOI: 10.1089/lrb.2013.0035.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

明石 昌也 (AKASHI, Masaya)
神戸大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：40597168

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：