

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790363

研究課題名(和文)リンパ脈管筋腫症におけるHIF-1の発現とmTOR、VEGF-Dへの関与

研究課題名(英文)Do LAM cells express VEGF-D through the activation of mTORC1/ HIF-1a/ VEGF pathway?

研究代表者

林 大久生 (HAYASHI, TAKUO)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70569128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ脈管筋腫症(LAM)でのリンパ管内皮細胞増殖因子、Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Dの発現機序の解明を目指し、重症LAM患者肺移植組織を材料とし、免疫組織化学、分子生物学的検討を行った。LAM細胞では低酸素誘導因子Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)の活性化と独立してVEGF-Dの発現制御を行っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we performed immunohistochemistry and western blot analysis to elucidate whether LAM cells express Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D through the activation of mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1)/ Hypoxia Inducible Factor-1a (HIF-1a)/ VEGF pathway. LAM cells were immunopositive for p-70S6K, p-S6, p-4E-BP1, and VEGF-D in all patients examined. On the other hand, no nuclear expression of HIF-1a was detected in any LAM cells. Western blot analysis confirmed no expression of HIF-1a in LAM cells. Our results suggest that LAM cells expressed VEGF-D though mTORC1/HIF-1a/VEGF-independent pathway.

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：呼吸器・縦隔

キーワード：リンパ脈管筋腫症 TSC遺伝子 リンパ管内皮細胞増殖因子 低酸素誘導因子

1. 研究開始当初の背景

リンパ脈管筋腫症(LAM)は、患者のほぼ全てが女性であり、肺組織破壊により呼吸不全を来す難治性疾患である。結節性硬化症(TSC)の病因遺伝子同定後、LAMの病態についての解明が急速に進み、現在では、LAM細胞はTSC遺伝子変異により mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)シグナル伝達系が恒常的に活性化した結果生ずる腫瘍細胞であり、LAMは肺や体軸リンパ節でLAM細胞が慢性の経過で増殖することにより不可逆的に進行する腫瘍性疾患と捉えられるようになった。一方、LAMは乳糜漏やリンパ浮腫等のリンパ管機能障害を特徴的な臨床像として生じうる疾患でもある。1970年代から、LAM病変内に存在するスリット状リンパ管腔がLAMの病理組織学的特徴であると認識されていたが、その後、LAM細胞がリンパ管内皮細胞増殖因子の一つであるVascular endothelial growth factor (VEGF)-Dを発現する事が報告され、LAM病変内のリンパ管腔は、LAM細胞により誘導されたVascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)陽性の新生リンパ管と認識されるようになった。さらに、LAM患者で血清中VEGF-Dが上昇していることが報告され、現在では、血中VEGF-D値はLAMの臨床診断に応用されている。

一方、生体における酸素恒常性を司る因子として報告された低酸素誘導因子Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)は、その後の研究により、酸素濃度に依存しない発現制御を示し、腫瘍の増殖・進展においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。特にmTORC1シグナル伝達系とHIF-1との関連が明らかになりつつあり、mTORC1の阻害によるHIF-1 mRNAの翻訳の抑制や、TSC2遺伝子異常を有する細胞でのHIF-1を介したPTENの発現制御が報告されている。さらに、mTORC1阻害剤であるrapamycinがVEGFを介した血管新生の阻害効果を持ち、その阻害にHIF-1が介在している可能性が示されている。

2. 研究の目的

LAM細胞でのVEGF-D発現機序の解明を目的とした。HIF-1に関するこれまでの研究から、LAM細胞ではmTORC1シグナル伝達系の恒常的活性化により、HIF-1が高発現している事が予想される。LAMでは、一層のリンパ管内皮細胞で被われたLAM細胞集塊であるLAM細胞クラスター(LCC)とリンパ管新生がLAM病変進展の中心的役割を担っている可能性がこれまでの研究で示されているが、HIF-1の発現量がVEGFファミリーの一つであるVEGF-Dの発現を制御し、それにより、リンパ管新生及びLCCを介したLAM進展が規定されている可能性がある。

3. 研究の方法

(1) LAM症例

26例の重症LAM患者の移植肺組織の集積をみる(24~55歳、全例女性)。26例中、24例がsporadic LAM患者、2例がTSC-LAM患者である。mTORC1阻害薬の投与を受けた症例なし。全例で新鮮凍結材料を保存しており、また、ホルマリン固定・パラフィン包埋材料に関しては肺野領域の切片に加え、気管支をB9方向に沿って5mm間隔で切り出しを行ったブロックを保存している。

(2) 免疫組織化学、分子生物学的検討

HIF-1, tuberin, hamartin, mTORシグナル経路関連蛋白(p-70S6K, p-S6, p-4E-BP1), VEGF-D抗体を用いた免疫染色を施行し(図1)、病理標本上でのLAM細胞の各蛋白発現に関し検討した。また、蛋白発現及びmRNA発現をウェスタンブロット法及びRT-PCRにて確認した。免疫染色は、以下の如く半定量的に測定した。0(0-5%細胞陽性), 1+(6-25%細胞陽性), 2+(26-50%細胞陽性), 3+(51-100%陽性)。

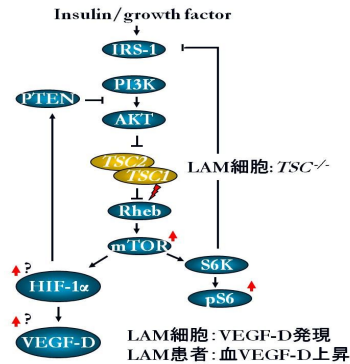


図1 PIK3-Akt-mTORシグナル伝達系とHIF1, VEGF-Dとの関連

4. 研究成果

(1) LAMではtuberin, hamartin染色パターンは2種類存在する。

移植肺組織を用いた免疫組織化学的検討では、全例において、LAM細胞がtuberin及びhamartinを発現していることが確認され、半定量測定では全例3+に相当した。しかしながら、tuberin, hamartinが細胞質に顆粒状に様々な程度で陽性を示し、陽性LAM細胞が散在性に存在するパターン(図2)と細胞質に比較的均一に強陽性を示し、陽性LAM細胞が一様に存在するパターン(図3)がみられ

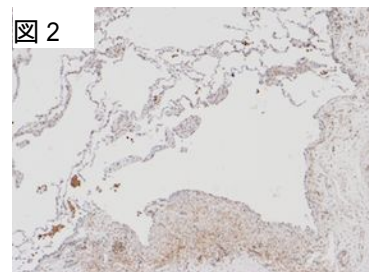


図2

た。前者が症例の大部分を占める一方、後者の染色パターンを占める症例が hamartin の 4%、tuberin の 15%で確認された。

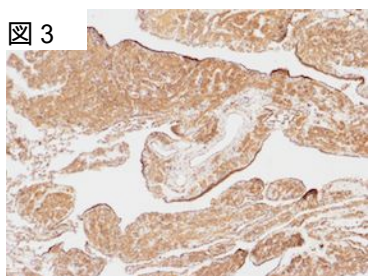


図 3
(2) LAM 細胞は mTORC1 シグナル伝達系の亢進及び VEGF-D の発現を呈する。移植肺組織を用いた免疫組織化学的検討では、全例において、LAM 細胞が p-70S6K, p-S6, p-4E-BP1 を発現していることが確認された (図 4)。半定量的測定結果を以下に示す。p-70S6K: 3+(88%)、2+(8%)、1+(4%)。p-S6: 3+(77%)、2+(15%)、1+(8%)。p-4E-BP1: 3+(42%)、2+(35%)、1+(23%)。

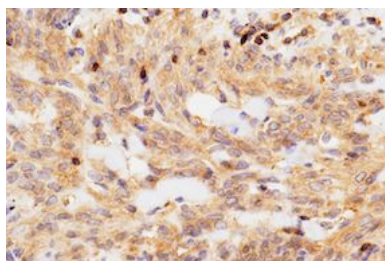


図 4 p-70S6K 染色

また、VEGF-D も全例で発現が確認され、半定量的測定では、3+(62%)、2+(23%)、1+(15%)であった (図 5)。尚、VEGF-D の発現に関して、3 例の移植肺凍結標本から切片を作成。LAM 細胞を Laser microdissection して、RNA を採取した。RT-PCR の結果、GAPDH、HMB-45、VEGF-D の発現を mRNA レベルで確認した (data not shown)。上記結果は、重症 LAM 患者における LAM 細胞が、通常 mTORC1 シグナル伝達系の活性化と VEGF-D の発現を呈している事を再確認した事を示している。

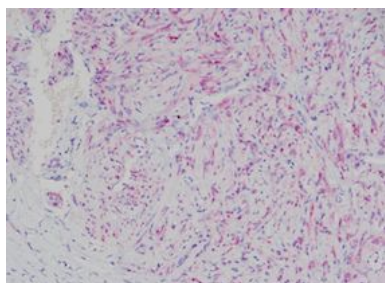


図 5 VEGF-D 染色

(3) LAM 細胞では HIF-1 核内発現はみられない。

移植肺組織を用いた免疫組織化学的検討では、全例において、LAM 細胞の HIF-1 発現は半定量的測定において 0 に相当した。尚、HIF-1 はリンパ管内皮細胞、血管内皮細胞、肺胞上皮細胞のごく一部に陽性を呈していた。LAM 細胞の HIF-1 発現に関し、HCC2935 細胞を 1% O₂, 24 時間インキュベート (SH) を陽性コントロール、室温 24 時間インキュベート (RA) を陰性コントロールとしてウエスタンブロットを行い、LAM 細胞において HIF-1 発現の無い事を確認した (図 6)。

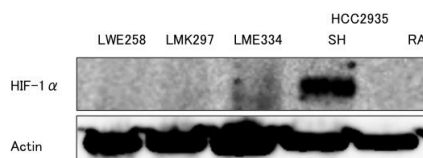


図 6 ウエスタンブロット

これらは、LAM では HIF-1 が高発現しているとの仮説とは異なる結果であった。これまでの TSC2^{-/-}細胞を用いた *in vitro* の研究では、mTORC1 の活性化が HIF-1 の発現及びそれに引き続く VEGF-A の発現を介し、血管新生を促進するモデルが考えられているが、本研究結果は LAM 細胞と *in vitro* の TSC2^{-/-}細胞では、mTOR シグナルの下流において異なるシグナル活性が起きている事、さらに、LAM 細胞が mTORC1/HIF-1 系とは独立して VEGF-D の発現制御を行っている可能性を示唆している。

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 4 件)

Hayashi T, Saito T, Fujimura T, Hara K, Takamochi K, Mitani K, Mineki R, Kazuno S, Oh S, Ueno T, Suzuki K, Yao T. Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. PLoS One. 2013 Dec 10;8(12):e81883. (査読有)

Suzuki K, Seyama K, Hayashi T, Yamashiro Y, Ashiraishi A, and Kuwatsuru R. Reversed halo sign in tuberous sclerosis complex. Case Rep Radiol. 2013;2013:428501. (査読有)

Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A Rational Diagnostic Algorithm for the Identification of ALK Rearrangement in Lung Cancer: A Comprehensive Study of Surgically Treated Japanese Patients. PLoS One. 2013 Aug 1;8(8):e69794. (査読有)

Hayashi T, Koike K, Kumasaka T, Saito T, Mitani K, Terao Y, Ogishima D, Yao T, Takeda S, Takahashi K, Seyama K.
Uterine angiosarcoma associated with lymphangioliomyomatosis in a patient with tuberous sclerosis complex: an autopsy case report with immunohistochemical and genetic analysis. Hum Pathol. 2012;43:1777-84. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

林 大久生 リンパ脈管筋腫症の病理. 第22回 Tokyo lung conference U40. 2013. 03. 21. 東京

Hayashi T, et al. Proteomic approach revealed Galectin-4 as a lymph node metastasis predictor in lung adenocarcinoma. 102nd USCAP Annual Meeting March 2-8, 2013 Baltimore Convention Center Baltimore, MD

〔図書〕(計1件)

林 大久生, 瀬山 邦明. 【最近 10 年で最も進歩した研究分野を検証する】 リンパ脈管筋腫症(LAM). 呼吸(0286-9314)31 巻 9 号 Page840-844(2012.09)

〔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://lungcare.jp/foundation.html>

The LAM Foundation, Recent Scientific Articles
<http://www.thelamfoundation.org/medical-providers/scientific-articles-lam>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 大久生 (HAYASHI Takuo)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：70569128

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし