

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860237

研究課題名(和文) ヒトpericyte特異的マーカーの検討および病理診断学への応用

研究課題名(英文) Identification of new human pericyte-specific markers and investigation of characteristic features of perivascular myoid cell neoplasms

研究代表者

目黒 史織 (Meguro, Shiori)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40724290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの遺伝子解析と免疫組織化学的検討を行い、新規pericyteマーカーとしてmyosin 1B(MYO1B)を見出した。MYO1Bとh-CDを組み合わせると、ヒト皮膚の血管壁細胞はMYO1B+h-CD-pericyte)、MYO1B+h-CD+(mural cells)、MYO1B-h-CD+(vSMC)に分類できた。ヒト皮膚perivascular tumorsの検討では、血管平滑筋腫はvSMCsの特徴を有する、グロームス腫瘍はpericyteとvSMCsの中間的特徴を有する、筋周皮腫には形態学的、免疫組織化学的に血管平滑筋腫に近い特徴を有するものがあることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to identify pericyte-specific markers for the analysis of formalin-fixed paraffin-embedded human tissue samples, and to characterize perivascular myoid cell neoplasms phenotypically. We compared gene expression profiles between pericytes, vascular smooth muscle cells (vSMCs), and fibroblasts, and performed human skin vasculature immunohistochemical analysis, which led to the identification of myosin 1B (MYO1B) as a novel pericyte marker. We investigated the expression levels of MYO1B and h-caldesmon (h-CD) in human skin vasculatures, and we found that the human skin vasculatures can be classified as follows: pericytes (MYO1B+h-CD-), mural cells (MYO1B+h-CD+), and vSMCs (MYO1B-h-CD+). We also examined the expression levels of MYO1B and h-CD in perivascular myoid cell neoplasms (angioleiomyomas, glomus tumors, and myopericytomas). The ability to distinguish between these cell types may allow us to understand the differentiation and origin of perivascular myoid cell neoplasms.

研究分野：病理学

キーワード：pericyte 血管平滑筋細胞 perivascular tumors myosin 1B

1. 研究開始当初の背景

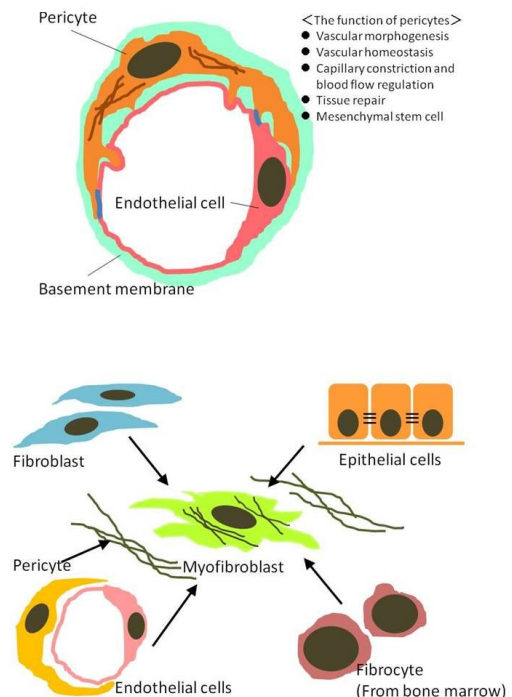
血管周皮細胞(以下 pericyte)は、微小血管(毛細血管と毛細血管後細静脈)の周囲を取り巻く細胞で、微小血管よりも径の大きな血管における血管平滑筋細胞(vascular smooth muscle cells、以下 vSMCs)に相当する。Pericyte には、血管の構築の維持、血管透過性や血流の調整などの働きがあると考えられている(Nature 368, 557-561)。例えば、脳では pericyte が多く存在し、血液脳関門の形成や脳の微小循環の制御に重要な役割を果たしている。また、pericyte は血管新生や創傷治癒の際にも重要な役割を担っている。さらに、pericyte は間葉系幹細胞の候補と考えられている。Pericyte は、以前に考えられていたような静的な細胞ではなく、多機能を有するダイナミックな細胞である可能性が強まりつつある。

様々な臓器の線維症において、線維化を引き起こす原因の細胞と注目されている筋線維芽細胞(以下 myofibroblast)の起源には、局所の線維芽細胞、骨髄由来の fibrocyte、上皮細胞からの上皮間葉転換、血管内皮細胞からの内皮間葉転換に加え、pericyte からの分化が考えられている。例えば、肝線維化で出現する myofibroblast は、pericyte の一種である肝星細胞(伊藤細胞)であると考えられている。一方、腎臓の間質の線維化で出現する myofibroblast は局所に存在する線維芽細胞(以下 fibroblast)由来が半数以上の割合を占め、pericyte 由来はわずかであるとの報告もあり、臓器により pericyte から移行した myofibroblast の占める割合は異なっているようである。しかし、pericyte の機能や分化を究明することは、臓器線維症のメカニズムを解明する上で意義深く、臓器線維症の治療に繋がると考えられる(図1)。

多機能を持つ pericyte を詳細に研究するためには、pericyte を vSMCs、fibroblast、myofibroblast および他の間葉系細胞から区別するマーカーが必要と考えられるが、pericyte 特異的なマーカーは本研究の計画を立てた時点では発見され

ていない。Neuron-gial antigen 2 (NG2)、platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFRB)、CD146 および alpha-smooth muscle actin(αSMA)などがマウスの pericyte マーカーとして用いられているものの、それらは血管平滑筋、血管内皮、fibroblast および myofibroblast などにおいても発現しており、pericyte のみに特異的に発現しているマーカーではない。例えば、マウスの線維化した臓器において、NG2 や FoxD1 を用いた fate mapping 解析が行われているが、NG2 や FoxD1 は pericyte 以外にも vSMCs や線維芽細胞の一部にも発現している(F1000Prime Rep. 2013; 5: 37)、NG2 や FoxD1 は pericyte 特異的なマーカーとしては不適當であると言わざるを得ない。理想的な pericyte 特異的なマーカーが発見されれば、それを利用して pericyte を単離することが可能となり、pericyte の生理的機能などをより明らかにすることができる。そして、pericyte 特異的なマーカーは fate mapping にも活用できると考えられる。

図1



2. 研究の目的

Pericyte の機能および分化を究明するためには、pericyte を他の細胞から区別するマーカーが必要である。現在、げっ歯類の pericyte に発現するタンパク質はいくつか知られているが、特異的に発現するマーカーは見出されていない。同様にヒトの pericyte に特異的に発現するマーカーも見出されていない。Pericyte 特異的なマーカーが発見されれば、pericyte の生理的機能および病気との関連性を現在より明らかにすることができると思われる。そこで、以下にあげる項目を目的として今回の研究を計画した。

ヒトおよびマウス pericyte に特異的なマーカーを検索する。

Pericyte 特異的なマーカーを軟部腫瘍の病理診断学へ応用する。

Pericyte 特異的なマーカーのプロモーターに依存して DsRed を発現するトランスジェニックマウスを作製し、pericyte の至適培養条件の決定と pericyte 間葉系幹細胞説を検討する。Pericyte 特異的なマーカーの fate-mapping study による、pericyte の fibroblast および myofibroblast への分化を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒトおよびマウスの pericyte 特異的なマーカーの検索を行った。マウス pericytes/vSMCs、vSMCs、および fibroblasts の細胞群の遺伝子プロファイルと比較し、pericyte 特異的なマーカー候補を検索した。NG2(マウスの pericyte と vSMCs に発現)のプロモーター下流に *DsRed* 遺伝子が挿入されている *NG2DsRedTg* マウスの肺から $NG2^{pos}CD146^{pos}lin^{neg}$ (pericytes/vSMCs) の細胞群、大動脈から平滑筋細胞 $NG2^{pos}CD146^{pos}lin^{neg}$ (vSMCs) の細胞群、肺から $Sca-1^{high}NG2^{neg}lin^{neg}$ (fibroblasts) の細胞群を取り出した。それら 3 種の細胞群の RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて、遺伝子発現プロファイルと比較、pericytes/vSMCs 細胞群に高発現している遺伝子を特定した。次に、それらの遺伝子の定量的

逆転写 PCR (qRT-PCR) を行い、遺伝子発現量の多い遺伝子を選出した。さらに肺の血管内皮細胞や上皮細胞と比較し、pericyte 特異的なマーカーの候補を選びだした。各 pericyte 特異的なマーカー候補に関して、ヒト正常皮膚の 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋材料における発現を免疫組織化学的に検討し、pericyte 特異的なマーカーを同定した。

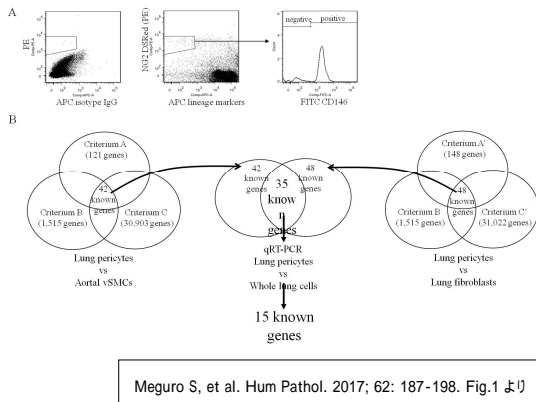
(2) 上記の方法により、新しい pericyte のマーカーとして、myosin 1B (MYO1B) を同定した。そこで、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋ヒト皮膚材料において、皮膚血管における MYO1B と平滑筋マーカーである high-molecular weight caldesmon (h-CD) の発現を検討し、血管の太さにより発現パターンに違いがみられるかを検討した。

(3) ヒト皮膚 perivascular tumors における腫瘍細胞の pericyte への分化を検討した。浜松医科大学付属病院におけるヒト皮膚 perivascular tumors 54 例 (angioliomyoma 28 例、glomus tumor 23 例、myopericytoma 3 例) の手術材料で、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋された標本を用いて MYO1B と h-CD の免疫染色を行い、各々の成分を半定量的に評価した。また、電子顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現プロファイルを比較した結果、pericyte/vSMCs 細胞群に高発現している 35 個の遺伝子を特定した。次に、35 個の遺伝子の qRT-PCR を行い、遺伝子発現量の多い遺伝子を選出、さらに肺の血管内皮細胞や上皮細胞と比較した結果、15 個の遺伝子が pericyte 特異的なマーカー候補と考えられた (図 2)。15 個の pericyte 特異的なマーカー候補の分子の中でも、MYO1B がヒト皮膚の毛細血管の pericyte に発現していたが、vSMCs と fibroblasts には発現していないことを確認した。

図 2



Meguro S, et al. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198. Fig.1 より

(2) 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋ヒト皮膚材料において、MYO1B と h-CD の免疫染色を行ったところ、真皮乳頭の capillary loop ~ 乳頭下血管叢の静脈 (superficial venular plexus) では MYO1B⁺ h-CD⁻、乳頭下血管叢の動脈 (superficial arteriolar plexus) では MYO1B⁺ h-CD⁺、communicating arteriole/venule、皮下血管叢 (deep vascular plexus)、皮下脂肪組織の小血管は MYO1B⁻ h-CD⁺を示した (図 3)。

図 3

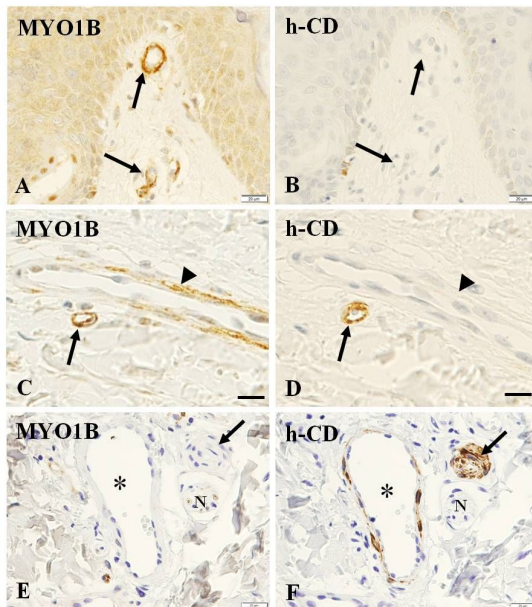


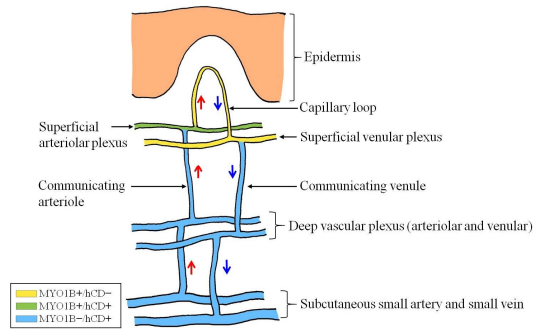
図 3. ヒト皮膚の血管における MYO1B と h-CD の免疫組織化学的な検討

- A, B: 皮膚真皮乳頭の capillary loop (矢印)
- C, D: Superficial arteriolar plexus (矢印) と superficial venular plexus (矢頭)
- E, F: Communicating arteriole (矢印) と communicating venules (矢頭)

Meguro S, et al. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198. Fig.2 改編

したがって、MYO1B と h-CD を組み合わせることで、皮膚の血管壁細胞は MYO1B⁺ h-CD⁻ である pericyte、MYO1B⁺ h-CD⁺ である mural cells および MYO1B⁻ h-CD⁺ である vSMC に分類できると考えられた (図 4)。

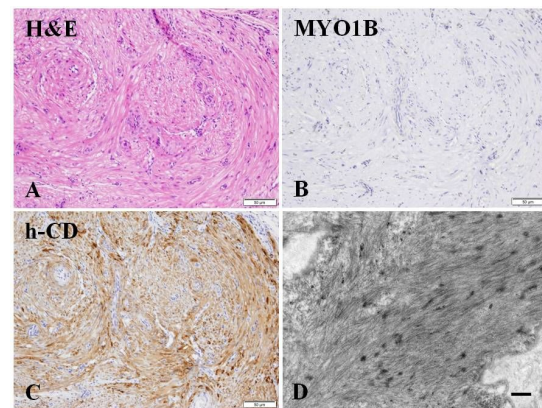
図 4



Meguro S, et al. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198. Fig.3 より

(3) ヒト皮膚 perivascular tumors 54 例 (angioleiomyomas 28 例、glomus tumors 23 例、myopericytomas 3 例) の手術材料で MYO1B と h-CD の免疫染色を行い、各々の成分を半定量的に評価した。その結果、angioleiomyoma は殆どの症例 (24 例) が MYO1B⁻ h-CD⁺ の細胞のみから構成されていた (図 5)。残りの 4 例も大部分が MYO1B⁻ h-CD⁺ で、MYO1B⁺ h-CD⁻ の細胞が少数混在していた。

図 5

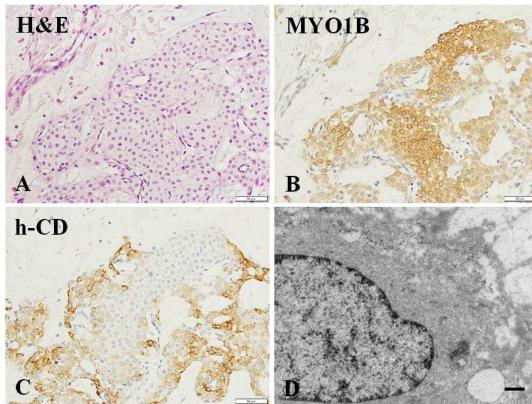


Angioleiomyoma の代表例。D: 透過型電子顕微鏡。スケールバー 0.5 μm

Meguro S, et al. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198. Fig.4 改編

Glomus tumor は主に MYO1B⁺ h-CD⁺ を示したが、症例によっては MYO1B⁺ h-CD⁻ や MYO1B⁻ h-CD⁺ が様々な割合で混在していた (図 6)。

図 6

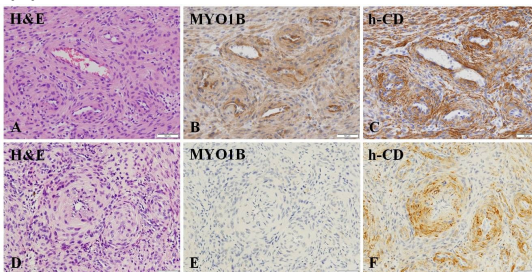


Glomus tumor の代表例。D: 透過型電子顕微鏡。スケールバー 0.5 μm。

Meguro S, et al. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198. Fig.5 改編

また myopericytoma は、3 例中 2 例は MYO1B⁺ h-CD⁻ と MYO1B⁺ h-CD⁺ が混在していたが、1 例は主に MYO1B⁺ h-CD⁺ から成り、MYO1B⁺ h-CD⁻ の細胞が少数混在するというパターンであった (angioleiomyoma に類似したパターン) (図 7)。

図 7



Myopericytoma 2 例 (A-C, D-E)。A-C の腫瘍は主に MYO1B⁺ h-CD⁺ を示すが、

D-F の腫瘍は MYO1B⁺ h-CD⁻ のパターンを示した。

Meguro S, et al. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198. Fig.4 改編

以上の結果からは、angioleiomyoma は vSMCs の特徴を有していること (MYO1B⁺ h-CD⁺)、glomus tumor は全例 pericyte と vSMCs の中間の特徴を有する細胞 (MYO1B⁺ h-CD⁺) から主に構成されているが、pericyte (MYO1B⁺ h-CD⁻) や vSMCs (MYO1B⁺ h-CD⁺) の特徴を有する細胞も混在していること、myopericytoma はしばしば形態学的に angioleiomyoma を鑑別が難しい症例が存在するが、免疫組織化学的にも、angioleiomyoma に類似した形質を示す症例が存在することがわかった。

今後の研究活動に関しては、MYO1B と h-CD を

用い、perivascular tumor とされている他の腫瘍についても pericyte 分化の検討をしたいと考えている。例えば、主に鼻腔や副鼻腔に発生する腫瘍に “glomangiopericytoma” (かつては sinonasal type の hemangiopericytoma とよばれていた) があり、電子顕微鏡による観察では pericyte の特徴を有しているとの報告がある。皮膚の perivascular tumor の時と同様に、免疫組織化学的に MYO1B と h-CD の発現を検討し、鼻腔の “glomangiopericytoma” の特徴を明らかにしたい。結果によっては、MYO1B は鼻腔の “glomangiopericytoma” を診断する際の良いマーカーとなる可能性がある。また、MYO1B⁺ h-CD⁻ の細胞のみから成る (腫瘍全体が pericyte の特徴を有している) 腫瘍が存在するのにも興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 1 件)

Meguro S, Akamatsu T, Matsushima S, Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Baba S, Tsuchida T, Shido Y, Suda T, Iwashita T. Phenotypic characterization of perivascular myoid cell neoplasms, using myosin 1B, a newly identified human pericyte marker. Hum Pathol. 2017; 62: 187-198.

(学会発表) (計 2 件)

目黒史織, 赤松泰介, 松島紗代実, 坂尾万幾子, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 岩下寿秀: 新しいヒト pericyte 特異的マーカーの同定および病理診断学への応用. 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島.

目黒史織, 松島紗代実, 坂尾万幾子, 河崎秀陽, 土田孝, 小杉伊三夫, 馬場聡, 岩下寿秀: Myosin 1B を用いた perivascular myoid tumors における pericyte の特徴を有する細胞の同定. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年 5 月 12-14 日, 仙台.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目黒史織 (MEGURO, Shiori)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40724290