

論文題目 Establishment of human benign hemangioma-derived cell line AG1
and comparison with human endothelial cell
(ヒト良性血管腫組織由来細胞株 AG1 の樹立とその内皮細胞
との類似性の検討)

指導教官 澁谷 正史 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 12 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
氏名 増渕 和博

<背景>

血管新生は、胎生期初期から循環器系の形成や組織の栄養血管として組織構築に関与し、重要な役割を果たしている。成熟個体の雌においては、性周期に伴う黄体形成・子宮内膜の増生・胎盤形成に関与する。病的血管新生としては、炎症・創傷治癒過程・糖尿病性網膜症・さらには腫瘍増殖時における血管新生が挙げられる。また、リンパ管新生も、胎生期初期からのリンパ管形成に加えて、腫瘍の転移・組織老廃物の運搬や浮腫の形成に関与し、血管新生と同様に重要な役割を果たしている。

以上のような重要性にも関わらず、血管新生・リンパ管新生の研究が遅延していた理由が大きく二つ挙げられる。一つは、血管・リンパ管新生に特異的に関与する分子群が長い間不明であったためである。近年、血管内皮細胞増殖因子 VEGF (vascular endothelial growth factor) ファミリーとその受容体である VEGFR(VEGF receptor)ファミリーが発見された。成熟個体において VEGFR1 (Flt-1)・VEGFR2 (KDR) は主として血管内皮細胞に、VEGFR3 (Flt-4) は主としてリンパ管内皮細胞に発現している。また、VE-Cadherin (Cadherin-5)・Tie2 のような血管内皮細胞特異的なマーカー分子、LYVE-1・podoplanin のようなリンパ管内皮細胞特異的なマーカー分子や、血管・リンパ管内皮細胞両方に発現する CD31 が報告されている。もう一つの理由は、内皮細胞由来の細胞株の樹

立が非常に困難であったためである。成熟個体内のほとんどの内皮細胞は増殖が停止した状態で機能しており、株化後にはその本来の特徴が喪失されてしまうため、細胞株で有用なものはほとんど存在しない。過去の報告の例でも、VEGF-VEGFR 系に言及していないものがほとんどであり、血管内皮の特徴を十分に保持しているとは言い難い。

培養や実験への応用が簡便であり、均一なサンプルを大量にかつ容易に得ることが出来る細胞株の存在が、分子生物学・細胞生物学の研究に大きく寄与してきたことは言うまでもなく、血管新生・リンパ管新生の研究にも有用な細胞株の樹立は大きな意義があり、現在も急務とされている。我々が内皮細胞由来の細胞株を樹立するに当たり、血管の機能を保ちつつ数十年かけてわずかに体積を増すヒトの良性血管腫組織に注目した。ヒト良性血管腫組織から樹立したこの細胞株を AG1 と命名した。また、AG1 からのシングルクローンとしてそれぞれ F4・F5・G1・G2 クローンを樹立した。以上の細胞株を解析し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) との類似性を検討した。

<結果>

ヒト良性血管腫組織を患者から切除後、速やかにミンスし培養を開始した。この際光顕上ではブラスト系の細胞は一切見られなかった。シャーレ上でコンフルエントになった組織細胞は増殖が停止してしまっただため、SV40 の T 抗原を用いて不死化させた。AG1 シリーズすべての細胞株で、T 抗原タンパクの発現が確認された。

はじめに、AG1 シリーズの染色体を解析した。平均染色体数は、AG1 で 61.5 本、F5 クローンで 104.1 本、G1 クローンで 60.1 本であった。また、染色体検査も行ったが、血管・リンパ管特異的な遺伝子群の転位・転座は見られなかった。次に、AG1 シリーズの倍加成長時間を測定した。シャーレに 1.0×10^4 個細胞を蒔いて 10 日間測定したところ、AG1 で 31.3 時間、F4 クローンで 29.8 時間、F5 クローンで 49.6 時間、G1 クローンで 28.7 時間、G2 クローンで 34.2 時間であった。VEGF を添加した培養液中での AG1 の倍加成長時間は 33.8 時間であり、非添加群との差は見られなかった。

AG1 シリーズにおいて、血管内皮細胞の特徴として古くから知られているアセチル LDL (low density lipoprotein) の細胞内への取り込みが蛍光顕微鏡で確

認された。また、血管内皮のマーカー分子である VE-Cadherin タンパクの発現が AG1 シリーズにおいて確認され、上皮のマーカー分子である E-Cadherin タンパクの発現は確認されなかった。

AG1 シリーズにおいて、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3 の発現が RT-PCR によって確認された。また、いくつかのクローンにおいて、血管内皮マーカーである vWF (von Willebrand factor)、CD31、Tie2 の発現が RT-PCR によって確認された。その他の血管内皮マーカーとして、Tie1、Neuropilin-1、EphB4 の発現がすべてのクローンにおいて RT-PCR で確認された。さらに、胎生期の血管形成・リンパ管形成に関わるホメオボックス転写因子であり、リンパ管特異的なマーカーである Prox1 の発現が G1 クローンにおいて RT-PCR で確認された。リンパ内皮細胞の表面マーカーである podoplanin、LYVE-1 の発現は AG1 シリーズにおいて確認されなかった。

AG1 シリーズにおいて RT-PCR で発現が確認された VEGFR1、VEGFR2 は、ウェスタンブロット法では発現が確認されず、VEGF-A 刺激によるリン酸化も確認されなかった。また、RT-PCR で発現が確認された VEGFR3 は、ウェスタンブロット法において発現が確認されたが、VEGF-C 刺激によるリン酸化は確認されなかった。さらに、VEGF-A、VEGF-C 刺激による MAPK (mitogen-activated protein kinase) のリン酸化も確認されなかった。

AG1 シリーズは、ラミニン・フィブロネクチン・コラーゲン IV などの基底膜成分を含む MATRIGEL 上で培養すると、HUVEC と同様の蜂の巣状のネットワークを形成した。HUVEC の形成したネットワークは 72 時間後には崩壊しているにもかかわらず、AG1 シリーズの形成したネットワークは 72 時間以降も継続され、かつネットワークが増強された。

ヒト繊維芽細胞単層培養上において HUVEC は、増殖因子存在下で細胞同士が細長い管腔を形成することが確認されている。同様に、ヒト繊維芽細胞単層培養上で、HUVEC と AG1 シリーズを共培養すると、HUVEC が形成する管腔の近辺に極めて多くの AG1 シリーズ細胞が確認された。

<考察>

血管内皮の機能を保持しつつ、よく増殖する細胞株の樹立を目標に置いて、由来組織としてヒト良性血管腫に注目したが、作成初期において増殖は停止してしまった。そのため、慣習的な SV40 T 抗原での不死化を試みたところ、倍

加成長時間が 30 時間前後の実用的な細胞株が得られた。また、古くから報告されている血管内皮由来細胞株の特徴である、平面培養時における敷石状の外観・アセチル LDL の細胞内への取り込み・vWF の発現・MATRIGEL 上でのネットワーク形成が確認された。

一部のクローンにおいて、vWF 及び CD31 の発現が RT-PCR によって確認されたが、免疫染色では発現が確認されなかった。同様に、VEGFR1・VEGFR2・VEGFR3 の発現が RT-PCR で確認されたが、VEGFR1 及び VEGFR2 タンパクの発現はウェスタンブロットでは確認されなかった。以上のことは、株化に際して血管内皮の性質が幾ばくか喪失され、発現が低下したことを示唆している。VEGFR3 タンパクの発現は確認されたが、VEGF-C 刺激によるリン酸化は確認されなかった。VEGF-A・VEGF-C 刺激に際して、血清非添加培養液で 12 時間前培養したが、それでも MAPK のリン酸化レベルは高く、AG1 シリーズにおいてはリガンド刺激による影響を評価しにくい可能性が示唆された。

AG1 シリーズにおいて、血管内皮の細胞表面マーカーである VE-Cadherin タンパクの発現が確認された。この結果は、AG1 細胞同士の細胞接着が強固であることを示唆し、また、MATRIGEL 上でのネットワーク形成が長時間持続することとの関連も示唆される。また、HUVEC、ヒト繊維芽細胞との共培養系において、AG1 シリーズの細胞が HUVEC の極めて近位で存在していることが確認された。これは、VE-Cadherin タンパクの発現は強いものの血管内皮の機能が幾ばくか喪失されてしまったため、HUVEC との管腔形成に参加できない可能性があるが示唆される。あるいは、成人においてはリンパ管内皮細胞に発現が限局している VEGFR3 タンパクの発現や、G1 クローンにおけるリンパ管内皮の転写因子 Prox1 の発現など、血管内皮だけではなくリンパ管内皮様の特徴も示していることから、むしろ血管内皮とはネットワーク形成にあえて参加しなかった可能性も示唆される。

AG1 シリーズの各クローンにおける血管内皮・リンパ管内皮マーカーの発現の強弱・有無から判断して、血管腫組織はマルチクローナルに形成されたことが示唆される。また、AG1 シリーズが血管内皮だけではなくリンパ管内皮の特徴も示す傾向があることは非常に興味深く、血管腫の発生機序の解析も含めて議論・利用されるべきことが少なくない。以上のように、AG1 シリーズは慣習的な血管内皮細胞の特徴を保持していることに加えて、血管とリンパ管の相同性・相違性・分化などの研究に有用な細胞株であることが示唆される。