

リンパ脈管筋腫症（LAM）における LAM幹細胞を介した病変形成機構の解明



順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学講座 非常勤助教 安藤 克利

【研究目的】

リンパ脈管筋腫症 lymphangioleiomyomatosis（LAM）は、生殖可能年齢の女性に発症し、肺や体軸リンパ系においてLAM細胞が増殖することにより生じる腫瘍性疾患です。肺には多発の嚢胞が形成され、気胸、呼吸困難などの呼吸器症状で発症し、緩徐に進行することで重症例では呼吸不全に至り肺移植を必要とします。その発症頻度は約1.9～4.5人/100万人と希少ではありますが、日本の脳死肺移植施行例の基礎疾患として最も多いことが報告されています。このため、LAMの病因・病態の解明・新規治療法の開発は重要な課題ではありますが、未だLAMの発病・病態進展機構は明らかにされていません。

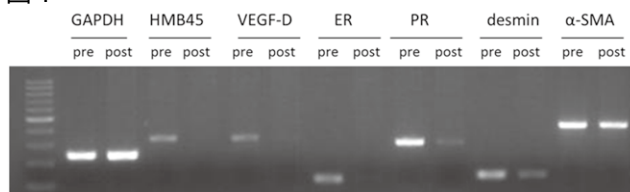
一般的に腫瘍細胞集団には、腫瘍幹細胞が存在し、増殖の早い腫瘍細胞を供給し続ける病態が知られています。実際、癌領域では、癌幹細胞が、癌の再発・転移や治療抵抗性など癌進展現象を理解する上で重要である一方、“幹”細胞としての形質を失わせることで、腫瘍原生能が消失し“根治”へとつながる可能性が指摘されています。私達は、未同定のLAM病態に関して、「LAMの肺病変は、LAM幹細胞とLAM幹細胞から誘導されたLAM細胞により構成される」といった、“LAM幹細胞”と呼ばれる細胞集団の存在・重要性に着目し、研究を推進してきました。

今回、私達は難病医学研究財団の平成27年度医学研究奨励助成金を受け、LAM幹細胞を介した病変形成機構を解明するため、1）ヒトLAM細胞の培養法・細胞株の確立、2）LAMのモデル動物作成、及び、3）LAM幹細胞の多能性の証明、の三項目について取り組んできました。

【背景】

私達は、肺移植や気胸手術時に採取されたLAM患者さんの肺組織から、LAM細胞、リンパ管内皮細胞、等、LAM病変を構成する各細胞集団をfluorescence activated cell sorting（FACS）により分離する手法を確立することに世界で初めて成功し、昨年その手法について論文報告しました（AJP Lung Cell Mol Physiol. 2016; 310: L899-L908）。一方、分離したLAM細胞は、平滑筋細胞用基礎培地条件下で培養すると、1）細胞形態が線維芽細胞様に変化し、分離時には確認されたHMB45、VEGF-D、女性ホルモンレセプター、等LAM細胞マーカーの発現が消失すること（図1）、2）Oct-4やSox-2をはじめとする幹細胞維持に必要な転写因子の発現が培養後に数十分の一まで低下すること（図2）、等の現象が確認されました。即ち、これらの研究結果からは、LAMの主病態がLAM幹細胞によって形成されている可能性が示唆されました。

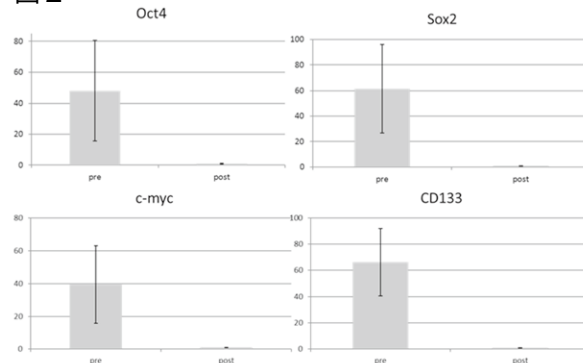
図1



Pre:培養開始時、Post:培養後

図1: 分離時には確認されたHMB45、VEGF-D、エストロゲンレセプター(ER)やプロゲステロンレセプター(PR)、等のLAM細胞マーカーの発現は培養後に消失した。図2: Oct-4、Sox-2、等の幹細胞維持に必要な転写因子の発現が培養後に数十分の一まで低下した。

図2



【研究成果】

1. 組織からのFACS法による LAM 細胞、LAM 幹細胞の分離

気胸手術時に摘出されたLAM患者さんの肺組織を蛋白分解酵素で消化し、細胞浮遊液を調整します。その後、autoMACS Separator、BD FACS AriaII cell sorterを用いて、CD45に対する抗体により血球系細胞、及び7-AADにより死細胞を除去し、CD34・EpCAM・podoplanin陰性、CD90陽性のLAM細胞の他、EpCAM陰性、podoplanin陽性リンパ管内皮細胞を各表面抗原に対する抗体を用いて分離します。昨年度は、移植肺が得られず、気胸手術時に摘出された肺組織での実験が主体でありましたが、再現性をもって各細胞集団を分離することができました。一方、移植肺以外の場合、検体の大きさが小さく、研究遂行に充分な量の細胞が得られないことが課題にあがりました。

2. LAM細胞の培養法の確立

背景の項で示す通り、分離したLAM細胞集団は、平滑筋細胞用初代培養用メディウムを用いて二次元培養すると、LAM細胞マーカー発現が消失すること、幹細胞性を示唆する転写因子発現が低下すること、が確認されています。一方、幹細胞性を維持するには、1) Nicheと呼ばれる微小環境の存在が必要であり、feeder細胞（線維芽細胞など）との共培養が重要であること、2) Y-27632 (Rho結合キナーゼ阻害薬 [ROCK inhibitor]) の存在により生存率が向上すること、が報告されています (Nature Bio 2007; 25; 681)。このため、私達は、分離LAM細胞をY-27632添加条件下での三次元培養や培養リンパ管内皮細胞との共培養を試みました。しかし、結果的に、これらの条件では効率的にLAM細胞が培養されませんでした。

3. ヒトLAM細胞株の樹立

hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子を導入することにより細胞を生理的条件下に不死化して細胞株を樹立できることが知られています。私達は、ヒトLAM細胞株を樹立するため、上記2の手法を確立した後、培養された細胞にhTERTを導入するという研究計画を構築していました。しかし、上記手法ではLAM細胞の培養が困難であることが判明しました。このため計画を変更し、LAM細胞を分離・培養開始後早期の段階で、hTERTを遺伝子導入し、その後再度LAM細胞マーカーを有する（幹細胞性を維持する）細胞集団をFACSで分離する、という手法を試みました。その結果、1例のみですが、分離・培養LAM細胞集団にhTERTを遺伝子導入することに成功いたしました。今後、これらの細胞集団からLAM細胞マーカーを有する細胞集団の分離手法を確立していきたいと考えています。

【今後の課題】

昨年度の研究により、hTERT遺伝子を導入された培養LAM細胞集団から、LAM細胞マーカーを有する細胞を分離することで、ヒトLAM細胞株を樹立できる可能性が示唆されました。検体量の少ない組織からどのように効率的にLAM細胞を分離するか、等の課題も見つかりましたが、今年度は、昨年度の成果の再現性を確認する他、1) 樹立されたLAM細胞株を用いて、動物モデル作成を試みる、2) 培養条件にVEGF-AやVEGF-D（リンパ管内皮細胞増殖因子）を添加し、他の細胞に分化誘導できるか幹細胞性を証明するための研究を進めていく予定としています。

本研究をご支援いただいた難病医学研究財団ならびに関係者の皆様に深く感謝いたします。