

修士学位論文

ヒト肺がん腫瘍血管内皮細胞における
PDGFR - β と EGFR の発現変化についての検討

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野
平成 19 年度入学 学生証番号 076529

鈴木 丞

指導教官 落合 淳志 教授

目次

| | |
|--|----|
| 1. 要旨 | 3 |
| 2. Summary | 5 |
| 3. 略語表 | 7 |
| 4. 序論 | 8 |
| 5. 材料と方法 | 11 |
| 5-1. 組織免疫染色 | |
| 5-2. 酵素処理による組織からの細胞回収 | |
| 5-2-1. 組織からの血管内皮細胞分離条件の検討 | |
| 5-2-2. 組織から回収した血管内皮細胞における細胞表面マーカーの解析 | |
| 5-3. 組織から回収した細胞の培養 | |
| 5-4. 血管内皮細胞の単離・培養 | |
| 5-4-1. tube formation assay | |
| 5-4-2. 血管内皮細胞マーカーの発現解析 | |
| 5-5. がん培養上清刺激による PDGFR- β の発現変化 | |
| 5-5-1. がん培養上清の調整 | |
| 5-5-2. フローサイトメトリーを用いた PDGFR- β , EGFR の発現解析 | |
| 5-6. 統計計算 | |
| 6. 結果 | 22 |
| 6-1. 肺扁平上皮がん、腺がん組織の血管内皮細胞での PDGFR- β , EGFR の発現 組織免疫染色による評価 | |
| 6-2. 酵素処理による組織からの細胞回収 | |

| | | |
|--------|--|----|
| 6-3. | 組織から回収した細胞の培養 | |
| 6-4. | 血管内皮細胞の単離・培養 | |
| 6-5. | がん培養上清による PDGFR- β の発現変化 | |
| 7. | 考察 | 27 |
| 7-1. | 肺がん組織の組織免疫染色 ; PEGFR- β と EGFR の発現 | |
| 7-1-1. | 腫瘍血管内皮細胞における PDGFR- β 、EGFR の発現 | |
| 7-1-2. | ヒト肺がん組織型間の血管内皮細胞における PDGFR- β 陽性率の違い | |
| 7-2. | 組織からの血管内皮細胞の単離 | |
| 7-2-1. | 組織から血管内皮細胞分離条件の検討 | |
| 7-2-2. | 組織から回収した細胞集団中の血管内皮細胞マーカー陽性細胞の同定 | |
| 7-2-3. | 血管内皮細胞の同定 | |
| 7-2-4. | 腫瘍組織からの血管内皮細胞の単離・培養 | |
| 7-2-5. | 組織から回収した細胞についての PDGFR- β と EGFR の発現解析 | |
| 7-3. | PDGFR- β の発現機構の解析 ; がん培養上清の刺激に対する PDGFR- β の発現変化 | |
| 7-4. | 総括 | |
| 8. | 図表 | 35 |
| 9. | 参考文献 | 52 |
| 10. | 謝辞 | 55 |

ヒト肺がん腫瘍血管内皮細胞における PDGFR- β と EGFR の発現変化についての検討

2009年3月修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学籍番号 076529 鈴木 丞

指導教員 落合 淳志 教授

キーワード：血管内皮細胞、PDGFR- β 、EGFR

【序論】

がん組織形成過程において、線維芽細胞、血管構成細胞、炎症細胞（リンパ球、単球など）などの間質細胞は、がん組織内に多数動員され、がん組織の形成に関わるとともに、がんの進展に促進的に働くことが知られている。動員されたこれらの細胞は、がん細胞との相互作用を介し、特異な構造のおよび生物学的性質を獲得する。

血管新生により誘導される腫瘍血管は、酸素や栄養を供給し、がんの増殖を助ける重要な組織構成成分である。近年、正常組織の血管と腫瘍組織の血管は、構造上の違いだけでなく、血管を構成する内皮細胞の性質も異なることが報告されている。CD137 や CD276 などは腫瘍血管内皮細胞特異的な発現亢進が確認され、Tumor endothelial markers (TEMs) として定義されている。Platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) と epidermal growth factor receptor (EGFR) は、線維芽細胞や上皮細胞に発現している膜貫通型レセプターで、細胞内ドメインのチロシンキナーゼに対する阻害剤が、或る種のがんの分子標的薬として使用されている。また PDGFR- β と EGFR は、乳がん組織内の血管内皮細胞においても発現亢進していることが組織切片上示されており、腫瘍血管の標的分子となり得る可能性が考えられている。

本研究は、ヒト肺がん組織の腫瘍血管内皮細胞における PDGFR- β と EGFR の発現変化に着目し、その発現変化の分子機構、生理的な意義を検討することを目的とした。

【結果】

ヒト肺扁平上皮がん、腺がん組織における PDGFR- β と EGFR の発現 組織免疫染色による検討

ヒト肺腺がん組織 1) 肺胞上皮置換型、2) 乳管型、3) 管腔形成型、4) 充実胞巣型、とヒト肺扁平上皮がん組織の腫瘍部の血管内皮細胞と非腫瘍部の血管内皮細胞における PDGFR- β と EGFR の発現変化を組織免疫染色で評価した。PDGFR- β の陽性率は、腺がんのサブタイプである 1) 肺胞上皮置換型では非腫瘍部 $4.8 \pm 4.3\%$ 、腫瘍部 $32.6 \pm 8.6\%$ 、2) 乳管型では非腫瘍部 $8.1 \pm 25.8\%$ 、腫瘍部 $54.1 \pm 25.8\%$ 、3) 管腔形成型では非腫瘍部 $9.4 \pm 6.3\%$ 、腫瘍部 $28.2 \pm 10.7\%$ 、4) 充実胞巣型では非腫瘍部 $6.2 \pm 3.7\%$ 、腫瘍部 $43.6 \pm 21.3\%$ であった。扁平上皮がんでは非腫瘍部 $25.1 \pm 11.4\%$ 、腫瘍部 $62.7 \pm 16.6\%$ だった。各組織とも、非腫瘍部に比べ腫瘍部の血管内皮細胞で PDGFR- β の発現が有意に亢進していることが示された ($p < 0.01$) (Fig 1)。腺がんの 1) 肺胞上皮置換型と扁平上皮がん、また、腺がんの 3) 管腔形成型と扁平上皮がんの間で、腫瘍血管内皮における PDGFR- β の陽性率に有意な差を認めた ($p < 0.01$) (Fig 1)。EGFR については、今回の免疫染色では、発現が確認出来なかった。

ヒト肺組織から分離した血管内皮細胞における PDGFR- β と EGFR の発現 フローサイトメーターによる解析

腫瘍血管内皮細胞について機能解析を行うには、組織からの血管内皮細胞の単離・培養が必要と考えた。ヒト肺がん組織を酵素処理後、細胞を分離し、その中に含まれる血管内皮細胞における PDGFR- β と EGFR の発現について、フローサイトメーターで解析を行った。非腫瘍部由来の血管内皮細胞における PDGFR- β の陽性率は、 $19.6 \pm 21.3\%$ であった。一方、腫瘍部由来の血管内皮細胞における陽性率は、 $50.2 \pm 30.4\%$ であり、腫瘍血管内皮細胞で有意な発現亢進を認めた ($p < 0.01$) (Fig 2 上図)。また、EGFR の陽性率は、非腫瘍部由来の血管内皮細胞で $23.4 \pm 31.1\%$ 、腫瘍部由来の血管内皮細胞で 31.9 ± 35.3 であり、有意な発現亢進を認めることは出来なかった ($p = 0.52$) (Fig 2 下図)。

ヒト肺組織からの血管内皮細胞の単離・培養

ヒト肺組織からの血管内皮細胞の単離・培養を試みた。非腫瘍部組織から CD31 陽性細胞を microbeads 法で単離し、増殖した細胞について、血管内皮細胞の特徴的な性質である管形成能と血管内皮細胞マーカーの発現を解析した。単離・培養した CD31 陽性細胞は、管形成能を示した。また、血管内皮細胞マーカーである VE-Cadherin と VEGFR-2 の発現を確認することが出来た (Fig 3)。腫瘍組織からも同様の方法で血管内皮細胞の単離・培養を 12 例試みたが、現時点ではまだ成功していない。

【考察】

今回の検討によって、ヒト肺がん組織の腫瘍血管内皮細胞で、PDGFR- β の発現が亢進していることが示された。加えて組織免疫染色の結果は、腫瘍血管における内皮細胞の PDGFR- β 陽性率は、組織型の間でも異なるということを示した。腫瘍血管内皮に対する標的分子を検索する際は、正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞の比較だけでなく、腫瘍組織型毎に腫瘍血管内皮を比較していくことも重要になると考えている。今後の課題は、今回明らかになった PDGFR- β 発現亢進の生理的な意味を明らかにすることである。正常組織からの血管内皮細胞の単離・培養は成功したが、腫瘍組織からの単離・培養は困難であった。腫瘍組織由来の血管内皮細胞の機能解析を行うためにも、さらに効率の良い細胞単離法・培養法の開発が必要である。

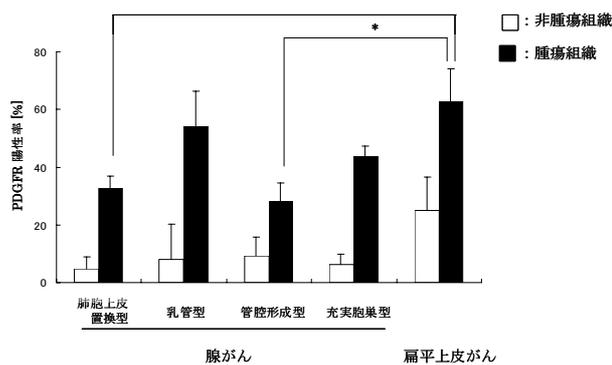


Figure 1. ヒト肺がん組織の腫瘍血管内皮細胞での PDGFR- β 陽性率 組織免疫染色での評価を数値化したグラフ

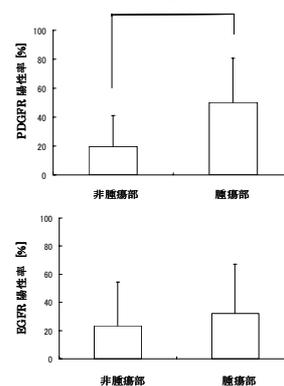


Figure 2. 非腫瘍部、腫瘍部から回収した血管内皮細胞での PDGFR- β (上図) と EGFR (下図) の発現 フローサイトメーターによる解析

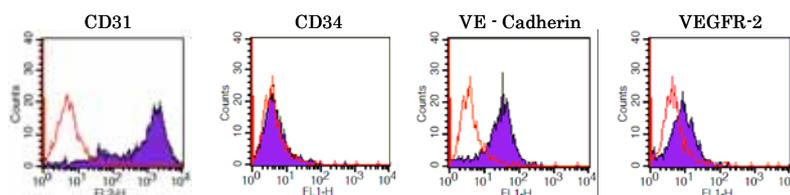
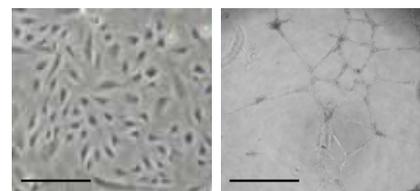


Figure 3.

- ・組織から単離した CD31 陽性細胞での血管内皮細胞マーカーの発現 (上図)
- ・CD31 陽性細胞の形態 (写真左) ・管形成能 (写真右) スケールバー: 250 μm



2. Summary

Fibroblasts, blood vessels, and inflammatory cells are thought to be recruited to the cancer tissue and contribute to the cancer progression. Blood vessels within the tumor tissue provide nutrition and oxygen and dispose wastes formed from tumor tissue, resulting in tumor progression. Blood vessels within the tumor tissue have been known to differ structurally from the normal tissue, and tumor endothelial cells are also said to be morphologically and genetically different from normal endothelial cells.

EGFR and PDGFR - β are target molecules for anti-cancer therapy in the clinic. It was reported in mouse model that EGFR and PDGFR - β expression was seen on the tumor endothelial cells, but not on the normal endothelial cells. To investigate the physiological role of PDGFR - β and EGFR expressions on endothelial cells in human lung cancer, I performed immunohistochemical staining and flow cytometry analysis of lung specimens. Lung specimens were obtained from the surgically resected lungs of lung cancer patients. The results of immunohistochemistry showed that the tumor endothelial cells express PDGFR - β much higher in rate than the normal endothelial cells. This experiment also revealed that PDGFR - β expression is higher in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma. Flow cytometry analysis to endothelial cells derived from human lung specimens supported the results of immunohistochemistry. To further investigate the functional differences between tumor endothelial cells and normal endothelial cells, cell isolation and culturing from human tumor and normal lung specimens was performed. First, the specimens were digested with enzyme and cells were harvested and cultured. After the cultured cells become confluent, CD31 positive cells were sorted and cultured again. Cultured cells derived from normal lung

tissues were identified as endothelial cells by tube formation assay and analysis of the endothelial marker expression such as CD34, VE - Cadherin and VEGFR - 2. Contrary to the isolation from normal lung tissues, CD31 positive cells from tumor tissues could not be cultured. This study showed that the expression rate of PDGFR - β is much higher in tumor endothelial cells than normal endothelial cells. Additionally, we succeeded in isolation of endothelial cells from human normal lung tissue, however, failed in from human lung cancer tissues. Future plan is to improve the endothelial cell isolation ability and by using this method, it may be possible to know the physiological roles of PDGFR - β expression on tumor endothelial cells.

3. 略語表

HUVEC : human umbilical vein endothelial cell

FBS : fetal bovine serum

bFGF : basic fibroblast growth factor

CAF : cancer associated fibroblast

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

PBS : phosphate buffered saline

DAB : 3,3' – Diaminobenzidine, tetrahydrochloride

mAb : monoclonal antibody

HRP : horse radish peroxidase

FACS : fluorescence – activated cell sorting

FITC : fluorescein isothiocyanate

IgG : immunoglobulin G

PE : phycoerythrin

APC : allophycocyanin

BSA : bovine serum Albumin

MACS : magnetic cell sorting

VEGF2 : vascular endothelial growth factor 2

4. 序論

がん組織形成過程において、線維芽細胞、血管構成細胞、炎症細胞（リンパ球、単球など）などの間質細胞は、がん組織内に多数動員され、がん組織の形成に関わるとともに、がんの進展に促進的に働くことが知られている(1-3)。動員されたこれらの細胞は、がん細胞との相互作用を介し、特異な構造的および生物学的性質を獲得すると考えられる。

血管新生とは、血管構造形成過程でみられる現象の 1 つである。血管芽細胞や内皮前駆細胞から内皮細胞に分化し、管腔構造を形成する過程のことを脈管形成という。この管腔構造を形成している内皮細胞が増生・遊走することで拡大した管腔構造を血管周皮細胞や平滑筋細胞が周囲を覆うことにより、安定した血管構造を新しく形成する過程のことを血管新生という (Fig 1)。この血管新生は、個体発生時や臓器の成長に伴って起こる。成人では、創傷治癒や胎盤形成の過程や子宮内膜で特別にみられる生理機能であり、その他の正常の組織においては通常、血管新生は起こっていない(4, 5)。

一方、腫瘍組織においては、血管新生が亢進し、組織内に常に新たな血管が進展している。血管新生により誘導される腫瘍血管は、酸素や栄養を供給し、がんの増殖を助ける重要な組織である(4, 5)。この腫瘍血管新生機序として、腫瘍細胞が増殖していく過程で組織内の酸素濃度が低下すると、腫瘍細胞において hypoxia induced factor - 1 (HIF - 1) の発現が亢進し、重要な血管新生促進因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) の産生を誘導する(6)。この過剰に産生された VEGF は、既存の血管内皮細胞の増殖を促し、血管新生を引き起こすと考えられている(7)。腫瘍血管の構造は、血管内皮細胞同士の接着が弱く、血管周皮細胞や平滑筋細胞による裏打ち構造も持たないため、正常組織の血管構造と比べると、脆弱で不完全な形態を取っている(8)。

近年、正常組織の血管と腫瘍組織の血管は、構造上の違いだけでなく、血管を構成する内皮細胞の性質も異なることが報告されている。2000 年に、St Croix B らによって、ヒ

ト大腸がん組織と正常組織から血管内皮細胞が分離され、腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現している遺伝子 (tumor endothelial markers : TEMs) が同定された(9)。それ以来、マウスモデルやヒト臨床検体を用いた腫瘍血管内皮細胞の単離と特異的マーカーの探索が盛んに行われている(10-18)。その中でも、今回特に、Epidermal growth factor receptor (EGFR) と、platelet – derived growth factor receptor (PDGFR) に着目した。

EGFR は、ErbB1 / EGFR / HER4, ErbB2 / Neu / HER2, ErbB3 / HER3, ErbB4 / HER4 の4つのファミリーから成るチロシンキナーゼレセプターの一つである。EGFR のリガンドとしては、EGF , transforming growth factor - α (TGF - α), heparin binding – EGF – like growth factor (HB - EGF) が良く知られている。これらのリガンドが結合すると、レセプター分子は、ホモダイマーやヘテロダイマーを形成し、細胞内ドメインのチロシン部位がリン酸化する。リン酸化により活性化したチロシン部位は、mitogen – activated protein kinase (MAPK) や phosphatidylinositol 3 – kinase や protein kinase C といった細胞内シグナルカスケードを活性化させ、細胞の増殖、分化、遊走やアポトーシスを調整する(19)。この EGFR は、多くのがんで発現が亢進しているため、抗がん剤の分子標的となっている。特に肺がんの非小細胞がんの治療薬として、EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤である Iressa (Gefitinib, AstraZeneca, Wilmington, DE) が適用されている。マウス皮下に melanoma を移植してつくった皮下腫瘍から単離した血管内皮細胞と正常の皮下組織から単離した血管内皮細胞を比較した研究では、腫瘍組織から単離した血管内皮細胞は、正常組織から単離した血管内皮細胞に比べ、EGFR の発現が亢進していることが報告されている(13)。また、分子発現だけでなく、核面積の肥大や異数体といった核型の異常も合わせて報告されている(12)。

Platelet - derived growth factor (PDGF) は、A 鎖、 B 鎖、 C 鎖、 D 鎖という4種のポリペプチドが互いのシステイン残基間のジスルフィド結合によって2量体を形成している分子である。ポリペプチドの組み合わせにより、PDGF – AA, PDGF – AB, PDGF – BB,

PDGF – CC, PDGF - DD の 5 種の形で存在する。PDGFR は、 α 型と β 型の 2 種が存在し、今回検討した PDGFR - β は、PDGF – BB と PDGF – DD に結合し、ホモダイマーを形成する。2 量体形成により、自己リン酸化を起こしたレセプターは、SH2 ドメインを持つシグナル伝達分子を介して、増殖、生存、遊走といった細胞動態を調整している(20)。PDGF と PDGFR - β のシグナルは、血管周皮細胞の動員と血管構造の安定化に寄与するということが報告されている(21)が、膀胱がんや卵巣がんの同所移植マウスの腫瘍血管内皮細胞では、PDGFR - β の発現亢進が認められた(22, 23)。抗腫瘍血管の標的として PDGFR のチロシンキナーゼ阻害剤と Gemcitabine や Paclitaxel といった既存の抗がん剤との併用投与実験が行われてきた(22, 23)。また 2007 年には、ヒト乳がん組織の腫瘍血管内皮細胞での PDGFR - β の発現亢進が報告された(24)。

上記のように、EGFR と PDGFR - β は、既にレセプターの細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼに対する阻害剤が分子標的薬として使用されている。また、正常血管内皮細胞での発現が弱いということから、PDGFR と EGFR は、抗腫瘍血管に対する標的分子に成り得ると考えている。

腫瘍は、その発生部位や組織型により生物学的特性が異なる。形態学的にも、腫瘍組織に進展してきた血管内皮細胞は、腫瘍組織型に応じた性質を獲得していることが予想された。肺がんは、形態学的に小細胞がんと非小細胞がんの 2 つの型に大きく分類される。肺がん全体の約 8 割を占める非小細胞がんは、さらに扁平上皮がんと腺がんに分類される。腺がんは、その組織型から、1) 肺胞上皮置換型、2) 乳頭型、3) 管腔形成型、4) 充実胞巣型、の 4 つの型に分類される (Fig 2)。このように多くの組織型に分類されている肺がん組織は、組織型間で血管内皮細胞の生物像を検証するのに最適な材料であると考えた。本研究では、肺がんの中でも、発生頻度の高い腺がんと扁平上皮がん組織の血管内皮細胞を対象とし、ヒト肺腫瘍血管内皮細胞における EGFR と PDGFR の発現変化を組織型毎に解析した。現在、ヒト腫瘍組織からの血管内皮細胞の単離・培養は困難を極めているの

が現状だが、腫瘍血管内皮細胞における PDGFR 及び EGFR 発現変化の分子機構、生理的な意義を検討するためには、腫瘍組織からの血管内皮細胞の単離・培養が必要であると考え、今回、ヒト肺腫瘍組織からの腫瘍血管内皮細胞の単離・培養を試みた。

5. 材料と方法

5-1. 組織免疫染色

パラフィン固定されたヒト肺がん組織のブロック標本より、1.5 μm の薄切切片を作製した。組織標本は、国立がんセンター東病院臨床検査部病理検査室より提供を受けた。切片をキシロールに 30 分浸漬し脱パラフィンした後、純アルコールで 4 回、最後に流水で 1 分洗浄した。抗原賦活化のため、0.1 M のクエン酸 buffer もしくは 1 mM EDTA 溶液に浸漬し、Microwave 処理を 20 分行った。PBS で洗浄した後、内因性ペルオキシダーゼを阻害するため、0.3% H_2O_2 / メタノール溶液に 15 分浸漬した。PBS で洗浄した後、一次抗体を切片上に 100 μl 塗布し、湿箱に入れ、室温で 1 時間反応させた。PBS洗浄後、二次抗体を添加して、室温で 30 分反応させた。PBS洗浄後、DAB 溶液にて 3 ~ 5 分発色させた。流水洗浄後、ヘマトキシリン溶液にて、核染色を行った。一次抗体は、PDGF Receptor β Antibody, EGF Receptor Antibody (Cell Signaling Technology) を 100 倍希釈して用いた。二次抗体は、HRP labelled Polymer Anti - Rabbit (Dako Envision system) を用いた。

評価を行う血管構造としては、内部に赤血球の存在が確認できる管腔構造とし、1 枚の切片につき腫瘍部と非腫瘍部から 10 箇所ずつ選択した。管腔を形成している細胞のうち、一番管腔の内側にある細胞を血管内皮細胞とした。管腔を形成している血管内皮細胞の数を、核の数を数えることで測定した。その中で、細胞膜が染まっているものを PDGFR - β 、及び EGFR 陽性血管内皮細胞と判定した。管腔を形成している全細胞数に占める PDGFR - β 、及び EGFR 陽性細胞の割合を陽性率として算出した。10 箇所の血管構造での陽性率の平均値をその切片 1 枚の陽性率とした。1 つの組織型につき、7 枚の切片の陽性率を測定し、平均値、標準偏差を算出した。

$$\text{陽性率 [\%]} = \frac{\text{PDGFR-}\beta / \text{EGFR 陽性血管内皮細胞数 [個]}}{\text{管腔を形成している血管内皮細胞数 [個]}} \times 100 [\%]$$

5 - 2. 酵素処理による組織からの細胞回収

5 - 2 - 1. 組織からの血管内皮細胞分離条件の検討

ヒト正常肺組織を用いて、実験手技の確立、組織を酵素処理して得られた細胞集団の中に目的とする血管内皮細胞が存在するかどうかの確認を目的として、予備実験を行った。

ヒト正常肺組織を 10 cm dish (Falcon) 上ではさみを用いて 1 mm 角の断片にし、さらに No.11 Scalpel (フェザー安全剃刀株式会社) を用いて、より細かい断片にした。コラゲナーゼ濃度が異なる Collagenase type I 溶液 (和光純薬工業株式会社 ; 15 or 45 mg / RPMI - 1640 medium 3 ml)、5mM CaCl₂ を含むコラゲナーゼ溶液 (コラゲナーゼ濃度 15 mg / ml)、2% EDTA を含むコラゲナーゼ溶液 (コラゲナーゼ濃度 15 mg / ml) を用意した。それぞれの組織分解液に組織断片を加え、温浴槽で振盪しながら、37 °C で 組織断片が見えなくなるまで 2 ~ 5 時間酵素処理を行った。酵素処理後得られた組織溶解液を 105 μm Filter net (日本理化学器械株式会社) に通し、15 ml tube (Falcon) に回収した。回収出来た組織懸濁液と等量 (4 ml) のPBSを添加し、良く懸濁した。別の 15 ml tube に、Ficoll - Paque PLUS (GE Healthcare) 4 ml を入れ、tube を傾けながら回収した細胞懸濁液を Ficoll 液の上に静かに重層した。1,800 rpm で 30 分遠心後、上清のみを吸引廃棄した。Ficoll 液上の中間層を回収し、105 μl Filter net を通し、細胞懸濁液を回収した。回収できた細胞数と死細胞の割合を測定するため、トリパンブルーで死細胞を染色し、細胞数を測定した。トリパンブルー 40 μl を 96 well plate に添

加し、細胞懸濁液 10 μ l を加えた。染色した細胞懸濁液 9 μ l を血球計算板に滴下し、生細胞数と死細胞数を測定した。

上述の方法によって、肺正常組織由来の細胞懸濁液中から、血管内皮細胞を分離することを試みた。Ficoll – paque PLUS 水溶液の比重は、1,077 \pm 0,001 g / ml であり、比重が、1,033 ~ 1,047 g の血管内皮細胞を含む画分は、Ficoll – paque PLUS 水溶液上層に含まれることが予想されたため、今回の組織懸濁液から血管内皮細胞を単離する検討に応用することにした。肺組織から回収した細胞を含む懸濁液を 1,500 rpm で 10 分遠心し、上清を廃棄した。残ったペレットを、200 μ l の 3% FBS を含有した PBS (PBS + 3% FBS) で懸濁した。フレキシブルタイプの 96 well plate (Falcon) に細胞懸濁液 100 μ l ずつ添加した。2,000 rpm で 1 分遠心した後、上清を廃棄し、ペレット状にした。非特異的な反応を抑えるため、human Fc receptor reagent (MBL) 5 μ l を添加し、室温で 5 分間反応させた。PBS + 3% FBS 100 μ l を添加し、コントロール群には、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (eBioscience) 5 μ l 、サンプル群には、FITC 標識抗ヒト CD34 抗体 (BioLegend) 5 μ l をそれぞれ添加し、暗所の氷上で 20 分間反応させた。抗体反応後、2,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を廃棄した。PBS + 3% FBS を 100 μ l 加えペレットを懸濁し、2,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を廃棄することで、PBS による洗浄とした。PBS による洗浄をもう一度行い、残ったペレットを 100 μ l の PBS + 3% FBS で懸濁し、FACS tube (Falcon) に移し、PBS + 3% FBS を加え 500 μ l にした。FACSCalibur cytometer (日本ベクトンディッキンソン) で回収した細胞集団中の CD34 陽性細胞の存在について解析を行った。

5-2-2. 腫瘍血管内皮細胞における PDGFR - β と EGFR の発現解析

ヒト肺非腫瘍、腫瘍組織中の血管内皮細胞における PDGFR - β と EGFR の発現をフローサイトメトリーで解析した。

ヒト肺非腫瘍部、腫瘍部組織から回収した細胞懸濁液を 1,600 rpm で 10 分遠心し、上清を捨てた。ペレットを 300 μ l の PBS + 3% FBS で懸濁した。フレキシブルタイプの 96 well plate に PDGFR - β 解析群、EGFR 解析群、コントロール群の 3 群に分け、100 μ l ずつ添加した。2,000 rpm で 1 分遠心し、上清を廃棄し、ペレット状にした。非特異的な反応を抑えるため、human Fc receptor reagent (MBL) 5 μ l を添加し、室温で 5 分間反応させた。PBS + 3% FBS 100 μ l 添加し、サンプル群には、APC 標識抗ヒト CD31 抗体 (eBioscience) 5 μ l 、コントロール群には、APC 標識抗マウス IgG 抗体 (eBioscience) 5 μ l を添加した。暗所の氷上で 20 分反応させた後、2,000 rpm で 1 分遠心し、上清を廃棄した。PBS + 3% FBS を添加し、2,000 rpm で 1 分遠心し、上清を廃棄し、洗浄した。次に、PDGFR - β 解析群には、PE 標識抗 CD140b (PDGFR - β) 抗体 (BioLegend) 5 μ l 、EGFR 解析群には、PE 標識抗 EGFR 抗体 5 μ l (R & D systems) 、コントロール群には、PE 標識抗マウス IgG 抗体 (eBioscience) 5 μ l を添加し、暗所の氷上で反応させた。PBS で洗浄後、サンプル群に、FITC 標識抗ヒト CD34 抗体 5 μ l 、コントロール群に FITC 標識抗マウス IgG 抗体 5 μ l を添加し、暗所の氷上で反応させ、細胞を三種の異なる蛍光の抗体で三重標識した。抗体反応終了後、上記と同様の方法でサンプルを調整した。FACSCalibur cytometer で血管内皮細胞マーカー (CD31,CD34) 陽性細胞についての PDGFR - β と EGFR の発現を解析した。CD31,CD34 共陽性細胞の全細胞数と PDGFR - β 、及び EGFR 陽性細胞数から、陽性細胞が占める割合を算出し、陽性率とした。13 サンプルの陽性率の値から、平均値、標準偏差値を算出した。今回の検討では、FITC, PE, APC という異なる蛍光色素で標識された抗体を用いた。発する蛍光波長の違いにより検出器が異なり、488 nm の励起光で励起する FITC からの波長は FL - 1 チャンネルが、PE からの波長は FL - 2 チャンネルが検出する。633 nm の励起光で励起する APC からの波長は FL - 4 チャンネルが検出する。蛍光波長の違いにより、FL - 2 と FL - 4 の検出器間で蛍光の漏れ込みは起こらず、正確なデータが取れる。CD31, CD34 共陽

性細胞のうち FL - 4 チャンネルで解析出来る CD31 陽性細胞における PDGFR - β と EGFR の発現を FL - 2 チャンネルで評価した。なお、CD31, CD34 共陽性画分の成分については、cytospin による確認を行い、細胞成分であることを確認することにした。評価対象とした CD31,CD34 共陽性画分の細胞を、FACSCalibur でソーティングを行い、50 ml Tube に回収した。回収に用いた 50 ml Tube は、2 倍に希釈した BSA fraction V を入れ、4 °C で 30 分静置することで予めコーティングしておいたものを用いた。回収した細胞懸濁液を 1,600 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨て、PBS / 3% FBS 100 μ l を添加し、ペレットを懸濁した。細胞懸濁液 100 μ l 全量をスライドガラスがセットされた Auto Smear CF - 120 のカセットに添加し、900 rpm で 5 分間遠心し、細胞成分をスライドガラス表面に貼り付けた。細胞をスライドガラス上にて、ホルマリンで固定した。スライドガラスをヘマトキシリン溶液により、核染色を行い、顕微鏡で細胞成分の有無を観察した。

5 - 3. 組織から回収した細胞の培養

腫瘍部、非腫瘍部、それぞれの組織を 10 cm dish 上ではさみと No.11 Scalpel を用いて、細かい断片にした。組織断片約 0.3 g に対して、RPMI - 1640 medium 1ml, 組織分散液 (SCIVAX Corp.) 1ml の組織分散 Buffer を調整した。Buffer に組織片をいれ、滅菌ピペットで沈殿した組織片をピペッティングでほぐした後、温浴槽で振盪しながら、37 °C で 1 時間酵素処理を行った。600 rpm で 2 分間遠心し、Buffer を廃棄し、0.05% trypsin / EDTA 2ml を添加した。組織断片をほぐした後、再度温浴槽で振盪しながら、37 °C で 5 分間酵素処理を行った。RPMI - 1640 medium 2 ml 添加し、滅菌ピペットでよくピペッティングした。600 rpm で 2 分間遠心し、上清を回収した。このトリプシンによる酵素処理を 3 回繰り返した。途中、懸濁液を dish に少量取り、検鏡し、細胞の存在を確認した。105 μ m Filter net を通し、組織断片を取り除いた。1,600 rpm で 10 分

間遠心し、上清を廃棄した。ペレットを 5% の FBS を含有した EBM - 2 - MV medium で懸濁し、予めコラーゲンコートした 35 mm dish に播種した。2 日おきに培地交換し、7 ~ 10 日培養した。培養中に増生してきた細胞集団中に血管内皮細胞が含まれているかどうかをフローサイトメトリーで確認した。組織から回収・培養し、細胞が増生してきた 35 mm dish の培地を吸引し、300 μ l の PBS で 2 回洗浄した。0.05% trypsin / EDTA を 300 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 4 分反応させ、細胞を回収した。1,600 rpm で 10 分間遠心し、上清を廃棄した。ペレットを 800 μ l の PBS + 3% FBS で懸濁した。フレキシブルタイプの 96 well plate に 100 μ l ずつ添加し、2,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を廃棄した。非特異的な反応を抑えるため、human Fc receptor reagent (MBL) 5 μ l を添加し、室温で 5 分間反応させ、PBS + 3% FBS 100 μ l を添加し、反応を止めた。CD31 発現解析のため、コントロール群には、PE 標識抗マウス IgG 抗体 (eBioscience) 5 μ l 、サンプル群には、PE 標識抗ヒト CD31 抗体 (eBioscience) 5 μ l を添加し、暗所の氷上で 20 分反応させた。同様に、CD34 解析のため、コントロール群には、PE 標識抗マウス IgG 抗体 5 μ l 、サンプル群には、PE 標識抗ヒト CD34 抗体 5 μ l 、VE - Cadherin 発現解析のため、コントロール群には、PE 標識抗マウス IgG 抗体 5 μ l 、サンプル群には、PE 標識抗ヒト VE - Cadherin 抗体 5 μ l 、CD14 発現解析のため、コントロール群には、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 5 μ l 、サンプル群には、FITC 標識抗ヒト CD14 抗体 5 μ l を添加し反応させた。抗体反応終了後、上記と同様の方法でサンプルを調整した。組織から回収し、培養した細胞集団中の CD31, CD34, VE - Cadherin, CD14 陽性細胞の割合を FACSCalibur cytometer を用いて解析した。

5 - 4. 血管内皮細胞の単離・培養

組織から回収し、培養した細胞集団の中から、血管内皮細胞を単離する方法としてマ

マイクロビーズ法により回収した。マイクロビーズを用いた細胞単離は、細胞を磁気ビーズが修飾した抗体で標識し、磁場内に設置したカラムを通すことで、細胞集団中から磁気標識した細胞を分離する方法である。今回の検討では、最初に FITC 標識抗ヒト CD31 抗体で細胞を標識し、抗 FITC microbeads を加えることで CD31 陽性細胞の磁気標識を行い、CD31 陽性細胞を単離した。

細胞の形態を観察し、血管内皮細胞様の細胞が増殖してきた dish について、300 μ l の PBS で 2 回洗浄した後、0.05% trypsin / EDTA 300 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 4 分間放置し、細胞を回収した。1,400 rpm で 10 分間遠心し、上清を廃棄し、ペレット状にした。80 μ l の MACS separation buffer (Miltenvi Biotec) を添加し、ペレットを懸濁した。FcR blocking reagent 10 μ l (Miltenvi Biotec), FITC 標識抗ヒト CD31 抗体 (eBioscience) 10 μ l を添加し、4 $^{\circ}$ C で 10 分反応させた。1ml の MACS separation buffer を加え、1,600 rpm で 10 分遠心し、上清を廃棄した。残ったペレットを MACS separation buffer 70 μ l で懸濁し、そこに抗 FITC microbeads 20 μ l を添加し、4 $^{\circ}$ C で 15 分反応させた。1 ml の MACS separation buffer を加え、1,600 rpm で 10 分遠心し、上清を捨てた。500 μ l の MACS separation buffer でペレットを懸濁した。MACS Separation 25 MS Columns (Miltenvi Biotec) を MACS separator の磁場にセットし、500 μ l の buffer で洗浄する。細胞懸濁液をカラムに通し、buffer でカラムを 3 回洗浄した。カラムを磁場から離し、buffer 1ml を加え、磁気標識された細胞を回収した。回収した細胞は、コラーゲンコートした 35 mm dish に播種した。培地は、20% FBS を含有する EBM-2-MV を用いた。増殖してきた細胞について、CD31 陽性細胞を再度マイクロビーズ法で、単離し、培養した。

血管内皮細胞の同定

組織から単離した細胞が、血管内皮細胞であると同定するため、血管内皮細胞の特徴の一つである管形成能の有無を tube formation assay により、また血管内皮細胞マーカーの発現を FACSCalibur cytometer で解析した。

5-4-1. Tube formation assay

— 20 °Cで凍結保存されている Matrigel (日本ベクトンディッキンソン株式会社) を 4 °Cに一晩放置し解凍した。Matrigel は、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth – Horm – Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品である。Matrigel は、8 ~ 10 °Cでゲル化が一部始まり、22 ~ 35 °Cで速やかにゲル化する。そのため、使用時は、4 °Cで融解し、使用直前まで氷上に置いておく。Matrigel 50 µl を 96-well plate にコートし、37 °Cで 30 分以上放置した。ヒト肺組織から回収・培養後、CD31 を標的としたマイクロビーズ法で単離した血管内皮細胞様の細胞を 0.05% trypsin / EDTA で回収し、bFGF 濃度が 10 ng / ml になるよう調整した MCDB – 131 medium で 1.5×10^4 cells / 150 µl になるよう細胞懸濁液を調整した。同様に、CAF (陰性コントロール), HUVEC (陽性コントロール) も同様に 1.5×10^4 cells / 150 µl になるように細胞懸濁液を調整した。Matrigel 上に細胞懸濁液 150 µl を添加し、37 °Cで 18 時間培養した。管腔構造部分の全長を、image J (アメリカ国立衛生研究所) で測定した。HUVEC (DS ファーマバイオメディカル株式会社) は、予めコラーゲンコートした ディッシュを用いて、10% FBS , 20 mM L-Glutamin, 10 ng/ml bFGF を含有する MCDB-131 medium (Invitrogen) で培養した。コラーゲンコートの作製方法は、まず、1 mol / L の塩酸 (和光純薬工業株式会社) を希釈して 0.01 N の HCl を作製して、オートクレーブで滅菌した。0.01 Nの HCl 9.7 ml と Cellmatrix Type I - A (新田ゼラチン株式会社) 0.3 ml を混合した溶液で、ディッシュの底全面を浸し、常温で 30 分

放置した。溶液を吸引し、10 ml の PBS で 2 回洗浄したものをを用いた。Cancer-associated fibroblast (CAF) は、10% FBS を含有する α -MEM (Invitrogen) で培養した。

5-4-2. 血管内皮細胞マーカーの発現解析

組織から単離培養した細胞における血管内皮細胞マーカー (CD31, CD34, VE-Cadherin, VEGFR-2) の発現をフローサイトメトリーで解析した。

ヒト肺組織から回収・培養し、CD31 を標的としたマイクロビーズ法で単離した血管内皮細胞様の細胞を、0.05% trypsin / EDTA で回収した。1,600 rpm で 10 分遠心し、上清を廃棄した。残ったペレットを、PBS + 3% FBS 800 μ l で懸濁した。フレキシブルタイプの 96 well plate (Falcon) に細胞懸濁液 100 μ l ずつ添加した。2,000 rpm で 1 分遠心した後、上清を廃棄し、ペレット状にした。非特異的な反応を抑えるため、human Fc receptor reagent (MBL) 5 μ l を添加し、室温で 5 分間反応させ、PBS + 3% FBS 100 μ l を添加し、反応を止めた。サンプル群には、PE 標識抗ヒト CD31 抗体 (eBioscience)、FITC 標識抗ヒト CD34 抗体 (BioLegend)、FITC 標識抗ヒト VE-Cadherin 抗体 (eBioscience) を 5 μ l をそれぞれ添加し、コントロール群には、PE 標識抗マウス IgG 抗体 (eBioscience)、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (eBioscience) を 5 μ l それぞれ添加し、暗所の氷上で 20 分間反応させた。抗体反応後、上記と同様の方法でサンプルを調整した。VEGFR-2 に関しては、サンプル群は、一次抗体として、マウス IgG 抗ヒト VEGFR-2 抗体 (R & D systems) 5 μ l を反応させ、PBS 洗浄後、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を 5 μ l を反応させた。コントロール群は、一次抗体として、マウス IgG コントロール抗体 (eBioscience) 5 μ l を反応させ、PBS 洗浄後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO) 5 μ l を反応させた。抗体反応後、上記と同様の方法で FACS tube

に回収した。FACSCalibur cytometer で 組織から単離した細胞について、血管内皮細胞マーカーの発現を解析した。

5-5. がん培養上清刺激による PDGFR- β の発現変化

5-5-1. がん培養上清の調整

100 mm dish で semi-confluent の状態になるよう培養した A549 と A431 の培地を吸引し、PBS 10 ml で洗浄した後、3 ml の MCDB-131 serum - free medium を添加して 37 °C で 24 時間培養した。培地を回収し、0.22 μ m pore のフィルター (MILLIPORE) を通し、培養上清とした。ヒト肺腺がん由来細胞株 A549 (ATCC)、ヒト扁平上皮がん由来細胞株 A431 (ATCC) は、10% FBS を含有する DMEM medium (Sigma - Aldrich) で培養した。

5-5-2. がん培養上清添加実験

35 mm dish に 2.0×10^5 個のHUVEC を播種し、一晚培養後培地を吸引し、がん培養上清 2 ml 、FBS 10 μ l (最終濃度 0.5%) を添加し、培養した。24, 48, 72, 96 時間経過したところで、培地を吸引し 300 μ l のPBS で 2 回洗浄した後、0.05% trypsin / EDTA 300 μ l を加え、37 °C で 4 分間放置し、細胞を回収した。1,400 rpm で 10 分間遠心し、上清を廃棄し、ペレット状にした。PBS + 3% FBS 300 μ l を添加し、ペレットを懸濁した。フレキシブルタイプの 96 well plate (Falcon) に細胞懸濁液を 100 μ l ずつ添加し、2,000 rpm で 1 分遠心し上清を廃棄し、ペレット状にした。非特異的な反応を抑えるため、human Fc receptor reagent (MBL) 5 μ l を添加し、室温で 5 分間反応させた。コントロール群には、PE 標識抗マウス IgG 抗体 5 μ l 、PDGFR- β 解析群に

は PE 標識抗ヒト CD140b (PDGFR - β) 抗体 5 μ l を用いて細胞を標識し、HUVEC における PDGFR - β の発現を FACSCalibur cytometer で解析した。測定した全細胞に占める PDGFR - β 陽性細胞の割合を算出し、PDGFR - β 陽性率とした。3 サンプルの陽性率の値から、平均値、標準偏差値を算出した。

5 - 6. 統計計算

本論分中の数値は、平均値 \pm 標準偏差値で表記した。標本間の平均値についての有意差検定は、両側分布の student's t test を用いた。なお、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

6. 結果

6-1. 扁平上皮がん組織と腺がん組織の血管内皮細胞における PDGFR- β 発現の比較

赤血球が内部に確認できる管腔構造を血管とし、血管構造を構成している内皮細胞について評価を行った。(Fig 3 A)。腺がん組織と扁平上皮がん組織の間で PDGFR- β の陽性率を比較したところ、腺がんのサブタイプである 1) 肺胞上皮置換型では正常部 4.8 \pm 4.3%、腫瘍部 32.6 \pm 8.6%、2) 乳頭型では非腫瘍部 8.1 \pm 25.8%、腫瘍部 54.1 \pm 25.8%、3) 管腔形成型では非腫瘍部 9.4 \pm 6.3%、腫瘍部 28.2 \pm 10.7%、4) 充実胞巣型では非腫瘍部 6.2 \pm 3.7%、腫瘍部 43.6 \pm 21.3% であり、扁平上皮がんでは非腫瘍部 25.1 \pm 11.4%、腫瘍部 62.7 \pm 16.6% の PDGFR- β の陽性率を示した。各組織とも、非腫瘍部に比べ腫瘍部の血管内皮細胞で PDGFR- β の発現が有意に亢進していることが示された ($p < 0.01$)。さらに、腺がんの 1) 肺胞上皮置換型と扁平上皮がん、また、腺がんの 3) 管腔形成型と扁平上皮がんの間で PDGFR- β の陽性率に有意な差を認めた ($p < 0.01$) (Fig 3 B)。また、扁平上皮がんの非腫瘍部の血管内皮細胞では、腺がんの非腫瘍部の血管内皮細胞に比べ、PDGFR- β の陽性率が有意に高かった (乳頭型 対 扁平上皮がん : $p = 0.02$ 。肺胞上皮置換型、管腔形成型、充実胞巣型 対 扁平上皮がん : $p < 0.01$)。EGFR については、免疫染色では、血管内皮細胞での発現が検出できなかった (Fig 4)。

6-2. 酵素処理による組織からの細胞回収

腫瘍血管内皮細胞について、管形成能や遊走能といった機能的な違いを比較検討するためには、組織からの血管内皮細胞の単離・培養が必要と考え、手術検体の肺組織からの血管内皮細胞の単離・培養を試みた。最初に、ヒト肺非腫瘍組織から効率良く細胞を分離する条件を検討するため、高濃度のコラゲナーゼ溶液 (15 mg / ml) と低濃度のコラゲナーゼ

溶液 (5 mg/ml) を用意し、組織を分解し、得られた細胞数と死細胞の割合について血球計算板を用いて測定した。ヒト肺非腫瘍組織 0.30 g を処理したところ、低濃度のコラゲナーゼで処理した群からは組織 0.1 g 当り、 $4.6 \pm 1.5 \times 10^6$ cells の細胞を回収することが出来た。また、死細胞の割合は、 $19.6 \pm 6.5\%$ だった。対して、高濃度のコラゲナーゼで処理した群からは、組織 0.1 g 当り $7.7 \pm 3.0 \times 10^6$ cells の細胞を回収することが出来た。また、死細胞の割合は、 $17.7 \pm 8.2\%$ だった (Fig 5 A, B)。コラゲナーゼ高濃度群と低濃度群の間で、回収できる細胞数 ($p = 0.07$)、死細胞の割合 ($p = 0.70$) に有意な差を認めることは出来なかった。次に、コラゲナーゼの活性には、カルシウムイオンが必要であることから、高濃度コラゲナーゼ溶液に、5 mM CaCl_2 添加群と非添加群で、ヒト肺正常組織の分離効率を回収出来た細胞数と死細胞の割合で比較した。5 mM CaCl_2 添加群のコラゲナーゼ処理した群では、組織 0.1 g 当り $7.3 \pm 1.3 \times 10^6$ cells の細胞を回収することが出来た。また、死細胞の割合は、 $18.6 \pm 3.9\%$ だった。対して、5 mM CaCl_2 非添加群では、組織 0.1 g 当り $10.0 \pm 4.5 \times 10^6$ cells の細胞を回収することが出来た。また、死細胞の割合は、 $15.9 \pm 3.0\%$ だった (Fig 5 C, D) 5 mM CaCl_2 添加群と非添加群の間で、回収できる細胞数 ($p = 0.18$)、死細胞の割合 ($p = 0.70$) に有意な差を認めることは出来なかった。酵素処理して得られた細胞集団から、Ficoll-paque を用いて血管内皮細胞を含む比重 1,033 ~ 1,047 g の画分を分離し、Flow cytometry によって、CD34 陽性細胞の割合を測定したところ、8.1% の CD34 陽性細胞が含まれていることが分かった (Fig 5 E)。

今回検討する PDGFR - β と EGFR が腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現していることを調べるため、国立がんセンター東病院臨床検査部病理検査室より提供を受けた手術検体を用いて、非腫瘍部と腫瘍部組織より細胞を回収し、血管内皮細胞での発現を FACSCallibur で評価した。回収した細胞集団を CD31, CD34, と PDGFR - β あるいは CD31, CD34, EGFR に対する抗体で三重標識を行った。CD31, CD34 共陽性画分の細胞を血管内皮細胞として R2 画分とした (Fig 6 A 上段)。R2 画分の細胞について PDGFR -

β , EGFR の発現を解析した (Fig 6 A 下段)。ここで、評価対象とした CD31,CD34 共陽性画分 (R2) に生細胞成分が存在することを確認するため CytoSpin を行い、細胞成分を確認した (Fig 6 A 写真)。全 13 症例検討を行い、非腫瘍部組織から回収した血管内皮細胞の PDGFR - β の陽性率は、 $19.6 \pm 21.3\%$ 、腫瘍組織から回収した血管内皮細胞の PDGFR - β 陽性率は、 $50.2 \pm 30.4\%$ であった。非腫瘍部組織から回収した血管内皮細胞に比べ、腫瘍部組織から回収した血管内皮細胞で PDGFR - β の発現亢進が有意に認められた ($p < 0.01$) (Fig 6 B)。非腫瘍部組織から回収した血管内皮細胞の EGFR の陽性率は、 $23.4 \pm 31.1\%$ であり、腫瘍部組織から回収した血管内皮細胞の EGFR 陽性率は、 $31.9 \pm 35.3\%$ であった。非腫瘍部と腫瘍部の血管内皮細胞の間で、EGFR 発現亢進を認めることは出来なかった ($p = 0.52$) (Fig 6 C)。なお、今回検討した症例の組織型の内訳は、腺がん 9 例、扁平上皮がん 1 例、その他の組織型が 3 例だった。

6-3. 組織から回収した細胞の培養

組織から回収した全細胞分画を、35 mm dish に播種し、肺微小血管内皮用に調整された EBM - 2 - MV medium で培養した。1 ~ 2 週間培養を続けた細胞について、細胞の形態を観察すると、丸い形状をした血管内皮細胞様の形態を示す細胞 (Fig 7 A - c) と方錐形をした線維芽細胞様の形態を示す細胞 (Fig 7 A - d) の 2 種に分けることが出来た。評価の基準として、血管内皮細胞の細胞株である HUVEC 形態 (Fig 7 A - b) を参考にした。線維芽細胞様の形態を示す細胞について、血管内皮細胞マーカーの発現を FACSCalibur で解析すると、CD31 陽性細胞群 (1.2%), CD34 陽性細胞群 (3.5%), VE - cadherin 陽性細胞群 (2.1%) であることを確認した (Fig 7 B)。血管内皮細胞様の形態を示す細胞について、血管内皮細胞マーカーの発現を FACSCalibur で解析すると、CD31 陽性細胞群 (12.0%), CD34 陽性細胞群 (4.6%), VE - cadherin 陽性細胞群 (7.2%) であることを確認した (Fig

7 C)。また、マクロファージなど単球系細胞のマーカーである CD14 陽性細胞群は存在しないことも確認した (Fig 7 C)。

血管内皮細胞マーカーの解析結果 (Fig 7 B, C)より、血管内皮細胞様の形態を示す細胞が増殖したケースについてのみ、血管内皮細胞特異的マーカーである CD31 を標的としてマイクロビーズを用いた単離を行った。組織から回収し培養した細胞集団中には、3.8% の CD31 陽性細胞が含まれていた (Fig 8 B - b)。CD31 陽性細胞単離後の細胞集団では、CD31 陽性細胞の割合が 1.5% と減少した (Fig 8 B - c)。以上より、マイクロビーズ法により、約 6 割の細胞をソーティングすることが出来たと考えた (Fig 8 B)。

以上の培養結果をまとめると、32 例のヒト肺非腫瘍部組織を用いた検討では、35mm dish にて細胞が増殖しなかったケースが 8 例、線維芽細胞様の形態を示す細胞が増殖してきたケースが 20 例、血管内皮細胞様の形態を示す細胞が増殖してきたケースが 4 例となった。12 例のヒト肺がん組織を用いた検討では、細胞が増殖しなかったケースが 4 例、線維芽細胞様の形態を示す細胞が増殖してきたケースが 6 例、血管内皮細胞様の形態を示す細胞が増殖してきたケースが 2 例となった (Table 1)。次に、非腫瘍部組織から回収し培養した細胞の中で、血管内皮細胞様の形態を示す細胞が得られた 4 例について、マイクロビーズ法による CD31 陽性細胞のソーティングを行い、培養した。血管内皮細胞様の細胞が増えなかったケースが 3 例、血管内皮細胞様の細胞が増殖してきたケースが 1 例となった。腫瘍組織から回収し培養した細胞の中で、血管内皮細胞様の形態を示す細胞が得られた 2 例について、マイクロビーズ法による CD31 陽性細胞のソーティングを行い、培養した。2 例の内、1 例では細胞を培養することが出来ず、もう 1 例で線維芽細胞様の形態を示す細胞の増殖が確認することが出来た (Table 2) という結果になった。

6-4. 血管内皮細胞の単離・培養

マイクロビーズ法により単離した CD31 陽性細胞が、血管内皮細胞であることを示すため、tube formation assay を行った。ヒト肺組織より回収した CD31 陽性細胞 (Fig 8 C - a) が、管形成能を有していることが確認できた (Fig 8 C - b)。陽性コントロールとして、同条件で HUVEC を用いて tube formation assay を行い、管形成能を確認した (Fig 8 C - c)。一方、陰性コントロールとして、CAF を用いて tube formation assay を行った (Fig 8 C - d)。tube formation assay で使用した CD31 陽性細胞を使用し、FACS で血管内皮細胞特異的マーカーの発現の有無を検討した。CD31 陽性細胞は、検討した 3 種のマーカーのうち、VE-Cadherin と VEGFR-2 を発現していることを確認した (Fig 8 D)。

6-5. がん培養上清による刺激に対する PDGFR- β の発現変化

組織免疫染色と組織から回収した細胞についての FACS の検討から、ヒト肺がん組織の腫瘍血管内皮細胞では、PDGFR- β の発現が亢進していることを示した。そこで、腫瘍血管内皮細胞での PDGFR- β 発現亢進の機構を調べるため、HUVEC をがん培養上清で刺激した時の、PDGFR- β 陽性細胞の割合を経時的に検討した (Fig 9)。がん培養上清による刺激を加えていないコントロール群 (Fig 9 A - a) の解析結果より、PDGFR- β 陽性画分 (R3) を決定した。がん培養上清刺激群で、R3 画分に入った細胞を PDGFR- β 陽性細胞とし評価を行った。無刺激群の HUVEC での各時間での PDGFR- β の陽性率は、24 時間後 $0.07 \pm 0.01\%$ 、48 時間後 $0.61 \pm 0.18\%$ 、72 時間後 $1.70 \pm 1.31\%$ 、96 時間後 $0.56 \pm 0.06\%$ となった。A549 (腺がん) 培養上清 刺激群の HUVEC の PDGFR- β 陽性率は、24 時間後 $0.18 \pm 0.1\%$ 、48 時間後 $2.10 \pm 0.38\%$ 、72 時間後 $0.89 \pm 0.33\%$ 、96 時間後 $0.91 \pm 0.18\%$ となった。A431 (扁平上皮がん) 培養上清刺激群の HUVEC では、24 時間後 $0.45 \pm 0.38\%$ 、48 時間後 $0.12 \pm 0.07\%$ 、72 時間後 $1.96 \pm 1.22\%$ 、96 時間後 $0.02 \pm 0.03\%$ となった。48 時間後の無刺激群に比べ、A549 培養上清刺激

群では、PDGFR- β の陽性率が有意に増加していることを認めた ($0.61 \pm 0.18\%$ vs $2.10 \pm 0.38\%$; $p = 0.01$)(Fig 9 B)。

7. 考察

7-1. 肺がん組織の組織免疫染色 PDGFR- β と EGFR の発現

7-1-1. 腫瘍血管内皮細胞における PDGFR- β 、EGFR の発現

肺腺がん組織の 4 つのサブタイプ 1) 肺胞上皮置換型、2) 乳頭型、3) 管腔形成型、4) 充実胞巣型と肺扁平上皮がん組織の血管内皮細胞における PDGFR- β と EGFR の発現を免疫染色で評価した。PDGFR- β に関しては、いずれの組織型においても、正常組織の血管内皮細胞に比べ、腫瘍血管内皮細胞で有意な発現亢進を認めた (Fig 2 A)。これは、過去の研究と一致する結果(22-24)であった。しかし、腫瘍血管内皮細胞での PDGFR- β の発現亢進が、機能的にどのような意味を持っているのかは明らかになっておらず、今後の課題だと考えられる。PDGFR を介した細胞動態は、血管周皮細胞が主な研究対象であった。血管周皮細胞は、PDGF の刺激を受け、遊走能が亢進し、腫瘍組織への動員、腫瘍血管の安定化に寄与していると考えられる(21)。この機構を血管内皮細胞に当てはめると、腫瘍組織の血管内皮細胞は、腫瘍細胞が産生する PDGF に対する感受性が亢進しており、腫瘍組織への動員が盛んになり血管新生促進に寄与するのではないかと考えられる。

また、今回の組織免疫染色では、EGFR の発現は検出出来なかった (Fig 3)。考えられる可能性は三つあり、一つ目の可能性としては、抗体が失活している可能性が挙げられる。しかし、EGFR 発現が確認されている ヒト食道がん組織を陽性コントロールとして、同条件で免疫染色を行ったところ、EGFR 陽性細胞を検出することが出来た (データなし)。このことから、抗体が失活している可能性は否定できると考えている。また、染色過程に問題があったという可能性も合わせて否定できた。二つ目の可能性として、ヒト肺組織の血管内皮細胞に発現している EGFR は、組織免疫染色では検出できないほど微量なものである可能性がある。なぜなら、ヒト肺組織から回収した血管内皮細胞での EGFR の発現を

FACS で解析すると、正常組織、腫瘍組織共に、2 割程度の陽性率を示したからである (Fig 5 C)。いずれにせよ、今回の検討では EGFR は腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現している分子ではないことが確認された (Fig 5 C)。三つ目の可能性として、マウスの腫瘍血管内皮細胞とヒトの腫瘍血管内皮細胞での分子発現の違っていることが考えられる。腫瘍血管内皮細胞における EGFR 発現亢進は、マウスの腫瘍血管内皮細胞に特異的なものである可能性が考えられる。このことは、HUVEC における EGFR の発現をフローサイトメトリーやウエスタンブロットで確認したいと考えている。

7-1-2. ヒト肺がん各組織型間の血管内皮細胞における PDGFR- β 陽性率の違い

肺腺がんと扁平上皮がんで腫瘍血管内皮細胞での PDGFR の発現を比較してみると、腺がんの 1) 肺胞上皮置換型、3) 管腔形成型、に比べ、扁平上皮がんの腫瘍血管内皮細胞で PDGFR- β の発現が有意に亢進していた (Fig 2 B)。今回、腫瘍の組織型毎に腫瘍血管内皮細胞における分子発現が変化する可能性を示唆することが出来た。また、扁平上皮がん症例の非腫瘍部組織の血管内皮細胞でも高い陽性率を示している (Fig 2 B) ことから、扁平上皮がん患者の肺組織全体の血管内皮細胞で PDGFR- β の発現が亢進している可能性も考えられる。肺扁平上皮がんの発生には、喫煙が密接に関わっており、非喫煙者に対する喫煙者の肺がんリスクは、男性で 12 倍、女性で 11 倍という報告がある。現在では、煙草の煙に含まれる多環芳香族炭化水素化合物やニトロソアミン類等の発がん物質に肺組織全体が暴露されているからであると考えられている。しかし、喫煙と PDGFR- β の発現亢進を結びつける報告は今のところない。今回の検討では、非腫瘍部組織での陽性率が低く、腫瘍部組織での陽性率が高い 2) 乳頭型、4) 充実胞巣型に対しては、PDGFR- β を標的にした分子標的薬の使用が最も効果的であると言える。このことから、より特異的な血管新生阻害における標的分子の検索には、正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞の比較だけでなく、腫瘍組織毎に腫瘍血管内皮を比較していくことも

今後重要になると考えている。

7-2. 組織からの血管内皮細胞の単離

7-2-1. 組織からの血管内皮細胞分離条件の検討

ヒト肺組織から血管内皮細胞の単離を行う前に、効率の良い組織からの細胞分離条件を検討した。コラゲナーゼ濃度を高濃度 (15 mg / ml) と低濃度 (5 mg / ml) で細胞回収効率として、得られた細胞数、死細胞の割合を測定したが、両群の間に有意な差は見られなかった。また、コラゲナーゼ活性に必要とされている 5 mM CaCl₂ 添加群、非添加群で細胞回収効率を比較してみても、両群の間に有意な差はなかった。さらに、今回検討した条件では、回収した細胞を Dish で培養することは出来なかった。以上のことから、今回検討した条件では、細胞は回収できるが、その細胞は、長期培養することは出来ないということが分かった。考えられる原因としては、長時間の酵素処理のため、細胞が弱ってしまった可能性が考えられる。解決策として、精製の粗いコラゲナーゼ溶液から、組織分解用に調整された組織分散液を用いて、処理時間も半分の 1 時間に短縮させた。組織分散液を使って組織から回収した細胞を 35 mm dish に播種したところ、細胞の接着・増殖を確認することが出来た (Fig 7 A)。また、Ficoll-paque を用いた血管内皮細胞の単離については、回収した細胞集団中の CD34 陽性細胞を測定することで算出した。確かに CD34 陽性細胞は含まれていたが、Ficoll-paque 単離後の細胞を Dish で培養することは出来なかった。考えられる原因は、Ficoll-paque 単離で得られる細胞数が少ないということが挙げられる。このため、組織から分離した細胞を全量 35 mm dish に播種し、細胞を増殖させてから、血管内皮細胞を単離することとした。組織から分離した全量の細胞を培養した場合でも、血管内皮細胞様の形態を示す細胞を得られることは分かった (Table 1)。今回の検討では、組織からの細胞分離について条件検討を行った。組織から分離した細胞を培養

することは出来るようになったが、CD31 陽性陽性細胞の培養が未だ成功例が一例しかなく、検討すべき課題である。培地条件、増殖に必要な細胞密度、添加する血清量等を検討し、組織由来の CD31 陽性細胞のより効率の良い培養方法を開発することが、ヒト腫瘍組織からの血管内皮細胞の単離につながると考えている。

7-2-2. 組織から回収した細胞集団中の血管内皮細胞マーカー陽性細胞の同定

特異性の高い血管新生阻害剤の開発を目的とした研究のなかで、腫瘍血管内皮細胞に注目が集まって以降、マウス、ヒト腫瘍組織からの血管内皮細胞の単離・培養が多く試みられてきた(10-18)。ヒト腫瘍からの血管内皮細胞の単離・培養は難しく、2003年に腎臓の腫瘍組織からの単離・培養に成功したという報告しかない(10)。今回の検討では、ヒト肺がん組織からの血管内皮細胞の単離・培養を試みたが、血管内皮細胞が単離・培養できたのは、非腫瘍部組織 32 例中 1 例のみで、腫瘍部組織については、12 例行ったが、血管内皮細胞は単離・培養出来なかった。腫瘍血管内皮細胞の単離・培養が困難な理由としては、組織中に含まれる血管内皮細胞の数が絶対的に少ないということ、もしくは、生物学的に使用している培養条件が不適であるなどの可能性が考えられる。限られた腫瘍組織中から単離・培養を行うため、組織を酵素処理して得られた細胞を培養し、絶対量を増やしてからソーティングを行う方法を採用することで、細胞の量の問題を解決することにした。培養して増殖してきた細胞集団中でも、血管内皮細胞マーカー陽性の細胞を確認することが出来た (Fig 4)。このことから、少ない腫瘍組織から血管内皮細胞を単離する方法として、今後選択される方法になると考えている。

7-2-3. 血管内皮細胞の同定

今回の検討ではヒト肺正常組織からの単離・培養に 1 例だけ成功した。血管内皮細胞の特徴である管形成は確認することが出来た (Fig 6 - C) が、検討した血管内皮細胞マ-

カーのうち、CD34 の発現が確認出来なかった (Fig 6 - D) 。これは、組織を処理してから血管内皮細胞の同定作業まで一ヶ月以上経過していることで細胞表面マーカーの発現が変化してしまった結果であると考えている。血管内皮細胞の細胞株として一般的に使用されている HUVEC も 10 回以下の分裂回数しか品質保障されていない維持の難しい細胞種であることを考えると、組織から単離した細胞が、酵素処理、ソーティングといった工程の間に細胞の性質が変化してしまう可能性は十分考えられる。ヒト肺組織から血管内皮細胞は単離出来るということは分かったので、今後は酵素処理方法、培養条件、ソーティング方法などの各工程での効率を上げ、細胞回収の時間を出来るだけ短くする必要があると考えている。

7-2-4. 腫瘍組織からの血管内皮細胞の単離・培養

今回、ヒト肺腫瘍組織から血管内皮細胞を単離培養することは出来なかった。実験を行っている、腫瘍組織から回収した有核細胞は、そもそも増生してくる検体が全体の約半数の成功頻度となっており、細胞の増殖自体が困難な結果になっている (Table 2) 。このことから、腫瘍組織の血管内皮細胞は、正常組織の血管内皮細胞と比較して、増生能が低い可能性がある。その理由の一つとして、喫煙や年齢が組織中の血管内皮細胞の増生に影響を及ぼすかどうかを調べたが、喫煙歴や高齢であるという要素は、細胞培養の成否には関連しなかった。二つ目の理由としては、血管周皮細胞は PDGFR - β を発現することによって、元々発現している VEGFR - 2 との相互作用により、遊走能や増殖能が抑制されるという報告があるからである(25)。 2 つ目の理由は、HUVEC に PDGFR - β を過剰発現させ、その細胞の増殖能を通常条件下の HUVEC の増殖能と比較することで確認することが出来るのではないかと考えている。

7-2-5. 組織から回収した細胞についての PDGFR - β と EGFR の発現

フローサイトメトリーによる解析

今回の検討で、フローサイトメトリーを用いて、腫瘍血管内皮細胞の分子発現を検索出来るということが分かった。非腫瘍部から回収した血管内皮細胞に比べ、腫瘍部から回収した血管内皮細胞で PDGFR - β の発現が亢進している結果 (Fig 5 B) は、組織免疫染色の結果と一致していた。血管の研究で一般に用いられている血管内皮細胞の細胞株 HUVEC では、腫瘍血管の分子発現を正確には解析することは出来ないが、今回の方法を用いると、培養細胞より生体内に近い腫瘍血管内皮細胞の分子発現について解析が行えると考えている。さらに、組織から充分量の CD31, CD34 共陽性細胞を効率良くソーティングすることが出来れば、PDGFR - β や EGFR の発現亢進について、タンパク量だけでなく、mRNA 量を測定し、転写の段階でも確認したいと考えている。フローサイトメトリーの解析では、細胞質内の分子を測定できないことから、分子発現の亢進を見逃す可能性がある。転写量の増加も合わせて解析することが出来れば、PDGFR - β や EGFR の発現亢進について信憑性の高いデータを示すことが出来ると考えている。

EGFR の発現について、組織免疫染色では検出出来なかったが、FACS を用いた検討では、EGFR 陽性細胞を検出することが出来た。組織免疫染色より感度良く、細胞の表面分子の発現を解析することが出来る方法なのかもしれない。

今回の検討では、用いた症例の組織型に偏りがあったため、組織から分離した血管内皮細胞における PDGFR - β と EGFR の陽性率について、組織型毎の比較をすることが出来なかった。今後、症例数を増やし、組織から分離した血管内皮細胞における PDGFR - β 及び、EGFR の陽性率が、組織型毎に異なるのかどうか比較したいと考えている。

7-3. がん培養上清の刺激に対する PDGFR - β の発現変化

腫瘍血管内皮細胞での PDGFR - β の発現亢進は、がん細胞が産生する液性因子による刺

激によって調整されているのではないかと考えた。そこで、HUVEC ががん培養上清中で培養し、PDGFR - β 陽性細胞率の解析を行った。A549 の培養上清中で培養した HUVEC では、培養 48 時間後 2% 程度の細胞が PDGFR - β 陽性になり、無刺激群と比較しても有意に PDGFR - β の陽性細胞の割合が増加した (Fig 7)。今回の結果から、2 つの可能性を考えた。第一は、72 時間後、96 時間後では、陽性率に有意な増加は見られないので、細胞集団中の一部の細胞が、がん培養上清の刺激に対して反応したとする考えである。血管内皮細胞は、組織の中で、一部の細胞が tip cell と分類され、成長因子に対する遊走能の亢進といった、その他の血管内皮細胞とは異なる性質を有した一群があることが知られている(26)。この先端部細胞は分子発現も異なり、VEGFR - 3 を特異的に発現しているという報告があるので(27)、VEGFR - 3, PDGFR - β の抗体で二重標識し、flow cytometer による解析で、PDGFR - β 陽性細胞群が先端部細胞であるかどうかは容易に調べることができる。第二は、培養上清の刺激による PDGFR - β 発現が一過性であることから、腫瘍血管内皮細胞での PDGFR - β の発現亢進には、がんが産生する因子は関与していないという考えである。腫瘍近傍の血中を流れている endothelial progenitor cell (EPC) が、血管新生時、新生血管に取り込まれているという報告がある(28)。このことから、腫瘍血管内皮細胞の PDGFR - β 陽性率の亢進は、この EPC の動員を反映していると考えられる。EPC の動員を実証するには、GFP 発現マウスの骨髄を移植したマウスに腫瘍を造らせ、その腫瘍組織の血管に GFP 陽性の細胞が取り込まれているかどうかを調べるという方法がある。

今後は、培養上清存在下で培養して HUVEC から mRNA を抽出し、転写量でも PDGFR との発現量について解析し、フローサイトメトリーの結果を裏づけたいと思っている。

8. 総括

今回、ヒト肺がん組織の腫瘍血管内皮細胞で、PDGFR - β の発現が亢進していること、お

よび腫瘍血管における内皮細胞の PDGFR - β 陽性率は、組織型の間でも異なるということ
を初めて示した。また、培養上清刺激実験では、培養上清調整時に用いるがん細胞種によ
り、HUVEC における PDGFR - β 陽性率が異なる変化をみせた。以上のことから、腫瘍
細胞や非腫瘍部の微小環境を含む腫瘍細胞の組織型の違いが、組織中の血管内皮細胞にお
ける PDGFR - β の発現変化に寄与している可能性が示唆された。

腫瘍組織由来の血管内皮細胞の機能解析を行うためには、血管内皮細胞の単離・培養が
重要であると考え、非腫瘍、腫瘍組織からの単離・培養法を確立した。正常組織からの血
管内皮細胞の単離・培養は成功したが、腫瘍組織からの単離・培養は困難であった。組織
から単離後の細胞培養条件を検討することが、腫瘍組織からの血管内皮細胞単離に必要で
あると考えている。

今後の課題は、1) 効率の良い、腫瘍血管内皮細胞の単離法・培養法の開発し、2) 腫
瘍血管内皮細胞での PDGFR - β の発現亢進が、機能的にどのような意味を持っているのか
を明らかにすること、である。

8. 図表

A.

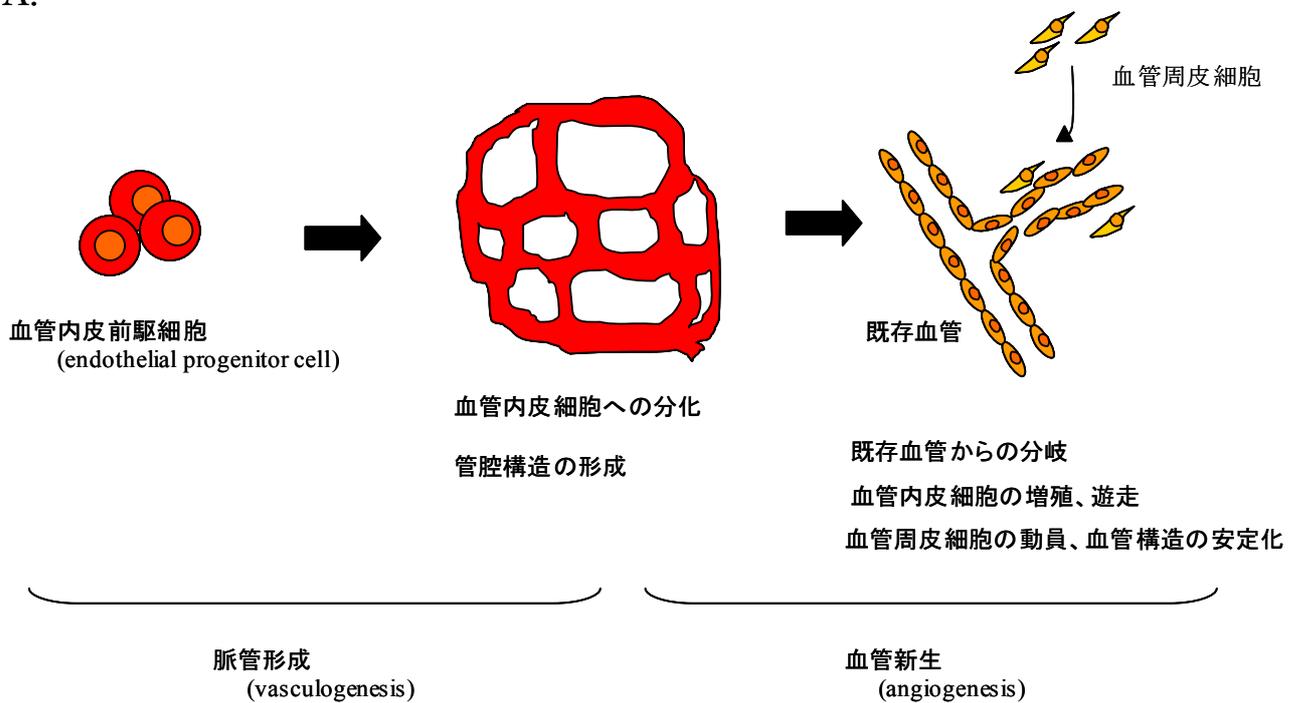
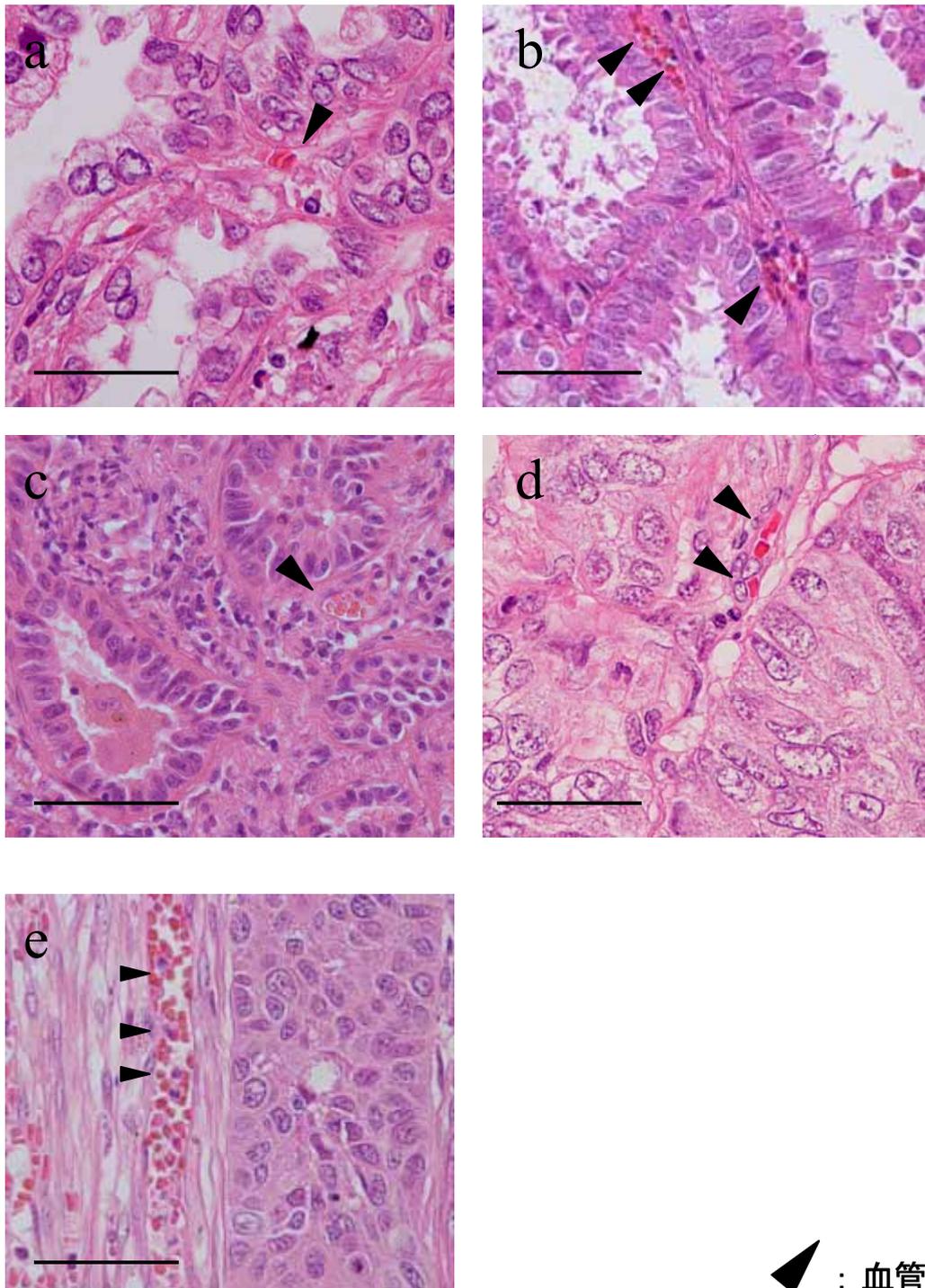


Figure 1. 血管新生概略図

血管の形成は大きく2つの要素に分けて考えることができる。1つは血管を構成する細胞の発生・分化で、もう1つは既存血管の内皮細胞が、血管新生刺激に反応して新たな管腔形成を行う過程である。まず、中胚葉から出現した血管芽細胞が血管内皮細胞に分化し、初期の血管構造を形成する(脈管形成)。次に、既存の血管を構築している血管内皮細胞が血管新生刺激に反応し、増生・遊走を行い、既存血管からの萌出、あるいは分岐することで新生血管が形成される(血管新生)。

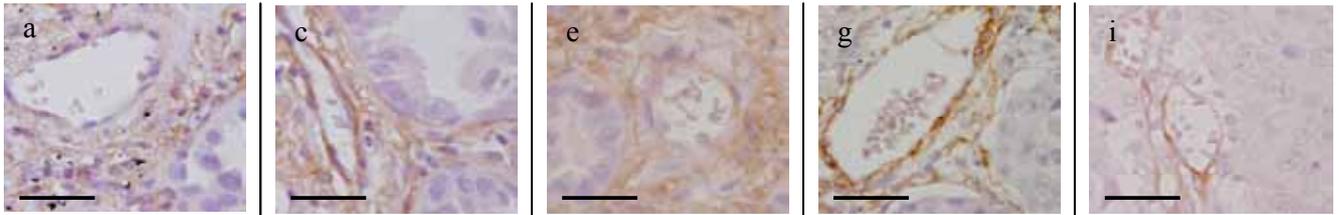


▲ : 血管構造
 Scale bar : 50μm

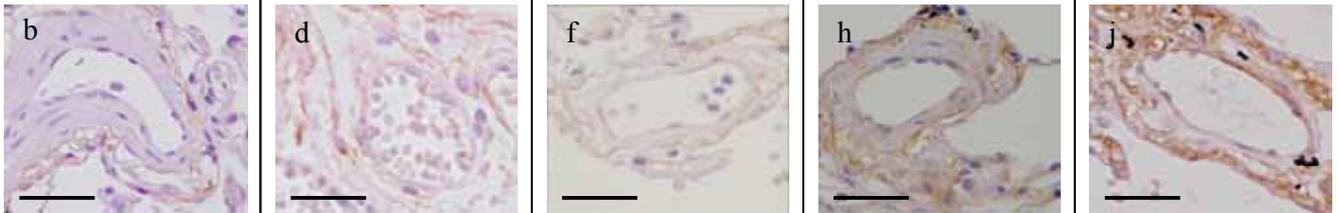
Figure 2. 様々な組織型に分類されている肺がん組織の組織像
 肺がん各組織型の HE 染色写真。(a) ~ (e) は、腺がんの 4 つの組織型 (a) 肺胞上皮置換型、(b) 乳頭型、(c) 管腔形成型、(d) 充実胞巣型の組織像の写真を示す。(e) は、扁平上皮がんの組織像の写真を示す。スケールバーは、50 μm を示す。矢頭は、血管構造を示す。

A.

腫瘍組織



非腫瘍組織



肺胞上皮置換型

乳頭型

管腔形成型

充実胞巣型

扁平上皮がん

Scale bar : 50 μm

B.

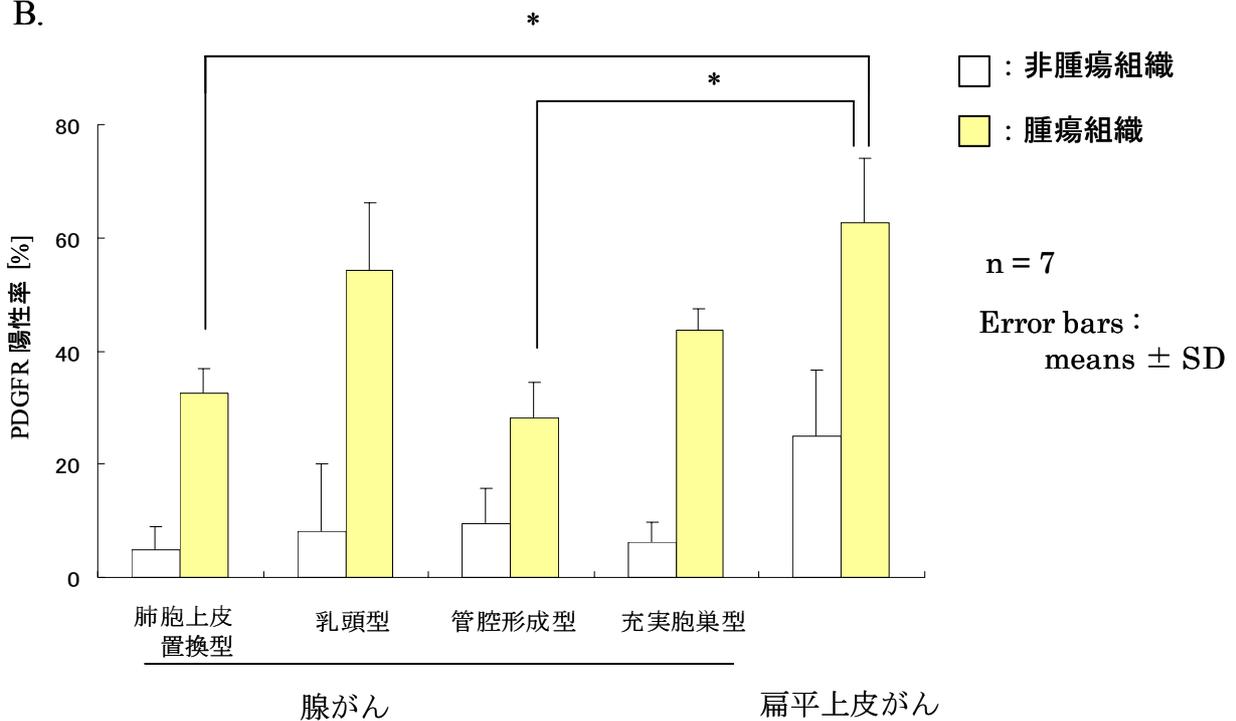


Figure 3. 扁平上皮がんと組織型の異なる腺がん組織内の血管内皮細胞における PDGFR-β の発現を免疫染色で評価した図

(A) a から h までは、それぞれ a,b : 肺胞上皮置換型、c,d : 乳頭型、e,f : 管腔形成型、g,h : 充実胞巣型、と組織型の異なる 4 つの腺がんの血管構造における PDGFR-β の発現を示した免疫染色

の写真。I,j は、扁平上皮がんの血管構造における PDGFR-β の発現を示した免疫染色の写真。上段が、腫瘍組織の血管、下段が非腫瘍組織の血管構造を示している。スケールバーは、50 μm を示す。

(B) は、(A) で評価した陽性率を数値化したグラフ。* は、 $P < 0.01$ で有意に差があることを示している。

C.

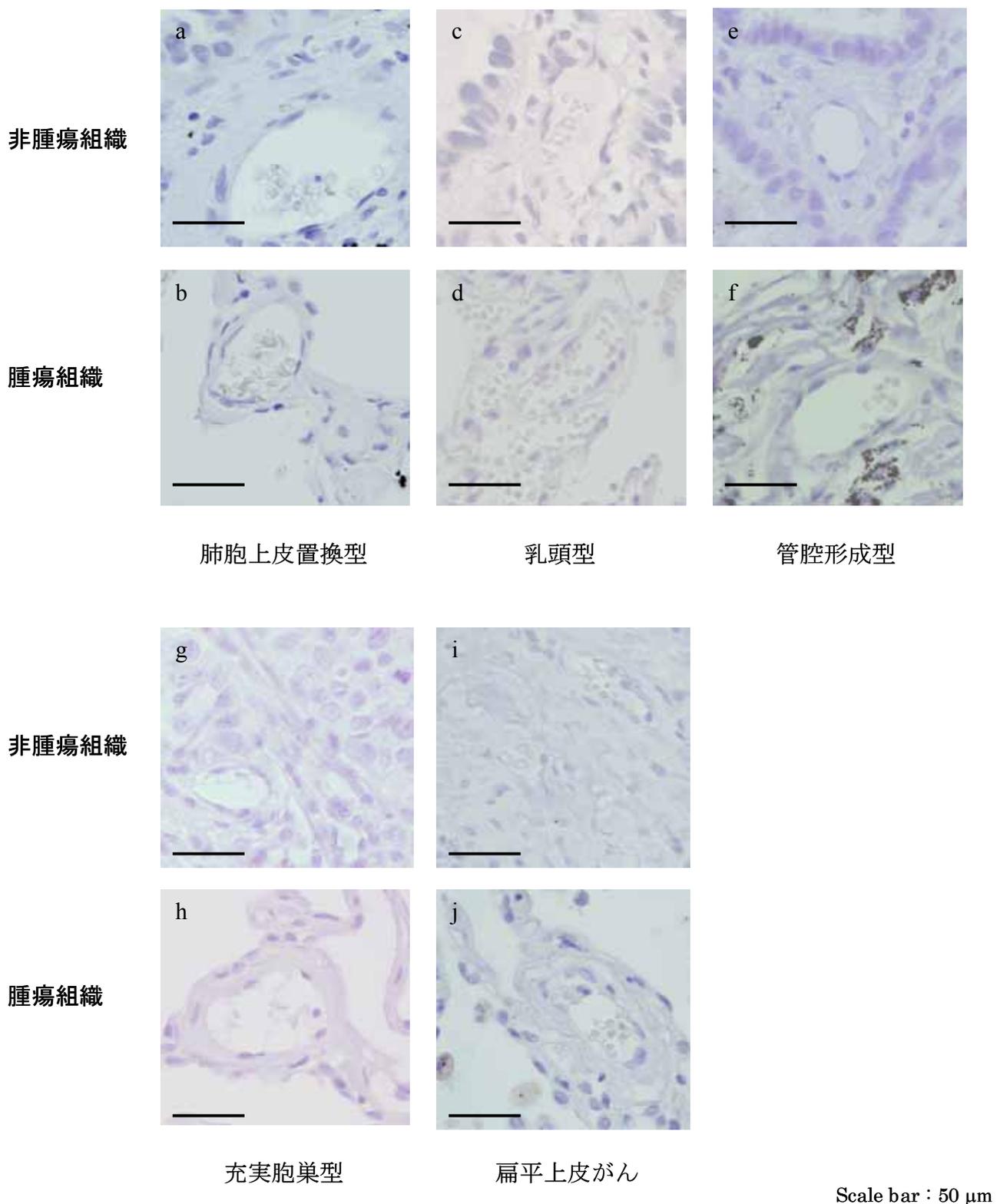


Figure 4. 扁平上皮がんと組織型の異なる腺がん組織内の血管内皮細胞における EGFR の発現を免疫染色で評価した図

a,b. 肺胞上皮置換型、c,d. 乳頭型、e,f. 管腔形成型、g,h. 充実胞巣型、i,j. 扁平上皮がん、の血管内皮における EGFR の発現を免疫染色で評価した写真。上段、a, c, e, g, i がそれぞれ非腫瘍組織の免疫染色の写真で、下段、b, d, f, h, j それぞれ腫瘍組織の免疫染色の写真。

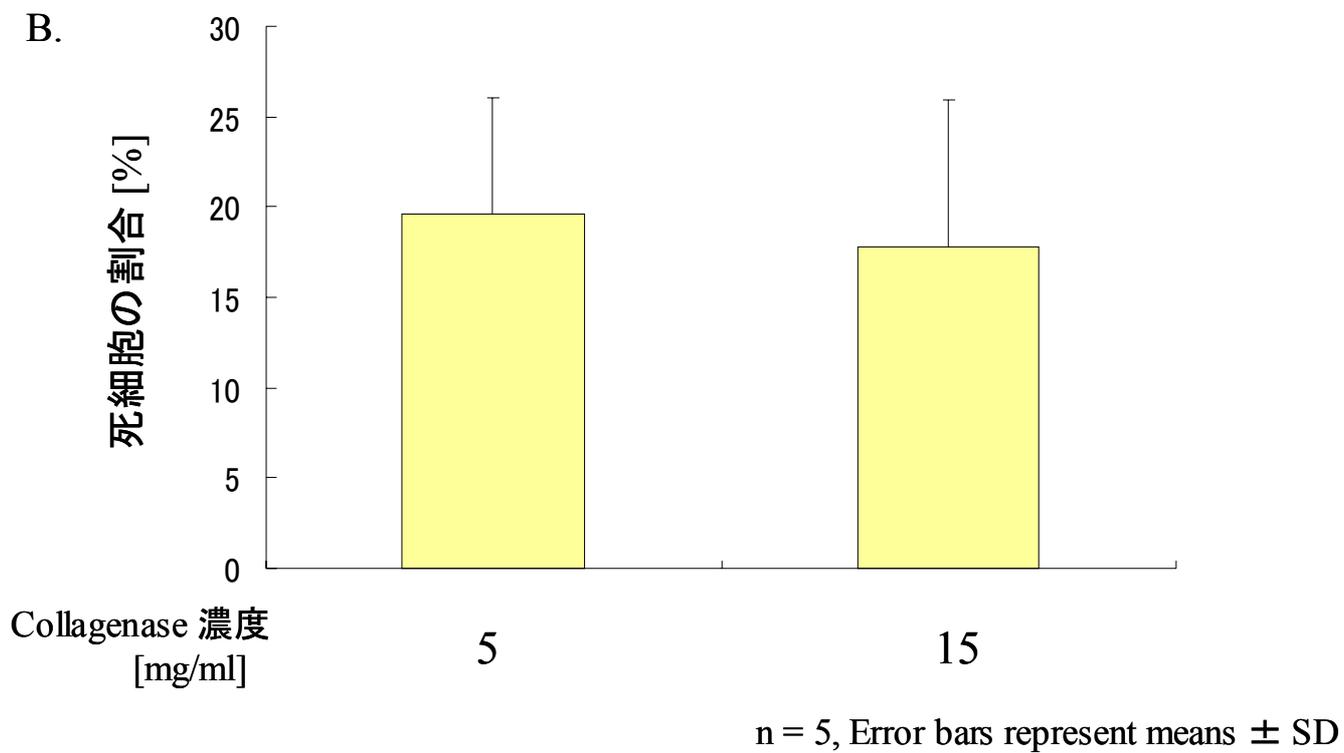
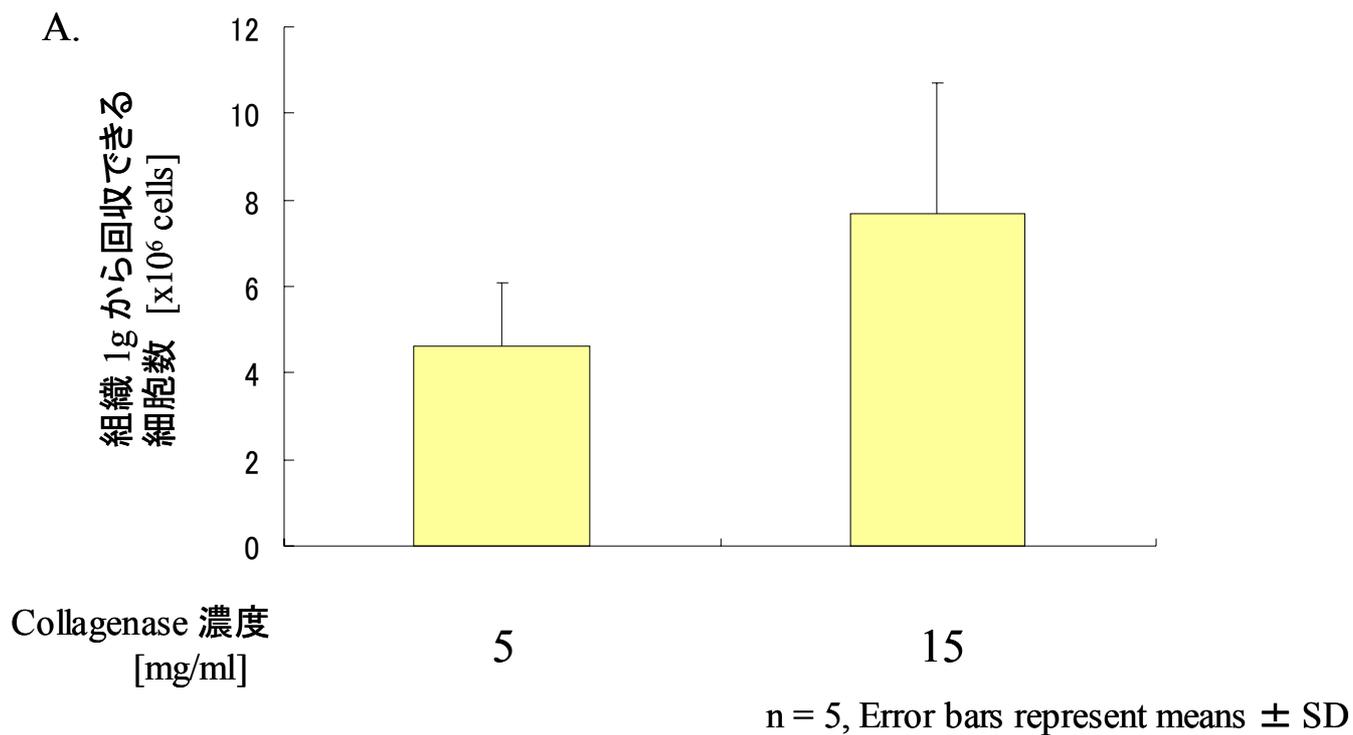
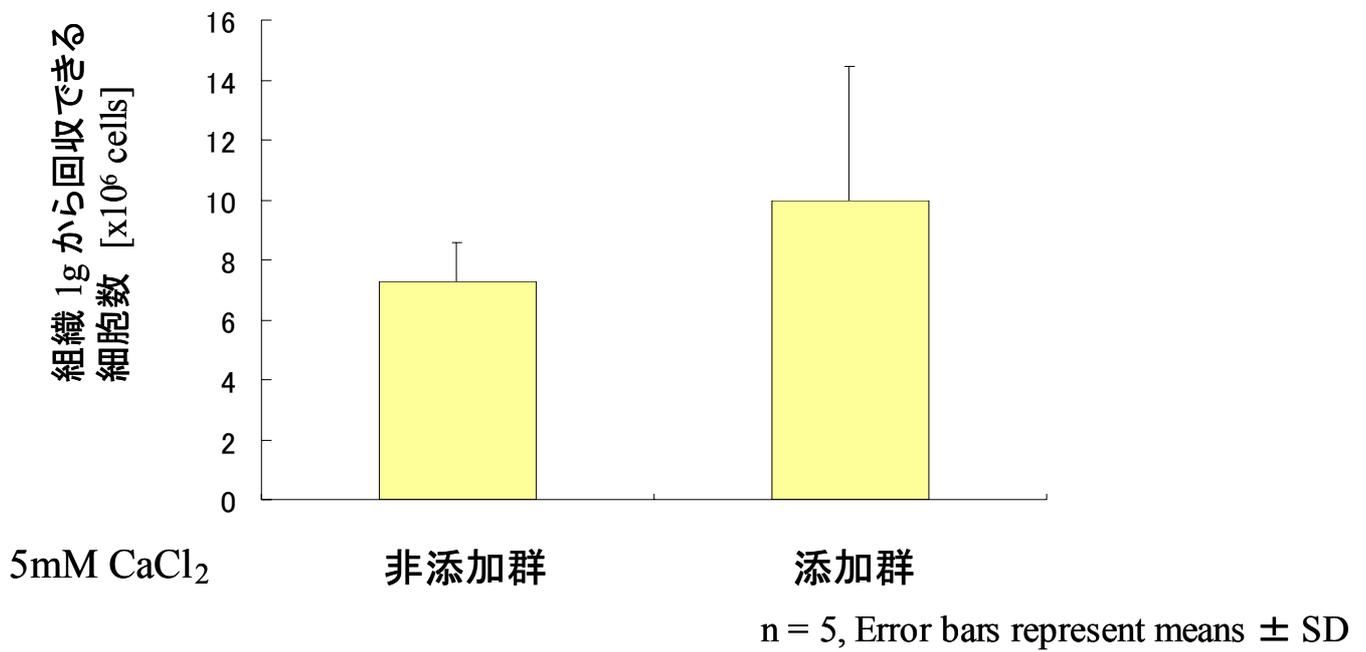


Figure 5. 組織からの血管内皮細胞分離条件の検討
ヒト肺非腫瘍組織を各コラゲナーゼ濃度で処理した時に得られる細胞数を示したグラフ (A) と得られた細胞の死細胞の割合 (B) を示したグラフ。

C.



D.

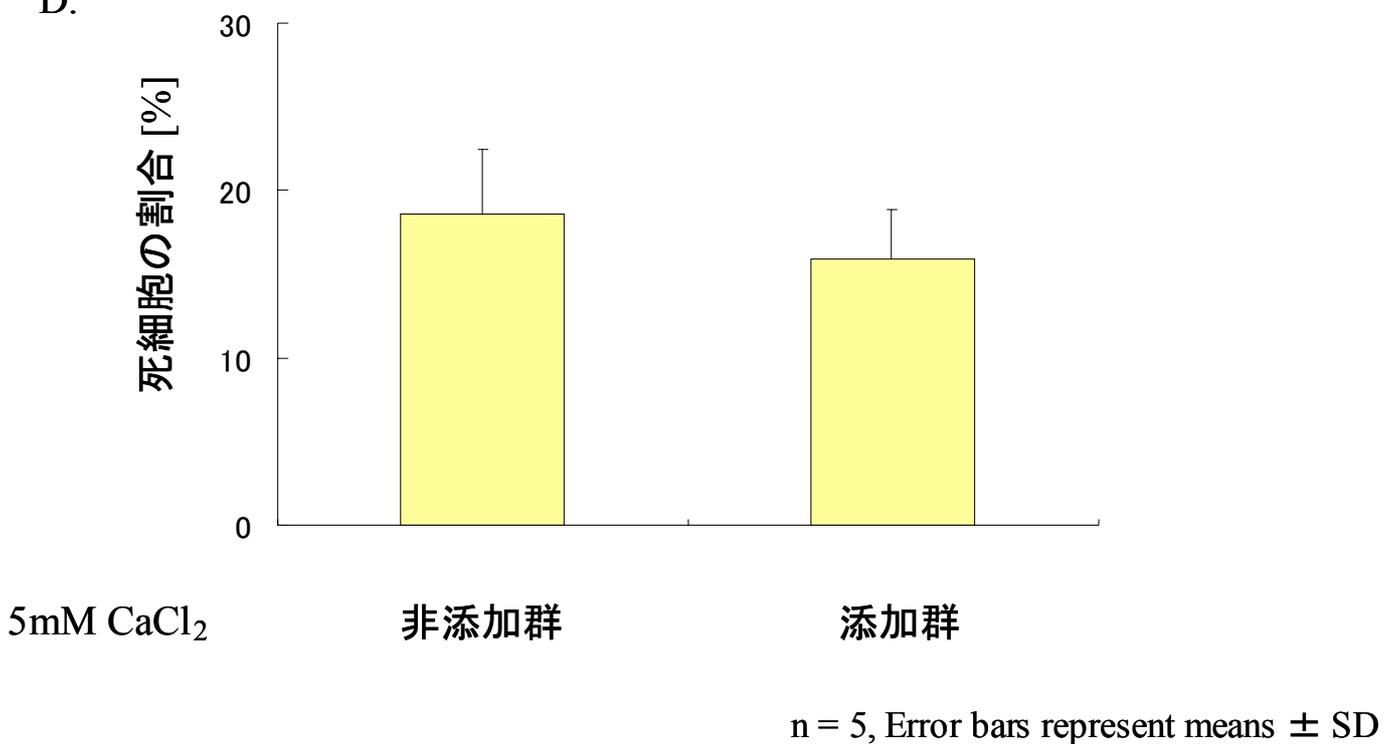


Figure 5. 組織からの血管内皮細胞分離条件の検討

15 mg / ml のコラゲナーゼ溶液に 5mM CaCl₂ を添加した組織分解液と、5 mM CaCl₂ を非添加の組織分解液でヒト肺非腫瘍組織を酵素処理して得られる細胞数 (C) と得られた細胞の死細胞の割合 (D) を示したグラフ。

E.

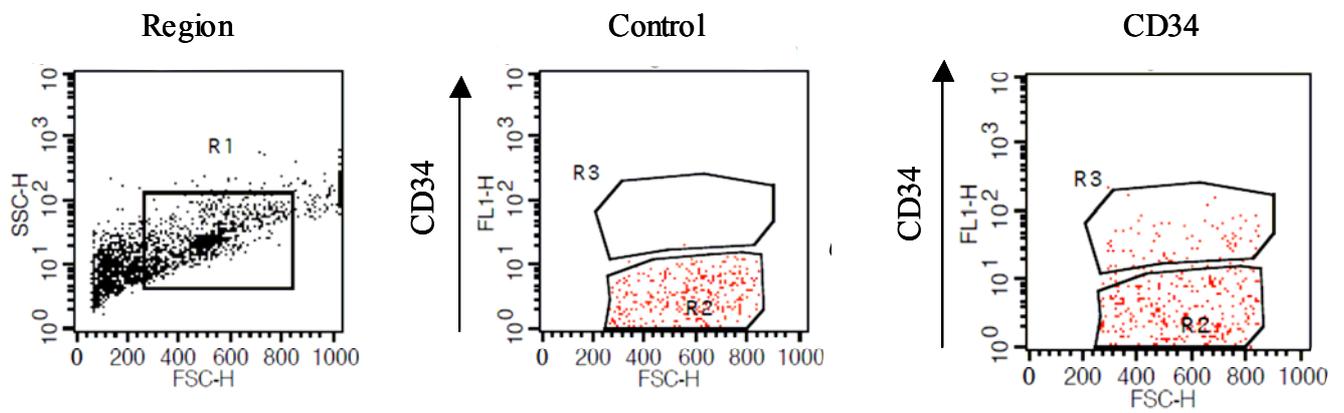


Figure 5. 組織からの血管内皮細胞分離条件の検討

(E) 組織を酵素処理し, Ficoll-paque を用いて回収した細胞集団中に含まれている CD34 陽性細胞 (血管内皮細胞) の割合。FITC 標識細胞 (CD34 陽性細胞) は、FL-1 で測定し、R3 画分の細胞を CD34 陽性細胞としてカウントした。

組織から分離した細胞集団

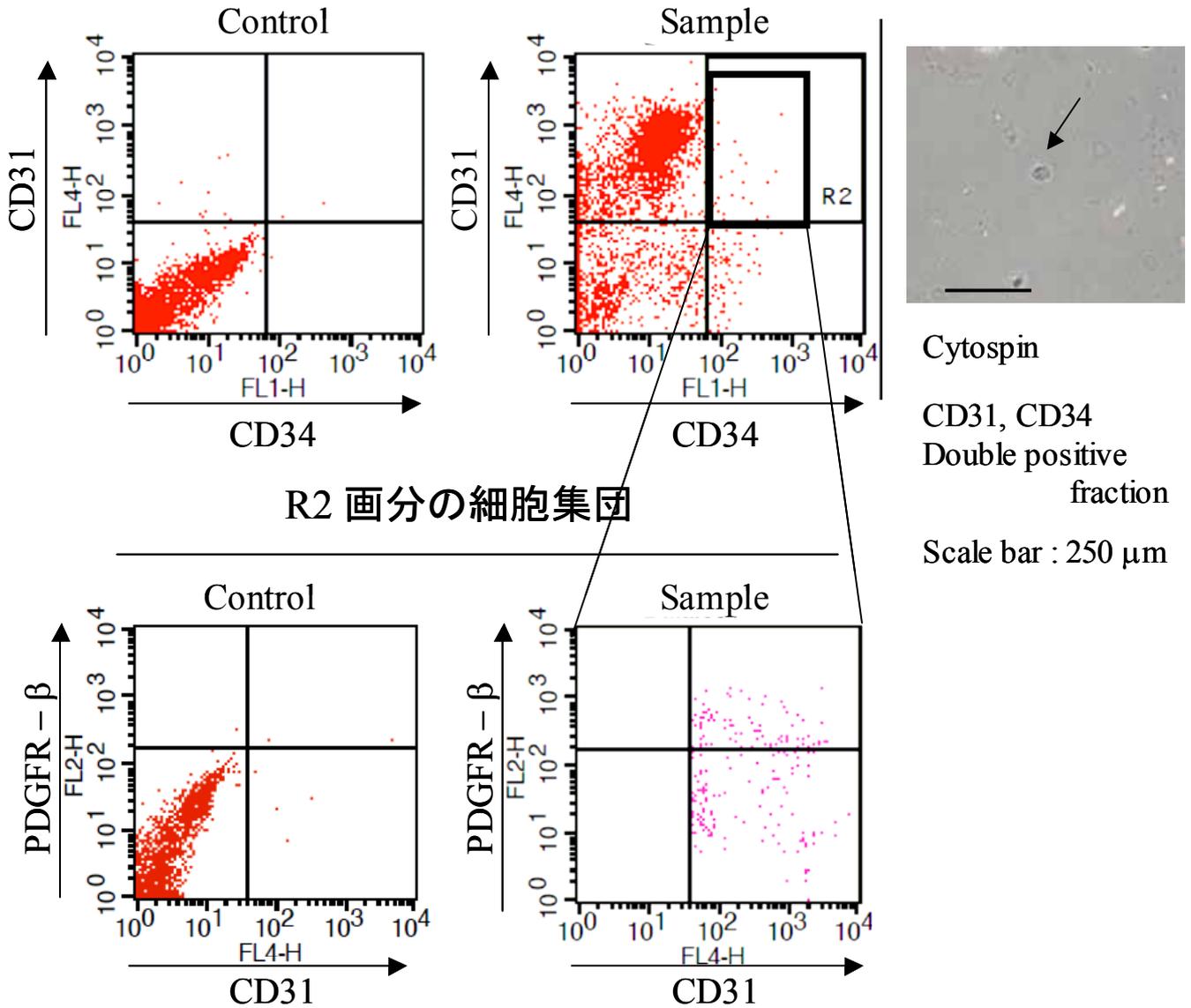


Figure 6. 肺の正常組織と腫瘍組織から回収した血管内皮細胞における PDGFR-β と EGFR の FACS を用いた発現解析

(A) 組織から回収した細胞集団の中で、CD31, CD34 共陽性細胞を血管内皮細胞と定め、その細胞集団について PDGFR-β と EGFR の発現を解析した図。FITC 標識細胞 (CD34 陽性細胞) は FL-1、PE 標識細胞 (PDGFR-β 又は EGFR 陽性細胞) は FL-2、APC 標識細胞 (CD31 陽性細胞) は FL-4 で測定した。CD31, CD34 共陽画分は R2 とした。血管内皮細胞の中で、R3 画分の細胞を PDGFR-β 又は EGFR 陽性細胞としてカウントした。写真中の矢印は、細胞成分を示している。スケールバーは、250μm を示す。

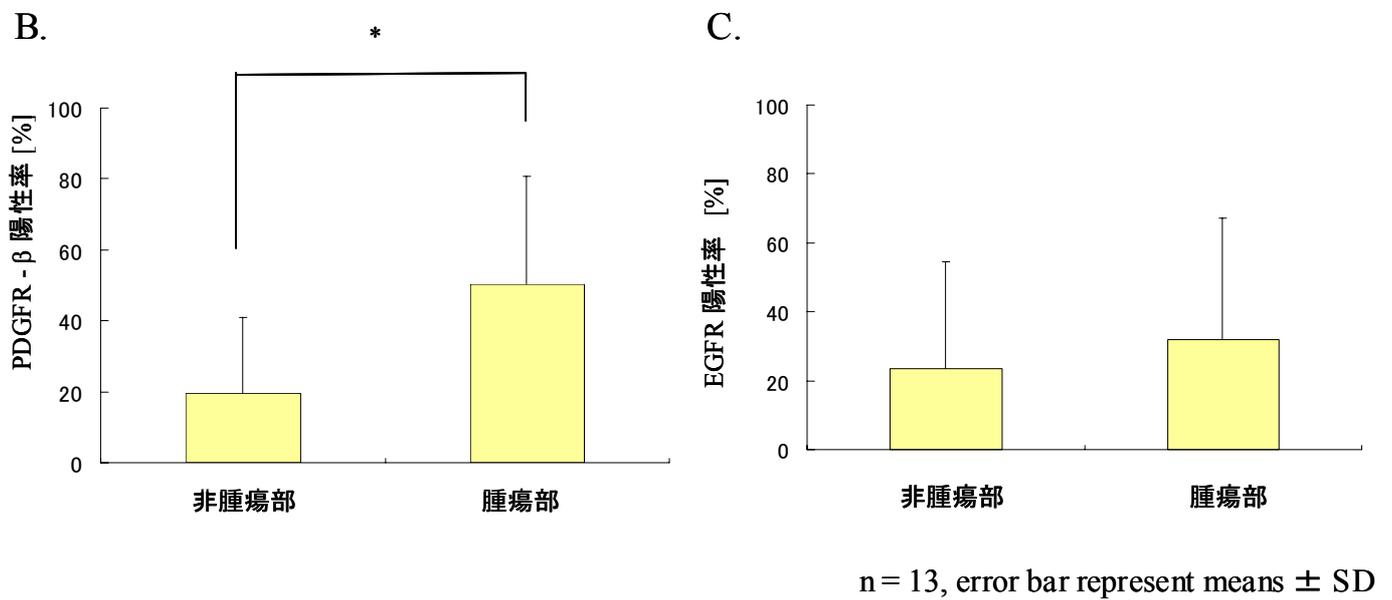
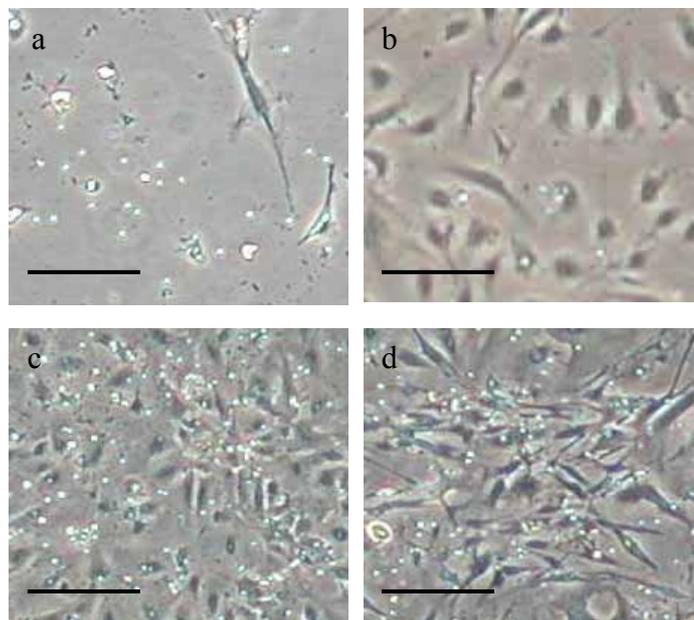


Figure 6. 肺の正常組織と腫瘍組織から回収した血管内皮細胞における PDGFR-β と EGFR の FACS を用いた発現解析
 (B) は、PDGFR-β の陽性率を、(D) は EGFR の陽性率をそれぞれ数値化したグラフ。13 検体検討し、標準偏差を求めた。また、* は $P < 0.01$ で有意に差があることを示している。

A.



Scale bar : 250 μm

Fig 7. 組織から回収、培養した細胞集団に含まれる血管内皮細胞マーカー陽性細胞の割合
(A) 組織から回収し、培養した細胞の形態。(a) 細胞が増殖してこない検体、(b) HUVEC の形態、
(c) 血管内皮細胞様の形態、(d) 線維芽細胞様の形態。スケールバーは、250 μm を示す。

B.

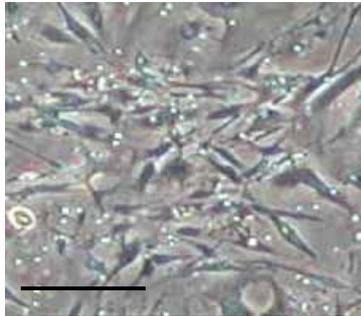


Fig 7 A - d
線維芽細胞様の形態を示す細胞

Scale bar : 250 μ m

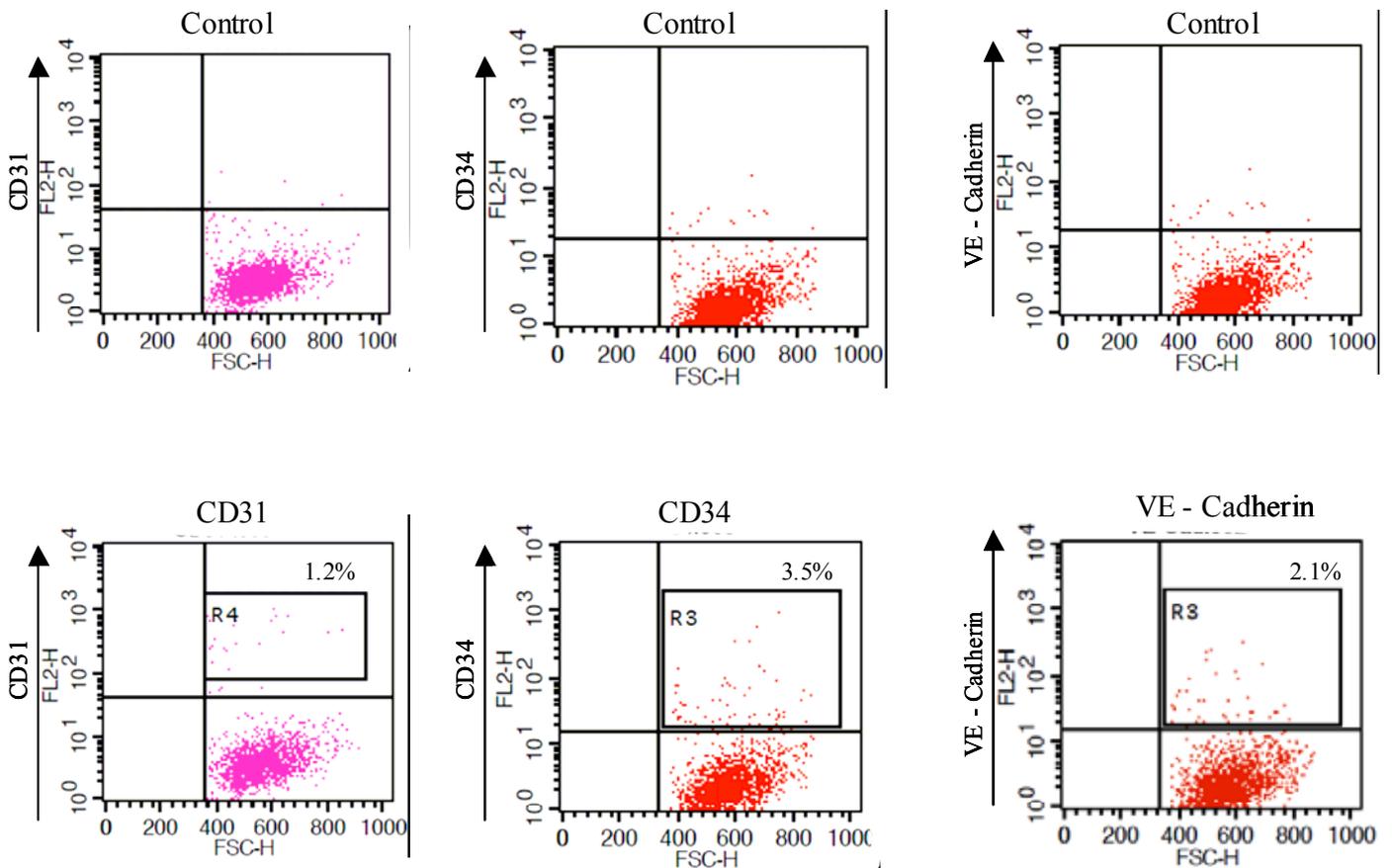


Fig 7. 組織から回収、培養した細胞集団に含まれる血管内皮細胞マーカー陽性細胞の割合
(B) 線維芽細胞様の形態を示す細胞について、血管内皮細胞マーカーである CD31, CD34, VE - Cadherin の発現を FACS で解析した。PE 標識細胞は、FL - 2 で測定し、それぞれ、上段のコントロールに対して、上側にシフトしている細胞 (R3、R4 画分の細胞) をマーカー陽性の細胞として、割合を算出した。スケールバーは、250 μ m を示す。

C.

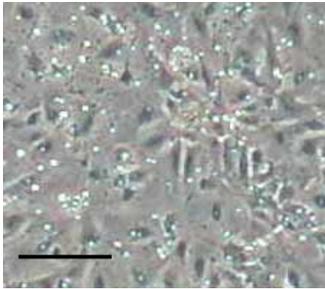


Fig 7 A - c

血管内皮細胞様の形態を示す細胞

Scale bar : 250 μ m

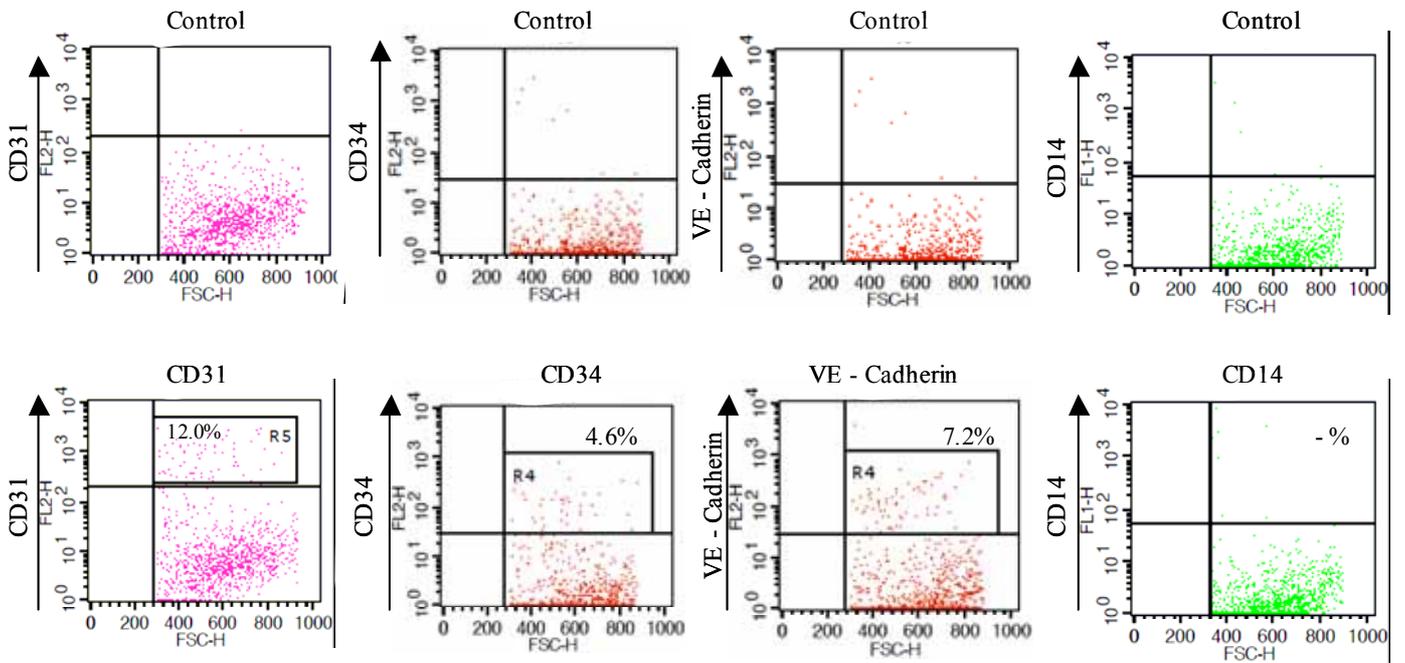


Fig 7. 組織から回収した細胞集団に含まれる血管内皮細胞マーカー陽性細胞の割合

(C) 血管内皮細胞様の形態を示す細胞について、血管内皮細胞マーカーである CD31, CD34, VE - Cadherin の発現と、単球やマクロファージのマーカーである CD14 の発現について FACS で解析を行った。PE 標識細胞は、FL - 2 で、FITC 標識細胞は、FL - 1 で測定した。CD31, CD34, VE - Cadherin に関しては上段のコントロールに対して、上側にシフトしている細胞 (R4、R5 画分の細胞) をマーカー陽性細胞として判定し、陽性率を算出した。スケールバーは、250 μ m を示す。

A.

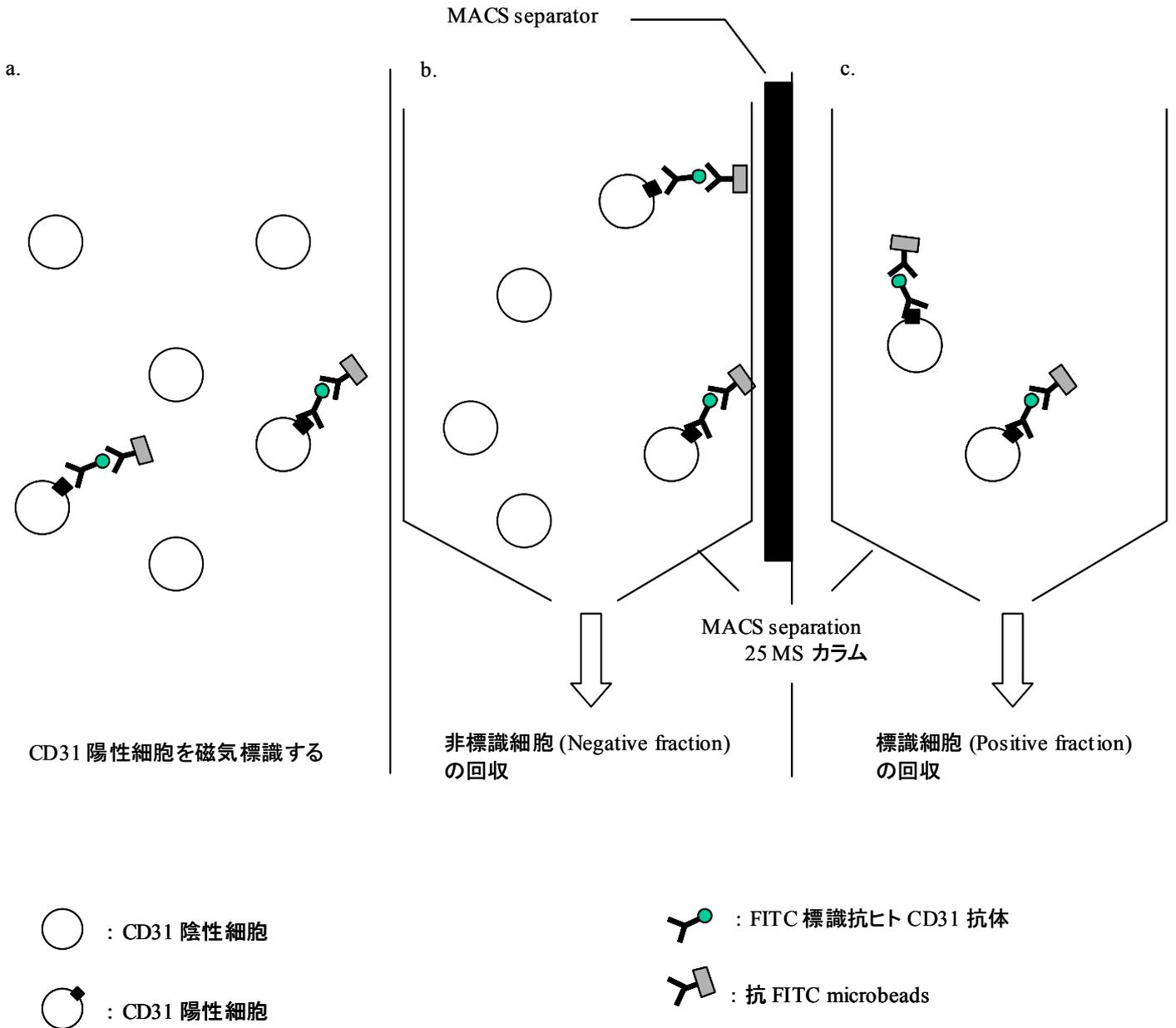
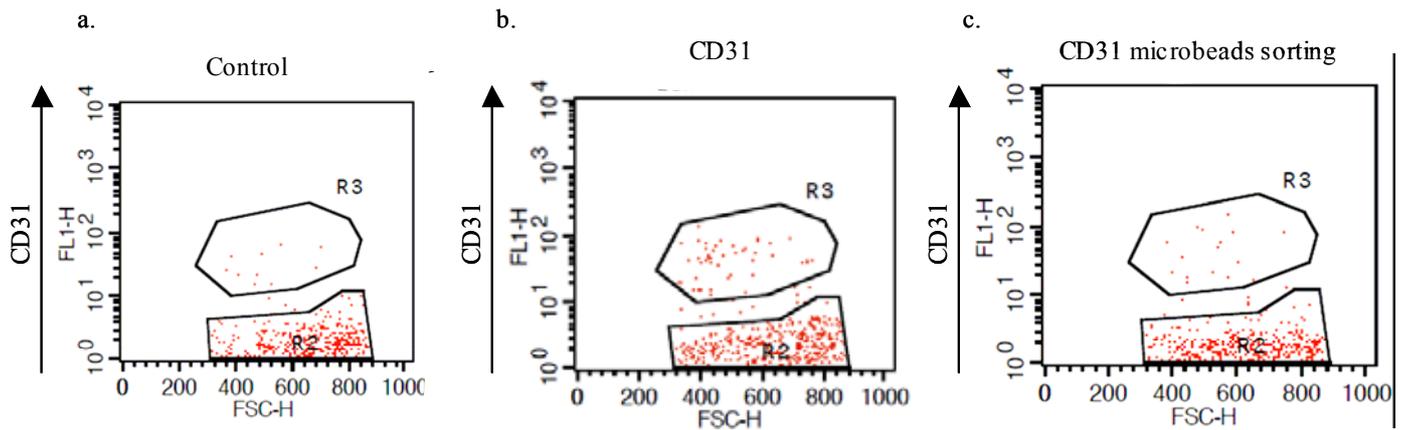


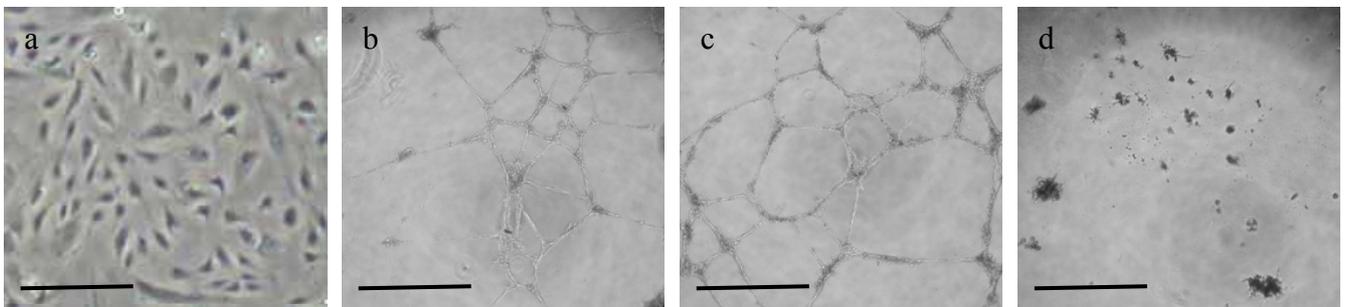
Figure 8. 組織からの血管内皮細胞の単離・培養

(A) Microbeads を用いた細胞単離の原理。(a) 磁気標識された microbeads で細胞集団中の CD31 陽性細胞を標識した。(b) 磁場が発生している MACS separator に MACS separation 25 MS カラムをセットし、細胞集団をカラムに通す。細胞集団の中で、磁気標識を受けた CD31 陽性細胞はカラムにトラップされる。(c) カラムを MACS separator の磁場からはずし、カラムに吸着している CD31 陽性細胞を回収する。

B.



C.



Scale bar : 250 μ m

D.

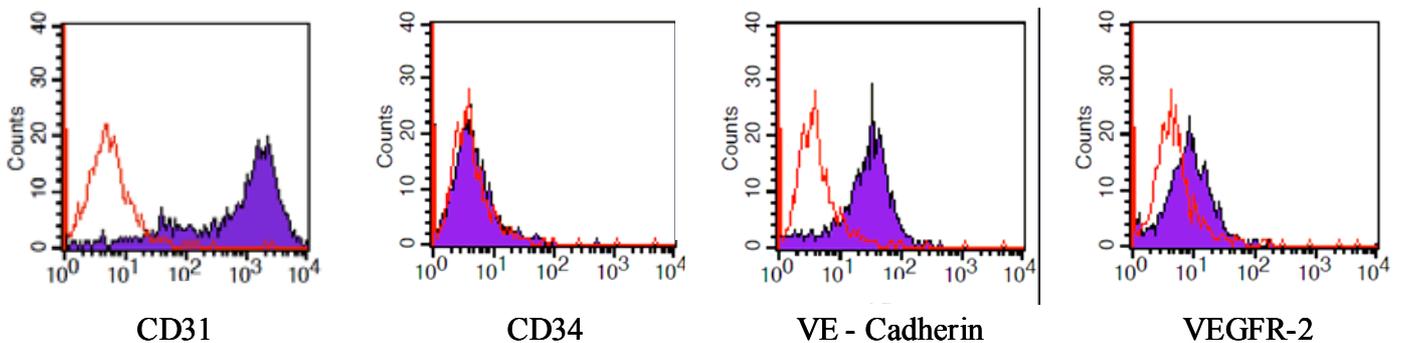


Figure 8. 組織からの血管内皮細胞の単離・培養

- (B) 組織から回収し、培養した細胞についてMicrobeadsでCD31陽性細胞をソーティングした。(a) コントロール、(b) 細胞集団中のCD31陽性細胞の割合、(c) microbeadsでCD31陽性細胞をソーティングした細胞集団中のCD31陽性細胞の割合。FITC標識細胞はFL-1で測定し、R4画分に入った細胞をFITC標識(CD31陽性)細胞としてカウントした。
- (C) CD31陽性細胞をソーティングした細胞について、tube formation assayを行った。(a) 抗CD31 microbeadsによるソーティングを2回行い、9回継代を重ねた細胞。(b) (a)の細胞を用いたtube formation assay、(c) cancer associated fibroblast (CAF)を用いたtube formation assay(陰性コントロール)、(d) HUVECを用いたtube formation assay(陽性コントロール)。スケールバーは、250 μ mを示す。
- (D) 血管内皮細胞マーカーとして知られている表面分子(CD31, CD34, VE-Cadherin, VEGFR-2)の発現を(B)-(c)の細胞についてFACSで解析した図

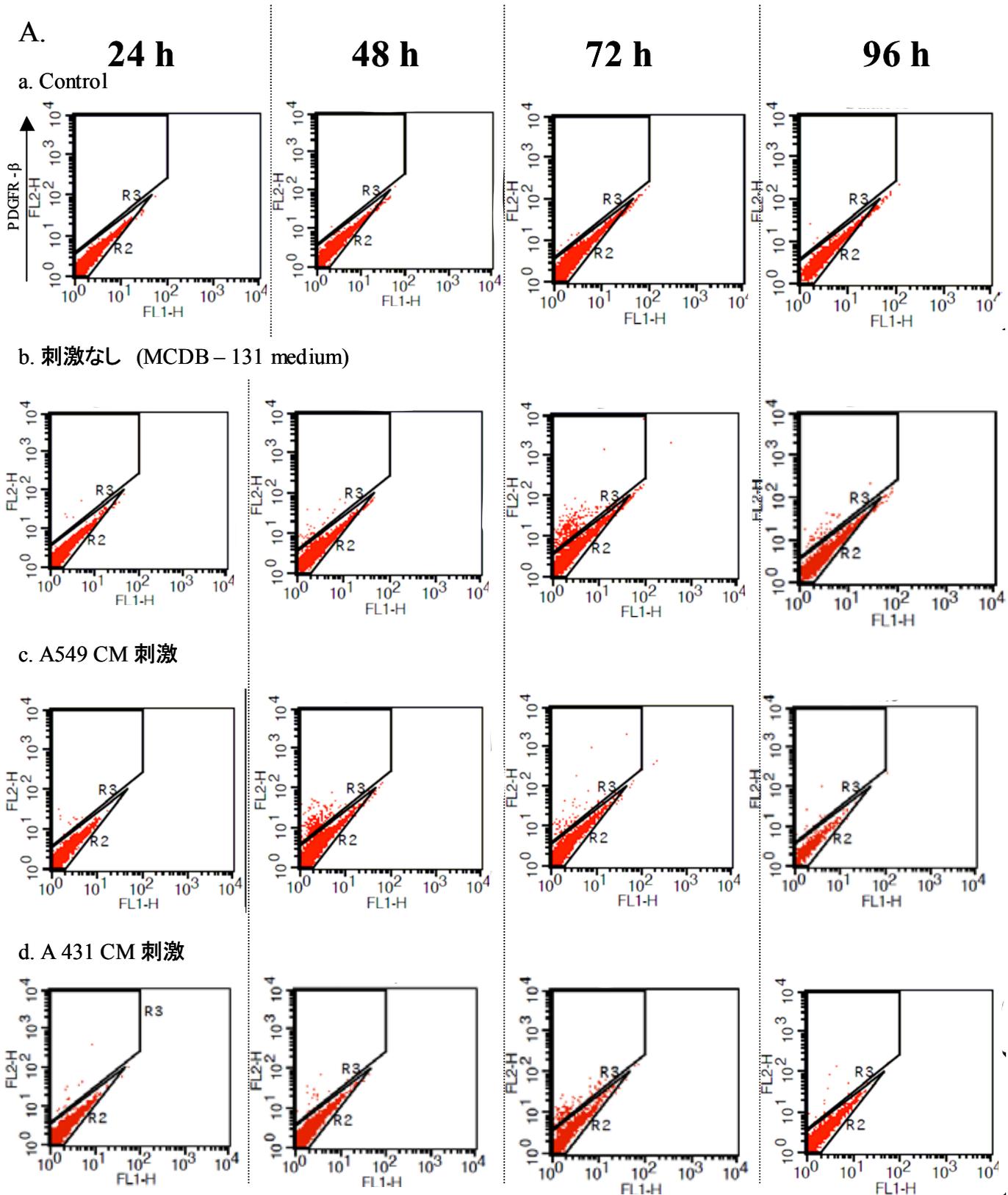


Figure 9. がん培養上清刺激に対する PDGFR- β の発現変化
 (A) HUVEC をがん培養上清で刺激した時の PDGFR- β の発現を FACS で解析した図。(a) コントロール、(b) 刺激なし、(c) A549 CM 刺激、(d) A431 CM 刺激を与えて 24, 48, 72, 96 時間後の PDGFR- β の陽性率を示している。PE 標識細胞 (ここでは、PEGFR- β 陽性細胞) は FL-2 で測定し、R3 画分に入った細胞を PEGFR- β 陽性細胞とカウントした。

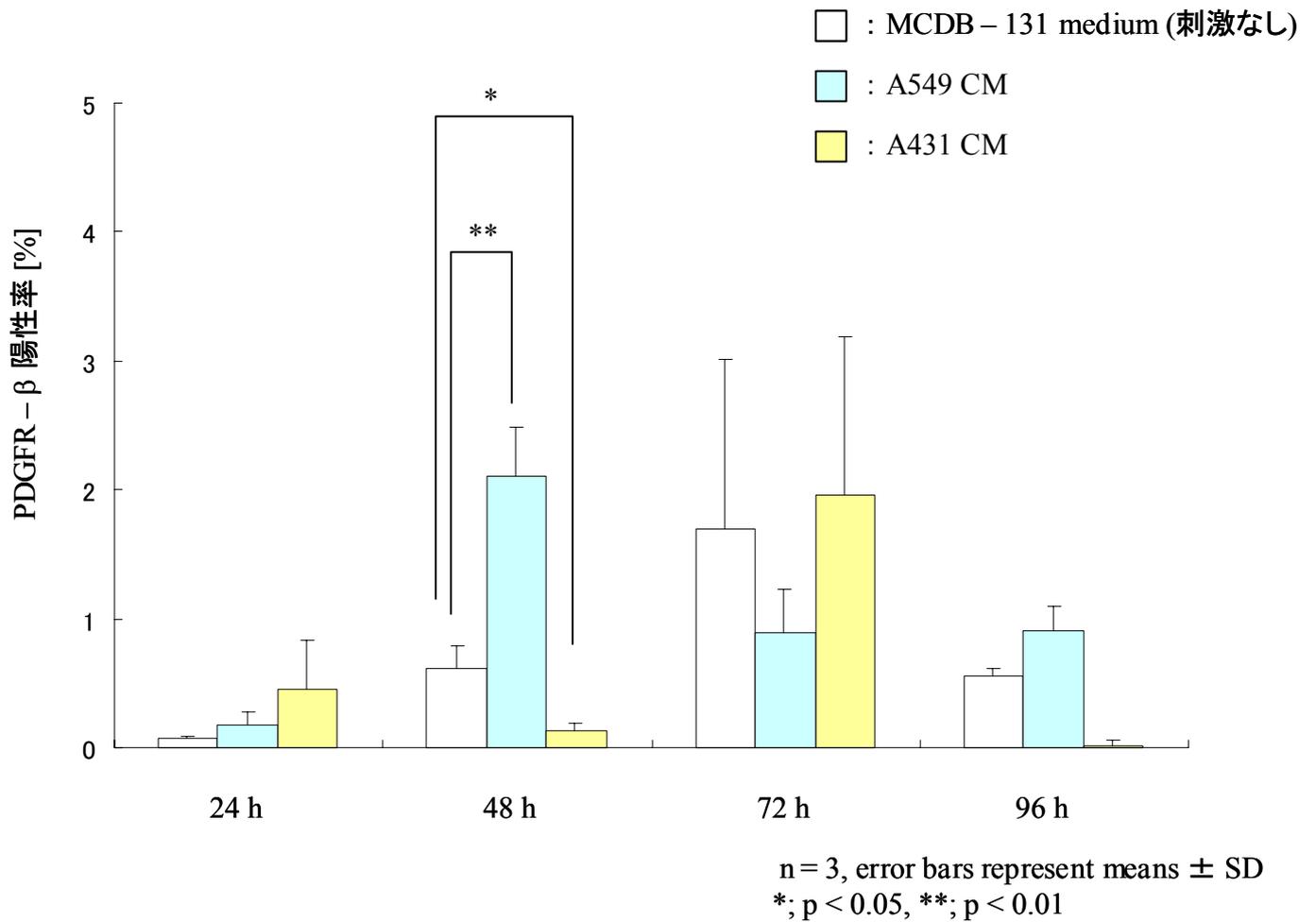


Figure 9. がん培養上清刺激に対するPDGFR-βの発現変化
 (B) FACSで評価した各条件のHUVECのPDGFR-βの陽性率を数値化したグラフ。
 N = 3で、エラーバーは標準偏差で算出している。*は、p = 0.01であることを示す。

Table 1. ヒト肺正常組織、腫瘍組織から回収し培養した細胞が示す形態とその頻度

| 組織からの細胞単離（症例数） | | | |
|----------------|-------|----------------|-----------------|
| | 培養不成功 | 線維芽細胞様の形態を示す細胞 | 血管内皮細胞様の形態を示す細胞 |
| 正常組織 | 8 | 20 | 4 |
| 腫瘍組織 | 4 | 6 | 2 |

Table 2. 血管内皮細胞様の形態を示す細胞からソーティングした CD31 陽性細胞を培養した時細胞が示す形態とその頻度

| CD31 陽性細胞のソーティング（正常組織由来 4 例、腫瘍組織由来 2 例） | | | |
|---|-------|----------------|-----------------|
| | 培養不成功 | 線維芽細胞様の形態を示す細胞 | 血管内皮細胞様の形態を示す細胞 |
| 正常組織 | 2 | 1 | 1 |
| 腫瘍組織 | 1 | 1 | 0 |

Table 1. ヒト肺正常組織及び、腫瘍組織を酵素処理し得られる細胞が、培養 7 日後に示す形態像とその頻度を示した。正常組織 32 検体、腫瘍組織 12 検体を用いた検討の結果。

Table 2. 組織から回収した細胞を培養し、血管内皮細胞様の形態を示す細胞から microbeads を用いてソーティングした CD31 陽性細胞が示す形態とその頻度を示した。正常組織由来で血管内皮細胞様の形態を示す 4 検体と腫瘍組織由来で血管内皮細胞様の形態を示す 2 検体を用いた検討。

9. 参考文献

1. Ishii, G., Sangai, T., Ito, T., Hasebe, T., Endoh, Y., Sasaki, H., Harigaya, K., and Ochiai, A. In vivo and in vitro characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma. *Int J Cancer*, *117*: 212-220, 2005.
2. Carmeliet, P. and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, *407*: 249-257, 2000.
3. Coussens, L. M. and Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, *420*: 860-867, 2002.
4. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, *438*: 932-936, 2005.
5. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, *9*: 653-660, 2003.
6. Arjamaa, O. and Nikinmaa, M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res*, *83*: 473-483, 2006.
7. Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, *9*: 669-676, 2003.
8. McDonald, D. M. and Choyke, P. L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med*, *9*: 713-725, 2003.
9. St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Genes expressed in human tumor endothelium.

- Science, *289*: 1197-1202, 2000.
10. Bussolati, B., Deambrosis, I., Russo, S., Deregibus, M. C., and Camussi, G. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *Faseb J*, *17*: 1159-1161, 2003.
 11. Allport, J. R. and Weissleder, R. Murine Lewis lung carcinoma-derived endothelium expresses markers of endothelial activation and requires tumor-specific extracellular matrix in vitro. *Neoplasia*, *5*: 205-217, 2003.
 12. Hida, K., Hida, Y., Amin, D. N., Flint, A. F., Panigrahy, D., Morton, C. C., and Klagsbrun, M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res*, *64*: 8249-8255, 2004.
 13. Amin, D. N., Hida, K., Bielenberg, D. R., and Klagsbrun, M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res*, *66*: 2173-2180, 2006.
 14. Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O., and Schwarzinger, I. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, *351*: 250-259, 2004.
 15. van Beijnum, J. R., Dings, R. P., van der Linden, E., Zwaans, B. M., Ramaekers, F. C., Mayo, K. H., and Griffioen, A. W. Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature. *Blood*, *108*: 2339-2348, 2006.
 16. Lu, C., Bonome, T., Li, Y., Kamat, A. A., Han, L. Y., Schmandt, R.,

- Coleman, R. L., Gershenson, D. M., Jaffe, R. B., Birrer, M. J., and Sood, A. K. Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma. *Cancer Res*, *67*: 1757-1768, 2007.
17. Buckanovich, R. J., Sasaroli, D., O'Brien-Jenkins, A., Botbyl, J., Hammond, R., Katsaros, D., Sandaltzopoulos, R., Liotta, L. A., Gimotty, P. A., and Coukos, G. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol*, *25*: 852-861, 2007.
 18. Seaman, S., Stevens, J., Yang, M. Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C., and St Croix, B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell*, *11*: 539-554, 2007.
 19. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*: 127-137, 2001.
 20. Ostman, A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*, *15*: 275-286, 2004.
 21. Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest*, *112*: 1142-1151, 2003.
 22. Hwang, R. F., Yokoi, K., Bucana, C. D., Tsan, R., Killion, J. J., Evans, D. B., and Fidler, I. J. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude

- mouse model. *Clin Cancer Res*, *9*: 6534-6544, 2003.
23. Apte, S. M., Fan, D., Killion, J. J., and Fidler, I. J. Targeting the platelet-derived growth factor receptor in antivasular therapy for human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, *10*: 897-908, 2004.
 24. Vrekoussis, T., Stathopoulos, E. N., Kafousi, M., Navrozoglou, I., and Zoras, O. Expression of endothelial PDGF receptors alpha and beta in breast cancer: up-regulation of endothelial PDGF receptor beta. *Oncol Rep*, *17*: 1115-1119, 2007.
 25. Greenberg, J. I., Shields, D. J., Barillas, S. G., Acevedo, L. M., Murphy, E., Huang, J., Schepke, L., Stockmann, C., Johnson, R. S., Angle, N., and Cheresh, D. A. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, *456*: 809-813, 2008.
 26. Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, *161*: 1163-1177, 2003.
 27. Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomaki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellstrom, M., Schomber, T., Peltonen, R., Freitas, C., Duarte, A., Isoniemi, H., Laakkonen, P., Christofori, G., Yla-Herttuala, S., Shibuya, M., Pytowski, B., Eichmann, A., Betsholtz, C., and Alitalo, K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*, *454*: 656-660, 2008.
 28. Goon, P. K., Lip, G. Y., Boos, C. J., Stonelake, P. S., and Blann, A. D. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and

endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia*, 8: 79-88, 2006.

10. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始熱心に御指導頂きました、国立がんセンター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部部長 落合淳志教授、病理形態室長 石井源一郎先生に心より感謝致します。

組織からの血管内皮細胞の単離について、詳細な御指導を賜りました、SCIVAX 株式会社主任バイオ研究員 小澤ふじ子先生に心より感謝致します。

良い考えが浮かばずふさぎ込んでいる時、持ち前の明るさで元気づけて頂きました、病理部の母こと、臨床腫瘍病理部実験助手 橋本弘子さん

一人で思い悩んでいる時、救いの手を差し伸べてくださいました、星野先輩

実験の素人の私に、常に的確な指摘をしてくださいました、厚海先輩

ろくな考察も出来ない後輩を見捨てず、常にヒントを与えてくださいました、伊藤先輩

部内カンファレンスでは、度々貴重な意見をくださいました、光永先生

その切れ味の鋭いギャグは、私の人生に大きな影響を及ぼしました、安次嶺先生

あの“素晴らしき世界”は、忘れることができません、木村先生

下を向いてどんより歩いている私に、いつも明るく挨拶をしてくださいました、山崎先生

くじけそうになる私を気にかけてください、励まし続けてくださいました、山田先生

とてもフレンドリーで、良く声をかけてくださいました、井元先生

組織免疫染色が上手く染まらず悩んでいる時、一緒になって問題点を考え、染色工程を最初から最後までご指導してくださいました、山内先生

いつも暖かく見守ってくださり、気軽に声をかけてくださいました、藤井先生

先生のご期待には沿えず、無事卒業できることになってしまいました、小嶋先生

カンファレンスで、鋭い質問を投げかける姿に感銘を受けました、相垣さん
就職活動中、視野狭窄だった私の世界を広げ、もっと自由に就職活動するよう説いてくだ
さいました、真田先輩
突然の依頼にも、快く応じて、組織切片の作製をしていただきました、福田さん
度々ご迷惑をおかけしたにも関わらず、常に明るく接してくださいました、須崎さん
2年間の研究生生活を支えてくださいました、臨床腫瘍病理部の皆様に感謝致します。