



Alteration of Cell-Cell Junctions in Cultured Human Lymphatic Endothelial Cells with Inflammatory Cytokine Stimulation

Kakei, Yasumasa

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6508号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006508>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Alteration of Cell-Cell Junctions in Cultured Human Lymphatic Endothelial Cells with Inflammatory Cytokine Stimulation

炎症性サイトカインによるヒトリンパ管内皮細胞の細胞接着の変化

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻外科系講座

口腔外科学分野

(指導教員：古森孝英教授)

覧 康正

緒言

リンパ管は免疫応答や体液の恒常性の維持にとって必要不可欠である。また、リンパ管は悪性腫瘍の転移や慢性炎症といった様々な病的状態においても重要であることが近年解明されつつある。リンパ管において細胞間接着複合体は、正常機能の維持や病的状態からの回復に重要な役割を果たしている。細胞間接着複合体は主にタイトジャンクション(以下 TJ)・アドヘレンスジャンクション(以下 AJ)によって構成され、TJ は主に細胞間のバリアに、AJ は細胞間の接着に機能している。TJ 構成膜タンパク質は内皮細胞ではクローディン 5 が発現し、ZO-1 等の裏打ちタンパクと細胞間接着複合体を形成している。AJ 構成膜タンパク質は内皮細胞では VE カドヘリンが発現、 β カテニン等の裏打ちタンパク質と結合し、細胞骨格タンパク質アクチンと連結している。

リンパ管は毛細リンパ管、集合リンパ管等の部位特異性があり、それらは細胞間接着によっても特徴付けられており、この多様性が組織液の吸収や輸送などの役割を反映していると考えられている。体液の恒常性を維持するため、毛細リンパ管においては周皮細胞の裏打ちがなく柏の葉状の内皮細胞が不連続な button-like junctions で繋留されており、組織間隙から起始リンパ管への組織液の流れに寄与している。集合リンパ管は細胞や組織液の流れが一方向になるよう弁を有しており逆流を防いれおり、内皮細胞は連続性のある zipper-like junctions を形成し血管同様、基底膜と平滑筋細胞が存在する。

血管においては細胞間接着の研究は数多く行われているが、リンパ管に関する報告は未だ十全でない。本研究の目的は、ヒトリンパ管内皮細胞における細胞間接着複合体の特質性を明らかにすること、また炎症性サイトカイン刺激下における細胞間接着複合体の変化を検討することである。

方法

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(以下 HDLEC)を使用し、TJ 構成分子である ZO-1、AJ 構成分子 VE カドヘリン・PECAM1・ β カテニン、細胞骨格分子アクチンについて免疫染色を施行した。炎症性サイトカイン TNF- α 刺激下で同様に免疫染色を施行し、経内皮電気抵抗(以下 TER)を測定、VE カドヘリンの発現量をウェスタンプロット法により測定した。

結果

野生型 HDLEC における VE カドヘリンと ZO-1 の二重蛍光免疫染色の結果、リンパ管には連続した直線状の cell junction と不連続な cell junction が混在していた。これら junction で VE カドヘリンと ZO-1 は共局在していたが、VE カドヘリンは細胞間でより幅広に発現しており、これを VE-cadherin-positive broad area と仮称した。

AJ マーカーである VE カドヘリンと PECAM-1 の二重蛍光免疫染色を行った結果、連続した直線状の junction 及び VE-cadherin-positive broad area では両者は共発現していたが、不連続な junction においては VE カドヘリンのみが発現していた。

TNF- α 刺激下で VE カドヘリン、ZO-1、アクチンの三重免疫染色を行った結果、TNF- α 刺激により HDLEC は伸長し直線状の junction は減少、不連続な junction が優位となり、VE-cadherin-positive broad area も減少、TER も減少した。一方、TNF- α 刺激下でも VE カドヘリンの総タンパク量に変化はなく、 β カテニンの局在にも変化はなかった。

考察

HDLEC の cell junction は連続な部分と不連続な部分が混在していることが判明した。連続性のある線状の cell junction は血管内皮細胞の cell junction と類似していると考えられた。また本研究では、細胞間周辺の VE カドヘリンの特徴的な局在を VE-cadherin positive broad area と仮称したが、過去の研究では肺動脈内皮細胞において VE-cadherin positive area が増加した結果、細胞間のバリア機能が高まったと報告されている。同様に、TNF- α 刺激により細胞間透過性が亢進した状態で VE-cadherin positive area が減少した結果より、リンパ管内皮細胞においても VE-cadherin-positive broad area が内皮細胞のバリア機能と関連していると考えられた。VE-cadherin positive broad area では PECAM-1 が VE カドヘリンよりも免疫染色上強い発現を呈しており、これは、血管内皮細胞において細胞間周辺の幅広な PECAM-1 の局在は隣接する細胞同士の重なりを示していると過去の報告で指摘されているとの同様の意味を有するのかも知れない。

炎症性サイトカイン刺激下での HDLEC における細胞間接着複合体の変化について検討するため、以下の条件を適用した (10ng/ml TNF- α 24 時間)。上皮細胞であれば 50ng/ml 未満では毒性はないことが過去に報告されている。過去の報告では、慢性炎症が続くと連続した直線状の junction が不連続な junctions に置換され、浮腫の改善等に関与していると報告されている。本研究では、TNF- α 刺激下で不連続な junction が増加し、VE-cadherin positive broad area 及び TER は減少したことから、隣接する細胞同士の重なりを示している可能性のある VE-cadherin positive broad area が HDLEC における細胞間透過性を反映している可能性が示唆された。この仮説を証明するためには今後 *in vivo* での追加実験が必要であろう。

まとめ

野生型 HDLEC の細胞間接着複合体は、連続する直線状の部分と不連続な junction が混在するヘテロなものであった。両 cell junction において ZO-1、VE カドヘリンは共局在していた。炎症性サイトカイン刺激下においては、隣接する細胞同士の重なりが減少し、不連続な junction が優位となり、細胞間透過性は亢進した。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2535 号	氏名	寛 康正
論文題目 Title of Dissertation	<p>Alteration of Cell-Cell Junctions in Cultured Human Lymphatic Endothelial Cells with Inflammatory Cytokine Stimulation</p> <p>炎症性サイトカインによるヒトリンパ管内皮細胞の細胞接着の変化</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p>		
	角 康博	錦織 千佳子	寺田 博人

(要旨は1,000字～2,000字程度)

リンパ管は免疫応答や体液の恒常性の維持にとって必要不可欠である。また、リンパ管は悪性腫瘍の転移や慢性炎症といった様々な病的状態においても重要であることが近年解明されつつある。リンパ管において細胞間接着複合体は、正常機能の維持や病的状態からの回復に重要な役割を果たしている。細胞間接着複合体は主にタイトジャンクション(以下 TJ)・アドヘレンスジャンクション(以下 AJ)によって構成され、TJ は主に細胞間のバリアに、AJ は細胞間の接着に機能している。TJ 構成膜タンパク質は内皮細胞ではクローディン 5 が発現し、ZO-1 等の裏打ちタンパクと細胞間接着複合体を形成している。AJ 構成膜タンパク質は内皮細胞では VE カドヘリンが発現、B カテニン等の裏打ちタンパク質と結合し、細胞骨格タンパク質アクチンと連結している。リンパ管は毛細リンパ管、集合リンパ管等の部位特異性があり、それらは細胞間接着によっても特徴付けられており、この多様性が組織液の吸収や輸送などの役割を反映していると考えられている。体液の恒常性を維持するため、毛細リンパ管においては周皮細胞の裏打ちがなく柏の葉状の内皮細胞が不連続な button-like junctions で繋留されており、組織間隙から起始リンパ管への組織液の流れに寄与している。集合リンパ管は細胞や組織液の流れが一方向になるよう弁を有しており逆流を防いでおり、内皮細胞は連続性のある zipper-like junctions を形成し血管同様、基底膜と平滑筋細胞が存在する。血管においては細胞間接着の研究は数多く行われているが、リンパ管に関する報告は未だ十分でない。

本研究では、ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) における細胞間接着複合体の特質性を明らかにすること、また炎症性サイトカイン刺激下における細胞間接着複合体の変化を検討した。

野生型 HDLEC における VE カドヘリンと ZO-1 の二重蛍光免疫染色の結果、リンパ管には連続した直線状の cell junction と不連続な cell junction が混在していた。これら junction で VE カドヘリンと ZO-1 は共局在していたが、VE カドヘリンは細胞間でより幅広に発現しており、これを VE-cadherin-positive broad area と仮称した。

AJ マーカーである VE カドヘリンと PECAM-1 の二重蛍光免疫染色を行った結果、連続した直線状の junction 及び VE-cadherin-positive broad area では両者は共発現していたが、不連続な junction においては VE カドヘリンのみが発現していた。TNF- α 刺激下で VE カドヘリン、ZO-1、アクチンの三重免疫染色を行った結果、TNF- α 刺激により HDLEC は伸長し直線状の junction は減少、不連続な junction が優位となり、VE-cadherin-positive broad area も減少、TER も減少した。一方、TNF- α 刺激下でも VE カドヘリンの総タンパク量に変化はなく、B カテニンの局在にも変化はなかった。

HDLEC の cell junction は連続な部分と不連続な部分が混在していることが判明した。連続性のある線状の cell junction は血管内皮細胞の cell junction と類似していると考えられた。また本研究では、細胞間周辺の VE カドヘリンの特徴的な局在を VE-cadherin-positive broad area と仮称したが、過去の研究では肺動脈内皮細胞において VE-cadherin positive area が増加した結果、細胞間のバリア機能が高まったと報告されている。同様に、TNF- α 刺激により細胞間透過性が亢進した状態で VE-cadherin positive area が減少した結果より、リンパ管内皮細胞にお

いても VE-cadherin-positive broad area が内皮細胞のバリア機能と関連していると考えられた。VE-cadherin positive broad area では PECAM-1 が VE カドヘリンよりも免疫染色上強い発現を呈しており、これは、血管内皮細胞において細胞間周辺の幅広な PECAM-1 の局在は隣接する細胞同士の重なりを示していると過去の報告で指摘されているのと同様の意味を有するのかも知れない。

炎症性サイトカイン刺激下での HDLEC における細胞間接着複合体の変化について検討するため、以下の条件を適用した (10ng/ml TNF- α 24 時間)。上皮細胞であれば 50ng/ml 未満では毒性はないことが過去に報告されている。過去の報告では、慢性炎症が続くと連続した直線状の junction が不連続な junctions に置換され、浮腫の改善等に関与していると報告されている。本研究では、TNF- α 刺激下で不連続な junction が増加し、VE-cadherin positive broad area 及び TER は減少したことから、隣接する細胞同士の重なりを示している可能性のある VE-cadherin positive broad area が HDLEC における細胞間透過性を反映している可能性が示唆された。この仮説を証明するためには今後 *in vivo* での追加実験が必要であろう。

本研究はヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) の細胞接着について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった、炎症性サイトカイン添加時における HDLEC の細胞接着について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。