



Ionizing radiation enhances paracellular permeability through alteration of intercellular junctions in cultured human lymphatic endothelial cells

Kishimoto, Megumi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7333号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007333>

※ 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

Ionizing radiation enhances paracellular permeability through alteration of intercellular junctions in cultured human lymphatic endothelial cells

電離放射線は培養ヒトリンパ管内皮細胞の細胞間接着に変化を与え
細胞間透過性を亢進させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
口腔外科学
(指導教員：古森 孝英教授)

岸本 恵実

【緒言】

放射線治療後の重大な合併症のひとつにリンパ浮腫がある。リンパ管が障害を受けるとリンパ液が漏出して組織間隙に貯留し、炎症や線維化を惹起して機能不全を引き起こす。特に頭頸部癌に対する放射線治療においては、皮膚炎や皮膚性拘縮、嚥下・咀嚼・発音等の機能障害が生じる。リンパ浮腫の予防および治療は、患者の QOL を向上させる上で重要であると考えられているが、その発生メカニズムは未だ解明されていない。したがって、リンパ浮腫に関わる詳細な分子機構を明らかにすることは重要である。近年、電離放射線が血管内皮細胞の細胞間接着へ影響を与えるという報告が散見される。特に、細胞間接着装置の接着結合を構成する主要分子である VE-cadherin (以下 VE-cad) や、デスモゾームを構成する主要分子である Connexin (以下 Cx) が注目されている。当科では過去に、培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞の成熟した細胞間接着と思われる細胞辺縁には VE-cad がブロード状に濃縮して局在し、炎症性サイトカインがこの VE-cad の局在を変化させて細胞間透過性を亢進することを報告した。電離放射線はリンパ管内皮細胞の細胞間接着に変化を与え、その結果細胞間透過性が亢進するのではないかと考え、研究を行った。

【材料と方法】

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC 細胞) は、5% ウシ胎児血清、1% 内皮細胞増殖因子を含む推奨培地を用い、フィブロネクチンをコートした培養皿上で培養した。放射線は、実験用 X 線照射装置を用いて 5 または 20Gy を細胞に照射した。VE-cad・Cx43・Actin・DAPI について蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞間透過性は、単層の HDLEC 細胞を透過する蛍光標識したデキストランを蛍光プレートリーダーで測定することにより解析した。細胞生存率は、MTT 試験に準じ、生細胞により生成されるホルマザン色素を蛍光プレートリーダーで測定することにより解析した。放射線非照射、5Gy 照射、20Gy 照射の HDLEC 細胞について、Tukey の多重比較検定を行い、有意水準を 5% とした。

【結果】

細胞密度が高い条件で培養した HDLEC 細胞を VE-cad と Actin で蛍光免疫二重染色した。VE-cad は、放射線非照射の細胞では細胞辺縁にブロード状に局在していたが、5Gy、20Gy と放射線照射量が増えるに従って VE-cad のブロード状の局在は減少した。Actin は、放射線非照射の細胞では、細胞の辺縁に VE-cad と共局在していた。一方で、5Gy、20Gy と放射線照射量が増えるに従って、細胞の辺縁において VE-cad と共局在する Actin は減少した。以上の結果は、以前に当科で確認した炎症性サイトカイン刺激を与えた場合の局在パターンと類似していたが、Actin に関しては炎症性サイトカインにより惹起されるストレスファイバー様の構造は呈しなかった。同様に、細胞密度が低い条件で培養した HDLEC 細胞を VE-cad と Actin で蛍光免疫二重染色した。VE-cad は、細胞密度が高い条件下と同様に細胞の辺縁に局在していたが、ブロード状ではなくジグザグ状に局在していた。5Gy、20Gy と放射線照射量が増えるに従ってジグザグ状に局在する VE-cad は減少した。Actin の変化は、細胞密度が高い条件下と同様であった。

次に、細胞密度が高い条件で培養した HDLEC 細胞を観察し、細胞間接着の総数および VE-cad がブロード状に局在する細胞辺縁数を計測した。放射線非照射と比較して 5Gy、20Gy と放射線照射量が増えるに従い、VE-cad がブロード状に局在する細胞辺縁数の割合は有意に減少した。これは蛍光免疫染色の結果と一致した。

さらに、単層の HDLEC 細胞を透過する蛍光標識したデキストランについて解析した。デキストランは、放射線非照射の細胞では約 15% しか透過しなかったのに対し、5 Gy 照射の細胞では約 30%、20Gy 照射の細胞では約 35% 透過し、放射線照射量が増えるに従って細胞間を透過するデキストランは有意に増加した。

最後に、細胞密度が高い条件で培養した HDLEC 細胞を VE-cad・Cx43・DAPI で蛍光免疫三重染色した。放射線非照射および 5 Gy 照射の細胞では、Cx43 はブロード状の VE-cadherin と共局在していた。一方で、20Gy 照射の細胞では、VE-cad と同様に細胞の辺縁において局在する Cx43 は減少した。

なお、細胞生存率については、蛍光顕微鏡下での観察と MTT 試験により解析したが、放射線非照射、5Gy 照射、20Gy 照射の間で有意差は認めなかった。

【考察】

HDLEC細胞に放射線を照射すると、ブロード状にVE-cadが局在する細胞辺縁数は減少し、20Gyまでは線量依存的に細胞間透過性が亢進することが明らかとなった。これは、放射線照射により、成熟した細胞間接着が減少したことによる可能性が考えられた。以前に当科では、炎症性サイトカインの一種であるTNF- α でHDLEC細胞を刺激すると、ブロード状にVE-cadが局在する細胞辺縁数が減少し、連続性のある細胞間接着が非連続性に变化することで、細胞間透過性を亢進させる可能性を報告した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVCE細胞）をTNF- α で刺激した過去の報告と同様に、HDLEC細胞をTNF- α で刺激するとActinストレスファイバーが形成されることを報告した。一般に、ストレスファイバーはVE-cadの裏打ちタンパク質により細胞膜に連結していることが知られている。本研究では、放射線を照射したHDLEC細胞においてストレスファイバーは形成されないことから、放射線照射後にはVE-cadがブロード状に局在する範囲が縮小し、明らかにActinと連結している細胞間接着が減少している可能性が示唆された。

過去に、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（DMEC細胞）に放射線を照射すると、連続性のある細胞間接着を非連続性に变化させ、ストレスファイバーを形成するという報告がある。これは、TNF- α 刺激時のHUVCE細胞やHDLEC細胞の場合と類似している。一方で、過去の報告では、放射線を照射したHUVCE細胞では、VE-cadの局在に変化はみられず、ストレスファイバーは形成されない。放射線感受性は組織によって異なるため、内皮細胞の放射線感受性も組織依存的である可能性が考えられる。リンパ管は、網目状の毛細リンパ管から始まり、集合リンパ管、主幹リンパ管と太くなり、胸管を経て静脈に注ぐ。本研究では、HDLEC細胞が皮膚毛細リンパ管に由来することから、過去のHUVCE細胞における放射線照射による表現型とHDLECのそれとが異なる理由として、組織依存的な放射線感受性の違いが関係している可能性が示唆された。

HDLEC細胞は、30Gyの放射線を照射するとアポトーシスが誘導されるが、15Gyではアポトーシスは起こらないという報告がある。本研究では、放射線照射量は5Gyまたは20Gyであり、この線量範囲ではHDLEC細胞の生存率に影響はなかった。線量および時間依存性の放射線の影響に関しては、さらなる解析が必要であると考えられた。

近年、細胞老化と言われる状態が注目されており、培養下で細胞分裂を何回か繰り返した後に細胞増殖が停止することと定義されている。HDLEC細胞では、4Gy照射から4日後に細胞老化が起こることが報告されており、この状態の細胞は線量依存性に増加する。過去に、細胞老化の状態にあるHUVCE細胞では、VE-cadの発現量に変化はないものの、その局在が変化することで細胞間接着が未熟で不安定になり、細胞間透過性が亢進するという報告がある。RhoAは、内皮細胞において細胞老化およびバリア機能の維持を制御しているという過去の報告がある。また、RhoAはストレスファイバーの形成に重要な役割を果たしていることが一般に知られている。本研究においてHDLEC細胞に放射線を照射してもストレスファイバーが形成されなかった分子機構については、今後さらなる解析が必要であると考えられた。

最後に、リンパ管の発生やリンパ系疾患の発症に、Cx（特にCx37、Cx43、Cx47）が関与しているとの報告がある。また、ラットの肺血管においてCx43がVE-cadの発現量の制御に関与することや、上皮細胞においてCx43が微小管を介して接着結合を細胞膜にリクルートすることが報告されている。本研究では、VE-cadから構成される接着結合が形成されている部位にCx43が局在しており、これは過去の報告と一致すると考えられた。

【結論】

本研究は、5 または 20Gy の放射線を HDLEC 細胞に照射すると、細胞生存には影響を与えないが、VE-cad を介した細胞間接着および Actin 構造に変化を与え、細胞間透過性を亢進させることを明らかにした。しかし、この現象を制御する分子機構は解明できておらず、今後さらに研究を進め、放射線治療後のリンパ浮腫の予防法および治療法の開発に貢献したいと考える。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2826 号	氏 名	岸本 恵実
論文題目 Title of Dissertation	Ionizing radiation enhances paracellular permeability through alteration of intercellular junctions in cultured human lymphatic endothelial cells 電離放射線は培養ヒトリンパ管内皮細胞の細胞間接着に変化を与え細胞間透過性を亢進させる		
審査委員 Examiner	主 査 寺 能 浩 人 Chief Examiner 副 査 丹 生 一 洋 Vice-examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

【緒言】

放射線治療後の重大な合併症のひとつにリンパ浮腫がある。リンパ管が障害を受けるとリンパ液が漏出して組織間隙に貯留し、炎症や線維化を惹起して機能不全を引き起こす。リンパ浮腫の予防および治療は、患者の QOL を向上させる上で重要であると考えられているが、その発生メカニズムは未だ解明されていない。したがって、リンパ浮腫に関わる詳細な分子機構を明らかにすることは重要である。近年、電離放射線が血管内皮細胞の細胞間接着へ影響を与えるという報告が散見される。特に、細胞間接着装置の接着結合を構成する主要分子である VE-cadherin（以下 VE-cad）や、デスモゾームを構成する主要分子である Connexin（以下 Cx）が注目されている。そこで電離放射線はリンパ管内皮細胞の細胞間接着に変化を与え、その結果細胞間透過性が亢進するのではないかと考え、研究を行った。

【材料と方法】

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞（HDLEC 細胞）は、5%ウシ胎児血清、1%内皮細胞増殖因子を含有した推奨培地を用い、フィブロネクチンをコートした培養皿上で培養した。放射線は、実験用 X 線照射装置を用いて 5 または 20Gy を細胞に照射した。VE-cad・Cx43・Actin・DAPI について蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞間透過性は、単層の HDLEC 細胞を透過する蛍光標識したデキストランを蛍光プレートリーダーで測定することにより解析した。細胞生存率は、MTT 試験に準じ、生細胞により生成されるホルマザン色素を蛍光プレートリーダーで測定することにより解析した。

【結果】

細胞密度が高い条件で培養した HDLEC 細胞を VE-cad と Actin で蛍光免疫二重染色した。VE-cad は、放射線非照射の細胞では細胞辺縁にブロード状に局在していたが、5Gy、20Gy と放射線照射量が増えるに従って VE-cad のブロード状の局在は減少した。Actin は、放射線非照射の細胞では、細胞の辺縁に VE-cad と共局在していた。一方で、放射線照射量が増えるに従って、細胞の辺縁において VE-cad と共局在する Actin は減少した。同様に、細胞密度が低い条件で培養した HDLEC 細胞を VE-cad と Actin で蛍光免疫二重染色した。VE-cad は、細胞密度が高い条件下と同様に細胞の辺縁に局在していたが、ブロード状ではなくジグザグ状に局在していた。放射線照射量が増えるに従ってジグザグ状に局在する VE-cad は減少した。Actin の変化は、細胞密度が高い条件下と同様であった。

次に、細胞密度が高い条件で培養した HDLEC 細胞を観察し、細胞間接着の総数および VE-cad がブロード状に局在する細胞辺縁数を計測した。放射線非照射と比較して放射線照射量が増えるに従い、VE-cad がブロード状に局在する細胞辺縁数の割合は有意に減少した。これは蛍光免疫染色の結果と一致した。

さらに、単層の HDLEC 細胞を透過する蛍光標識したデキストランについて解析した。デキストランは、放射線非照射の細胞では約 15%しか透過しなかったのに対し、5 Gy 照射の細胞では約 30%、20Gy 照射の細胞では約 35%透過し、放射線照射量が増えるに従って細胞間を透過するデキストランは有意に増加した。

最後に、細胞密度が高い条件で培養した HDLEC 細胞を VE-cad・Cx43・DAPI で蛍光免疫三重染色した。放射線非照射および 5 Gy 照射の細胞では、Cx43 はブロード状の VE-cadherin と共局在していた。一方で、20Gy 照射の細胞では、VE-cad と同様に細胞の辺縁において局在する Cx43 は減少した。

【考察】

HDLEC細胞に放射線を照射すると、ブロード状にVE-cadが局在する細胞辺縁数は減少し、20Gyまでは線量依存的に細胞間透過性が亢進することが明らかとなった。これは、放射線照射により、成熟した細胞間接着が減少したことによる可能性が考えられた。一般に、ストレスファイバーはVE-cadの裏打ちタンパク質により細胞膜に連結していることが知られている。本研究では、放射線を照射したHDLEC細胞においてストレスファイバーは形成されないことから、放射線照射後にはVE-cadがブロード状に局在する範囲が縮小し、明らかにActinと連結している細胞間接着が減少している可能性が示唆された。

過去に、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（DMEC 細胞）に放射線を照射すると、連続性のある細胞間接着を非連続性に変化させ、ストレスファイバーを形成するという報告がある。これは、TNF- α 刺激時の HUVEC 細胞や HDLEC 細胞の場合と類似している。一方で、過去の報告では、放射線を照射した HUVEC 細胞では、VE-cad の局在に変化はみられず、ストレスファイバーは形成されない。放射線感受性は組織によって異なるため、内皮細胞の放射線感受性も組織依存的である可能性が考えられる。本研究では、HDLEC 細胞が皮膚毛細リンパ管に由来することから、過去の HUVEC 細胞における放射線照射による表現型と HDLEC のそれとが異なる理由として、組織依存的な放射線感受性の違いが関係している可能性が示唆された。

HDLEC 細胞は、30Gy の放射線を照射するとアポトーシスが誘導されるが、15Gy ではアポトーシスは起こらないという報告がある。本研究では、放射線照射量は 5Gy または 20Gy であり、この線量範囲では HDLEC 細胞の生存率に影響はなかった。線量および時間依存性の放射線の影響に関しては、さらなる解析が必要であると考えられた。

本研究は、放射線治療後の合併症のひとつであるリンパ浮腫に関わる分子機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった電離放射線がリンパ管内皮細胞間透過性を亢進させること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。