

## 培養リンパ管内皮細胞の最近の進歩

河合 佳子 大橋 俊夫

**要 旨：**リンパ循環系は血管系と並列して存在する脈管系であり，毛細リンパ管では主にリンパ管産生を，集合リンパ管では主にリンパ液の輸送を担当しており，部位によって生体内の機能が異なるため，リンパ管の部位による内皮細胞機能の差異が想定される。そこでまずはじめに集合リンパ管由来の内皮細胞の培養法を確立した。本稿では，市販の毛細リンパ管内皮細胞とわれわれの確立した集合リンパ管内皮細胞を用いて，部位別の特徴と，センチネルリンパ節転移機構におけるリンパ管内皮細胞の役割について述べる。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 125-130)

**Key words:** lymphatic endothelial cell, initial lymph vessel, collecting lymph vessel, sentinel lymph node, culture

### はじめに

リンパ循環系は血管系と並列して存在する脈管系であり，毛細リンパ管では主にリンパ管産生を，集合リンパ管では主にリンパ液の輸送を担当しており，酸素分圧が静脈系よりも低い30～40mmHg以下という環境下で生理的に機能しているという点が特徴的である<sup>1)</sup>。また，癌細胞の転移路として最近センチネルリンパ節 (sentinel lymph node: SLN)理論が提唱され<sup>2)</sup>乳癌<sup>3)</sup>や悪性黒色腫<sup>4)</sup>ではその臨床的意義が確立し，リンパ管系は腫瘍学との関連においても最近特に注目されている。

本稿では，リンパ管の部位による生理機能の違いとリンパ管内皮細胞の生物学的特徴，およびSLN転移機構におけるリンパ管内皮細胞の役割について概説する。

### 培養リンパ管内皮細胞

イヌ<sup>5,6)</sup>，ウシ，ヒツジなど<sup>7)</sup>の胸管からのリンパ管内皮細胞は以前より培養方法が確立されていたが，最近われわれは生体内に近い低酸素環境下(5%O<sub>2</sub>)で培養することにより，ラットやマウスなどの小動物からのリンパ管内皮細胞の培養に成功した<sup>8)</sup>。また，胸管よりもさらに末梢に近いラット腸骨リンパ節近傍の集合リ

ンパ管からの内皮細胞の培養にも成功した<sup>9)</sup>。

ヒトのリンパ管内皮細胞に関しては2004年に毛細リンパ管由来のリンパ管内皮細胞 (human dermal lymphatic endothelial cell: HDLEC)が市販されるようになり *in vitro* の実験が可能となった。さらに，扁桃腺内の毛細リンパ管内皮細胞の培養も出来るようになった<sup>10)</sup>が，集合リンパ管レベルでの報告は認められなかった。

そこで，われわれは乳癌センチネルリンパ節生検時にリンパ節近傍の輸入リンパ管を採取し，低酸素環境下(5%O<sub>2</sub>)でのリンパ管内皮細胞 (human lymphatic endothelial cell from afferent lymph vessels nearest SLN: HALEC)培養に成功した<sup>11)</sup>ので，まずその培養方法につき紹介する。

### センチネルリンパ節近傍リンパ管内皮細胞の培養方法

信州大学医学部附属病院では，乳癌患者に対し術中のセンチネルリンパ節生検を実施している。センチネルリンパ節を同定するための色素を乳癌周囲に注射し，色素により青く染まったリンパ節輸入リンパ管 (Fig. 1A)を含んだ脂肪組織を同意の得られた患者からのみ採取した。顕微鏡下に周囲の脂肪組織を剥離し，リンパ管内に細いポリエチレンチューブを挿入した

(Fig. 1B)。内腔にトリプシンを灌流し、37℃で10分留置した後にリンパ管内腔を灌流してリンパ管内皮細胞を採取し、遠心にて細胞成分を回収してI型コラーゲンを塗布した細胞培養用プレートに播種し、5%酸素、5%二酸化炭素、90%窒素環境下で培養を継続した。培養液はEGM-2(三光純薬)にウシ胎児(fetal bovine serum: FBS)を10%添加し用いた。

### ヒトリンパ管内皮細胞の特徴

われわれが培養に成功したヒト集合リンパ管由来の内皮細胞(HALEC)はFig. 2Aに示すように、敷石状配列を示し、Fig. 2Bに示す市販の毛細リンパ管内皮細胞(HDLEC)と同様にリンパ管内皮細胞マーカーの発現を認めた<sup>12)</sup>ことから、リンパ管内皮細胞と断定した。また、Fig. 2Cに示すようにRT-PCR法でもHALECにおける各種リンパ管内皮細胞マーカーの発現を確認したが、LYVE-1以外のマーカーはHDLECと同程度の発現を認めた。LYVE-1の発現は継代が進むと減弱する傾向が認められたが、その意義や機構の解明はこれからの課題と思われる。

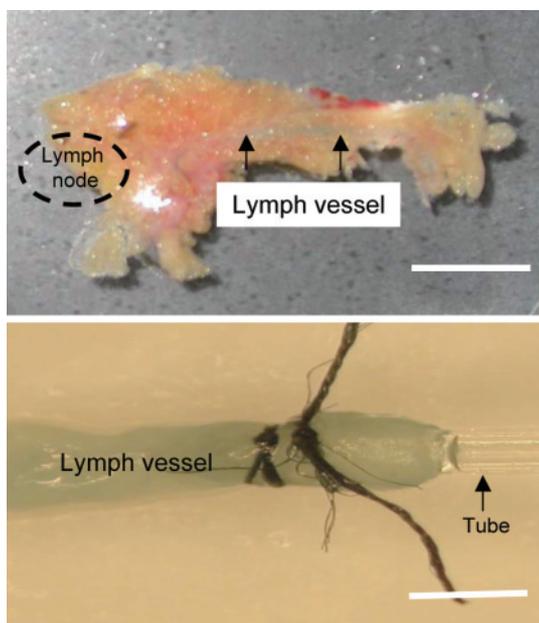
また、リンパ管内皮細胞は低酸素環境下で機能しているため生体内で一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase: NOS)活性が高いことは確認されていた<sup>5)</sup>が、培養系に移行した本細胞でもendothelial constitutive NOS(ecNOS)がきわめて高度に発現していることが確認された(Fig. 3)。

さらに、未刺激の状態での遺伝子発現をマイクロアレイ(Affymetrix社, GeneChip U133 plus2.0)にて解析し、HALECに発現が高くHDLECでは低い遺伝子をFig. 4に示した。この遺伝子群の中には酸素ラジカルに対する酵素や接着分子、増殖因子も含まれており、採取部位によりリンパ管内皮細胞の生物学的特性に差異があることが遺伝子レベルでも確認できた。

### 酸素濃度による増殖能の変化

HALECとHDLECにおいて増殖能をMTS assay法で確認したところ(Table 1)、HDLECの増殖能がHALECに比較して高いことが認められ、さらに酸素濃度が高い環境下ではHALECの増殖抑制がHDLECより一段と著しいことも確認された。

このことは、生体内では毛細リンパ管周囲の酸素濃度環境が、腫瘍組織のようにほぼ0から動脈血の曝露



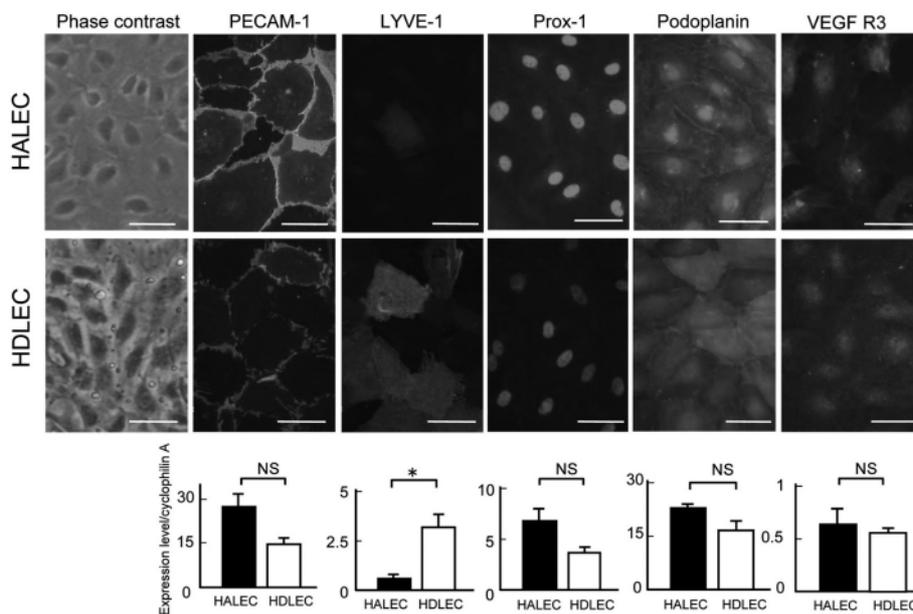
**Figure 1** (A) shows a representative microphotograph of isolated human tissue including a colored afferent lymphatic vessel of sentinel lymph node. The marker is 10 mm. (B) shows a representative microphotograph of the human afferent lymphatic vessel cannulated centripetally with a sterile polyethylene tube. The marker is 1 mm. Based on reference 11.

A  
B

に近い100mmHgの範囲で変動するのに対し、集合リンパ管レベルでは常に40mmHg以下で安定した酸素環境にさらされているという生理、病態生理機能を反映して、HALECで酸素曝露の障害がより強く発現したのではないかと考えられる。

### 癌細胞とリンパ管内皮細胞の相互作用

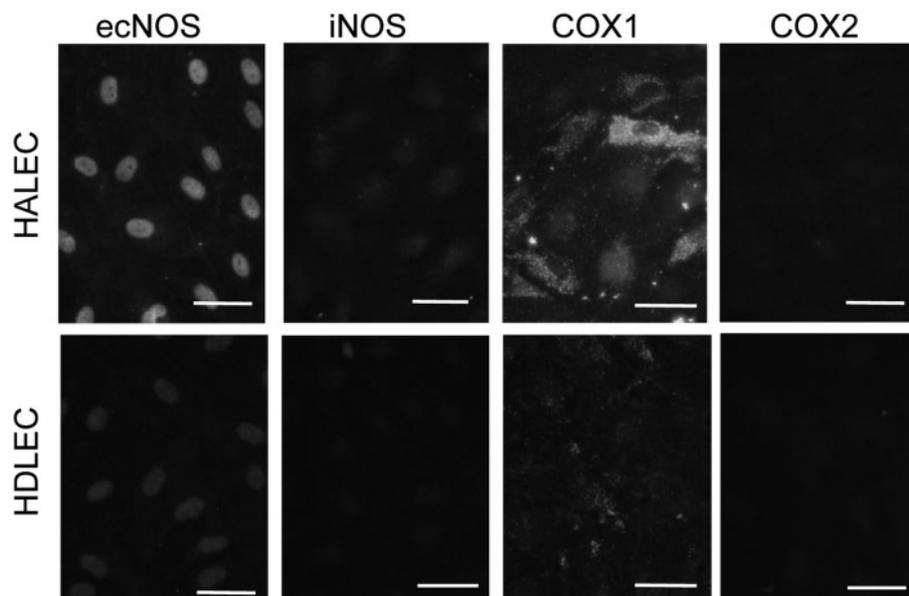
現在、センチネルリンパ節理論は臨床的にその意義が確立されてきているが、リンパ節への微小癌がどのような仕組みで転移していくかの研究はほとんど見当たらない。そこで、癌の原発巣からのリンパ流を受けたセンチネルリンパ節近傍のリンパ管内皮細胞がどのような生物学的特性の変化を起し、微小癌転移を成立させる組織環境を作り上げていくのかを確認するための研究の一貫として、乳癌細胞株の中でも転移能の低いMCF-7細胞と転移能の高いMDA-MB-231細胞の培養上清でHALECを刺激し、接着因子発現や癌細胞との接着様式の変化について検討した。



**Figure 2** Representative microphotographs of phase contrast and immunohistochemical images of PECAM-1, LYVE-1, Prox-1, podoplanin, and VEGF R3 in cultured HALECs (A) and HDLECs (B). Each marker is 50  $\mu$ m. The lower panel shows the expression of each gene using the RT-PCR method. The ordinate shows the ratio of expression level of each marker to that of cyclophilin A.

\*Statistically significant at  $p < 0.05$ , NS: not significant. Based on reference 12.

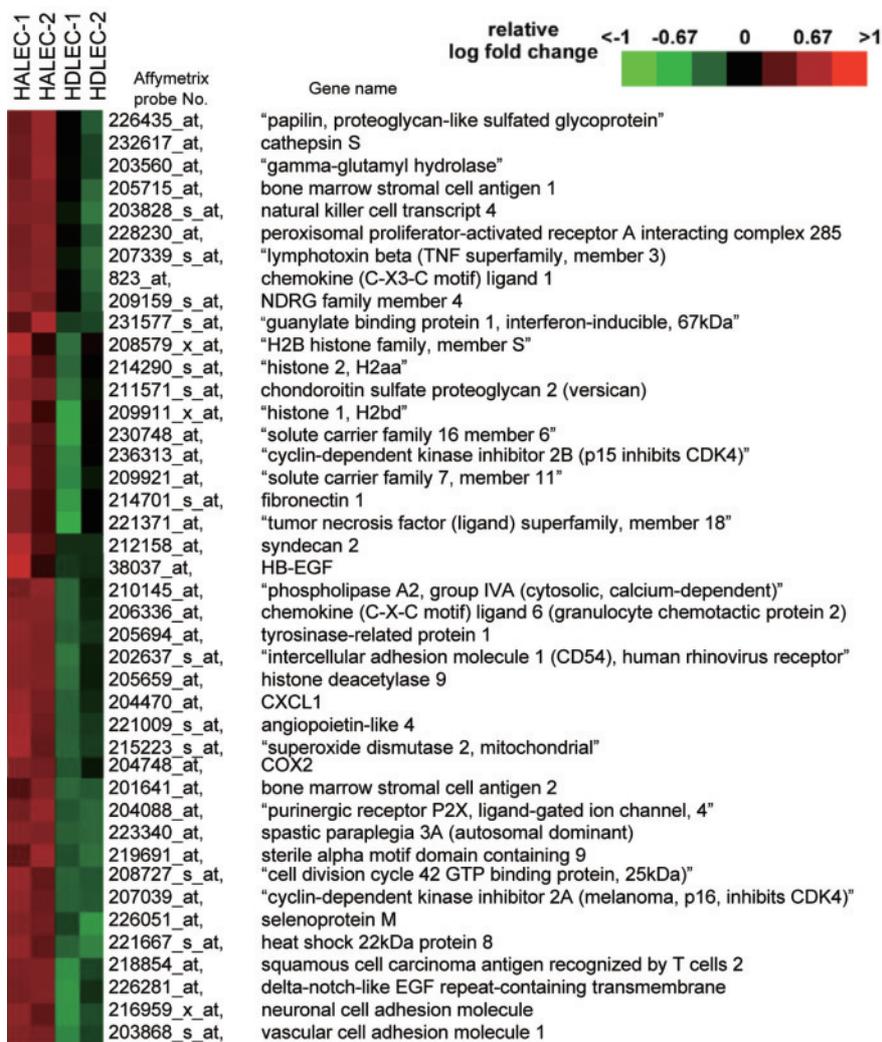
A  
B  
C



**Figure 3** Representative microphotographs of immunohistochemical images of ecNOS, iNOS, COX1, and COX2 on HALECs (A) and HDLECs (B). Each marker is 50  $\mu$ m.

Based on reference 12.

A  
B



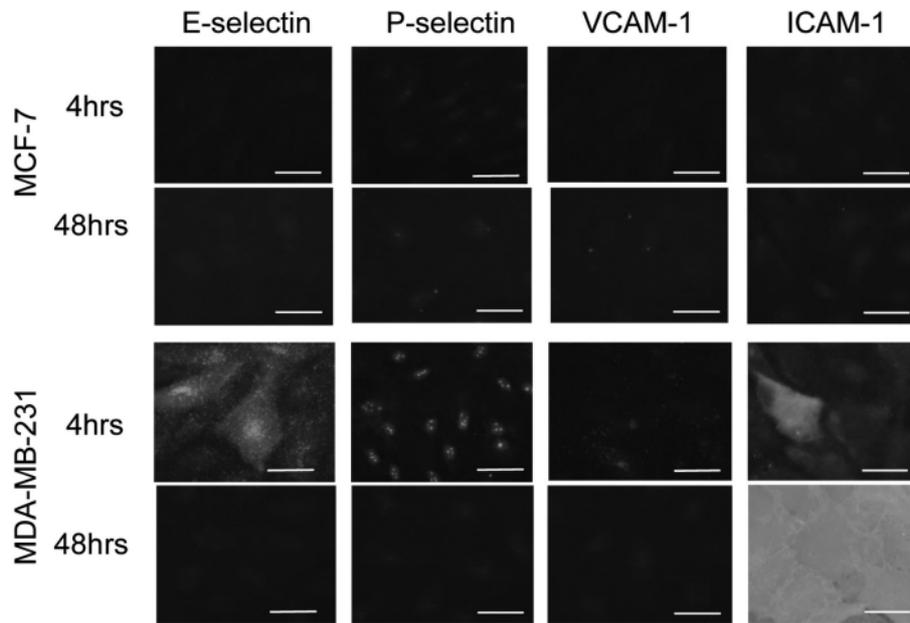
**Figure 4** Representative tracings of constitutively expressed, cell type specific genes of two sets of HALECs (1,2) and HDLECs (1,2), by using oligonucleotide microarray method. The pseudo-color images show relative log fold change; green and red are lower and higher expression, respectively. Based on reference 12.

その結果, **Fig. 5** に示すように, 低転移株のMCF-7細胞の培養上清刺激では接着因子であるE-selectin, P-selectin, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の発現は変化しなかったが, 高転移株のMDA-MB-231細胞の培養上清刺激では4時間でE-selectinの, 48時間でICAM-1の発現が著明に増加した。また, MDA-MB-231上清でHALECを48時間刺激した後にMDA-MB-231を30分HALECに接着させる実験を行ってみると, 有意に癌細胞とセンチ

**Table 1** Effects of oxygen concentration (5% and 21%) on the proliferation activity of HALEC and HDLEC

|       | O <sub>2</sub> concentration | MTS score     |       |
|-------|------------------------------|---------------|-------|
| HALEC | 5%                           | 0.277 ± 0.029 | * ] * |
|       | 21%                          | 0.195 ± 0.024 |       |
| HDLEC | 5%                           | 0.404 ± 0.043 | ] NS  |
|       | 21%                          | 0.346 ± 0.047 |       |

\* p<0.05, significantly different between HALEC and HDLEC, NS: not significant



**Figure 5** Representative microphotographs of the supernatant of culture medium of breast cancer [MCF-7(A) and MDA-MB-231(B)]-mediated time (4hrs and 48hrs)-dependent immunohistochemical expressions of E-selectin, P-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 on the HALECs. Each marker is 50 $\mu$ m.

A  
B

ネルリンパ節近傍リンパ管内皮細胞との接着が増加し、抗ICAM-1抗体の前処置によってその接着が有意に抑制された。こうした事実より、原発巣の癌細胞からのリンパ流を受けたセンチネルリンパ節近傍のリンパ管内皮細胞は接着因子、特にICAM-1の発現が有意に増強し、転移してきた微小癌細胞との接着を増強させる可能性が示唆された。

### おわりに

リンパ管は部位により形態、機能ともに異なり、毛細リンパ管はリンパ液の産生に関与し、壁に平滑筋を有する集合・主幹リンパ管の一部は心臓様の自発性収縮を有しリンパ液の能動輸送に関与している。また、リンパ管系の重要な特徴として30~40mmHgの低い酸素環境の下で生理機能を発揮している脈管系であることが挙げられる。それぞれのリンパ管内皮細胞は培養系に移行してもecNOSの発現が高いことや酸素濃度変化に対する増殖能の変化が認められることなどその生物学的特性の喪失しないことが確認できた。

また、今回のセンチネルリンパ節近傍リンパ管由来内皮細胞は癌の原発巣からのリンパ流を受けた段階

で、その接着分子、特にICAM-1の発現の変化が示唆された。これは、微小癌が転移を成立させる際にまず転移先の微小環境を変化させるという報告<sup>13,14)</sup>にも合致している現象と考えられる。この現象を利用し、センチネルリンパ節を特異的に描出する造影剤や、リンパ管性物質に抗癌剤を封入し、センチネルリンパ節に集積させる臨床応用につなげていきたいと考えている。

### 文 献

- 1) Ohhashi T, Mizuno R, Ikomi F et al: Current topics of physiology and pharmacology in the lymphatic system. *Pharmacol Ther*, 2005, **105**: 165-188.
- 2) Morton DL, Wen DR, Wong JH et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 1992, **127**: 392-399.
- 3) Imoto S, Hasebe T: Initial experience with sentinel node biopsy in breast cancer at the National Cancer Center Hospital East, *Jpn J Clin Oncol*, 1999, **29**: 11-15.
- 4) Karakousis CP, Najibi S, Trunk J: Sentinel node biopsy in malignant melanoma. *J Surg Oncol*, 1997, **66**: 282-284.
- 5) Nojiri H, Ohhashi T: Immunolocalization of nitric oxide synthase and VEGF receptors in cultured lymphatic endot-

- helial cells. *Microcirculation*, 1999, **6**: 75–78.
- 6) Tan Y: Basic fibroblast growth factor-mediated lymphangiogenesis of lymphatic endothelial cells isolated from dog thoracic ducts: Effects of heparin. *Jpn J Physiol*, 1998, **48**: 133–141.
- 7) Leak LV, Jones M: Lymphatic endothelium isolation, characterization and long-term culture. *Anat Rec*, 1993, **236**: 641–652.
- 8) Mizuno R, Yokoyama Y, Ono N et al: Establishment of rat lymphatic endothelial cell line. *Microcirculation*, 2003, **10**: 127–131.
- 9) 河合佳子, 水野理介, 横山由美子 他: ラットリンパ管内皮細胞培養株の採取部位別生物学的特徴とリンパ管新生に関する検討. *リンパ学*, 2005, **28**: 74–76.
- 10) Garrafa E, Alessandri G, Benetti A et al: Isolation and characterization of lymphatic microvascular endothelial cells from human tonsils. *J Cell Physiol*, 2006, **207**: 107–113.
- 11) Kawai Y, Minami T, Fujimori M et al: Characterization and microarray analysis of genes in human lymphatic endothelial cells from patients with breast cancer. *Lymphat Res Biol*, 2007, **5**: 115–126.
- 12) Kawai Y, Hosaka K, Kaidoh M et al: Heterogeneity in immunohistochemical, genomic, and biological properties of human lymphatic endothelial cells between initial and collecting lymph vessels. *Lymphat Res Biol*, 2008, **6**: 15–27.
- 13) Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005, **438**: 820–827.
- 14) Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H et al: Tumor-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 1369–1375.

## Current Topics of Immunohistochemical and Biological Properties of Human Lymphatic Endothelial Cells

Yoshiko Kawai and Toshio Ohhashi

Department of Physiology, Shinshu University School of Medicine, Nagano, Japan

**Key words:** lymphatic endothelial cell, initial lymph vessel, collecting lymph vessel, sentinel lymph node, culture

We examined the immunohistochemical properties of selective lymph vessel markers such as LYVE-1, podoplanin, Prox-1, and VEGF R3, as well as NO synthase (NOS) and cyclo-oxygenase (COX) in two kinds of human lymphatic endothelial cells isolated from collecting and initial lymph vessels. The constitutively expressed genes in the two kinds of lymphatic endothelial cells were also evaluated by using oligonucleotide microarray analysis and RT-PCR. We also investigated the effects of oxygen concentration in culture conditions on the proliferative activities of the two kinds of human lymphatic endothelial cells. Immunoreactivity to LYVE-1 and the RT-PCR expression level of LYVE-1 mRNA in endothelial cells of initial lymph vessels were stronger than those of collecting lymph vessels. Immunoreactivity to eNOS, iNOS, COX1, and COX2 was also found to be significantly higher than in collecting lymph vessels. In contrast, the increase of O<sub>2</sub> concentration ranging from 5% to 21% caused a significant reduction of the proliferative activity of endothelial cells in collecting lymph vessels. In conclusion, these findings suggest that there exists a marked heterogeneity in the immunohistochemical, genomic, and proliferative activity of human lymphatic endothelial cells between initial and collecting lymph vessels. (J Jpn Coll Angiol, 2008, **48**: 125–130)