

論文内容要旨

Isolation of tumor endothelial cells from murine cancer

(マウス腫瘍における腫瘍血管内皮細胞の分離法)

Journal of Immunological Methods, 464:105-113, 2019.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：大毛 宏喜教授

(広島大学病院 感染症学)

副指導教員：田中 友加准教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

田口 和浩

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

腫瘍微小環境の発達の中では、様々な腫瘍構成細胞が腫瘍の成長に関与している。腫瘍血管内皮細胞は、腫瘍血管の裏打ち構造を構成する細胞であり、腫瘍の血液供給に寄与するだけでなく、腫瘍微小環境を構成する細胞の一つとして様々な特徴を有している。これまで、腫瘍血管内皮細胞は、血管新生の中で異常構造を示し、他の正常内皮細胞と比較して遺伝子発現に差異があることが報告されている。また、腫瘍血管内皮細胞は、腫瘍微小環境が構築される過程で、薬剤耐性に関与するなど、正常細胞とは異なった特徴を獲得することも報告されている。また最近では、腫瘍血管内皮細胞が免疫細胞のトラフィックの制御や腫瘍に対する免疫反応のコントロールに関して、重要な免疫学的役割を有していることも注目されつつある。したがって、腫瘍血管内皮細胞の免疫学的役割を理解することは、免疫療法を含む新規抗がん治療の開発の一助になる可能性がある。腫瘍血管内皮細胞のダイナミックな機能の解明には、腫瘍から新鮮な状態で分離した腫瘍血管内皮細胞を使用する必要がある。腫瘍以外の正常臓器から内皮細胞を分離する方法はいくつか報告されているが、腫瘍血管内皮細胞は腫瘍構成細胞では極めて小さなポピュレーションであり、それが腫瘍血管内皮細胞の高純度での分離を困難としている。そこで、われわれは、マウスモデルを用いて、腫瘍内に稀少な割合で存在する腫瘍血管内皮細胞を高純度かつ新鮮な状態で分離する方法を新規に確立した。

まず、マウスメラノーマ腫瘍株である B16F10 をマウスの背部皮下に移植し担癌マウスを作製した。成長した腫瘍を摘出し剪刀を用いて細切した。次に、コラゲナーゼ（タイプ II）を用いて単離細胞化し、腫瘍血管内皮細胞の分離操作に移った。まず、比重 1.077g/ml の分離溶液を用いて密度勾配遠心法を行い、バフィーコート回収することで、可能な限り腫瘍血管内皮細胞を含む細胞群を濃縮分離した。フローサイトメトリー解析では、内皮マーカである

CD31/CD146 陽性細胞は 0.2% 程度の低割合で存在していた。続いて、腫瘍血管内皮細胞の存在割合を上げるために、CD31 陽性細胞の磁気ソーティングを行った。フローサイトメトリー解析したところ、CD31/CD146 陽性細胞の存在率は約 1.9% であり、磁気ソーティングにより約 10 倍に濃縮された。続いて、腫瘍血管内皮細胞の純度をさらに高めるため、CD31/CD146 陽性細胞をゲーティングして FACS ソーティングを行った。FACS ソーティングにより CD31/CD146 陽性細胞は 95% 以上の高純度であることを確認した。得られた細胞は、造血細胞マーカである CD45 が陰性であり内皮細胞であることに矛盾しない結果であった。腫瘍 3 個中、 500×10^6 程度の腫瘍構成細胞が存在するが、各手順により細胞数の喪失があり、 1.0×10^5 程度の細胞数が最終的に得られることを示した。得られた細胞は内皮細胞培養用メEDIUMでの培養で増殖を示し、7 日目の観察では、内皮細胞の特徴である多角形あるいは敷石状の形態を呈しており、形態学的にも内皮細胞の特徴を示していた。さらに、蛍光免疫染色観察を行ったところ、培養細胞は CD31 陽性であった。腫瘍血管内皮特異マーカである TEM1、TEM5、TEM8 で染色したところ、正常内皮細胞では陰性であったのに対し、培養した分離細胞でいずれも陽性であった。以上より、分離した細胞が腫瘍血管内皮細胞であることの妥当性が示された。われわれは、本研究で示した分離法により得られた腫瘍血管内皮細胞を用いて、腫瘍血管内皮細胞の免疫学的特徴を検証するために、CFSE 染色した CD8 陽性 T 細胞をレスポンドーとした CD8 陽性 T 細胞増殖

試験による *in vitro* の機能解析を行った。CD3/CD28 刺激下で CD8 陽性 T 細胞は増殖を示したが、腫瘍血管内皮細胞を添加により CD8 陽性 T 細胞の増殖が抑制された。その一方、正常内皮細胞の添加では CD8 陽性 T 細胞の増殖抑制はみられなかった。したがって、腫瘍血管内皮細胞は CD8 陽性 T 細胞増殖抑制能を持つことが示唆された。

以上のように、腫瘍血管内皮細胞は、正常内皮細胞と異なる性質を有している可能性が示唆された。したがって、腫瘍血管内皮細胞の特徴を正確に把握するには、一般的に行われている様な、正常内皮細胞株での代替使用では不十分である。また、これらの腫瘍血管内皮細胞の特徴は、腫瘍成長の過程の中で獲得している可能性があり、新鮮で高純度な腫瘍血管内皮細胞を用いる必要があると考えられる。本研究で示した腫瘍血管内皮細胞の分離法は、さらなる腫瘍血管内皮細胞の特徴の解明、特に免疫学的機能解析に有用である。腫瘍血管内皮細胞の免疫学的特徴を解明することは、腫瘍血管内皮細胞を標的とする、より効果的な新規抗がん治療の開発に寄与する可能性がある。