

犬の皮膚肥満細胞腫における
血管内皮増殖因子およびその受容体の発現
(Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors
in canine mast cell tumors)

黄 美 貴

目次

第1章 緒言	1
第2章 イヌの皮膚肥満細胞腫における血管内皮増殖因子 (VEGF) -A とその受容体の発現と組織学的悪性度との関連	
2-1 小序	6
2-2 材料と方法	
2-2-1 正常皮膚組織の採材および病理組織切片の作製	8
2-2-2 肥満細胞腫の組織学的分類	8
2-2-3 Western blotting による解析	8
2-2-4 肥満細胞腫の c-Kit 免疫組織化学、c-Kit pattern 分類	9
2-2-5 肥満細胞腫の VEGF-A、Flk-1 および Flt-1 免疫組織化学	10
2-2-6 正常皮膚肥満細胞および肥満細胞腫症例の Ki67、PCNA 免疫組織化学	10
2-2-7 正常皮膚肥満細胞における c-Kit、VEGF-A、Flk-1 および Flt-1 免疫組織化学	11
2-2-8 正常皮膚肥満細胞における VEGF-A/MC Tryptase および c-Kit/Flk-1、MCT における VEGF-A/Flk-1 の蛍光二重免疫組織化学	11
2-2-9 統計解析	11
2-3 結果	
2-3-1 Western blotting 解析	13
2-3-2 イヌの正常皮膚肥満細胞における VEGF-A および Flk-1 の発現	13
2-3-3 肥満細胞腫の病理組織学的分類、c-Kit pattern 分類および増殖能の評価	13

2-3-4	MCTにおける VEGF-A、Flt-1 および Flk-1 免疫組織化学	14
2-3-5	VEGF-A および Flk-1 の蛍光二重免疫組織化学	15
2-4	考察	26
第3章	イヌの皮膚肥満細胞腫における血管内増殖因子(VEGF)-A および VEGF 受容体-2 発現と腫瘍細胞の分化度	
3-1	小序	30
3-2	材料と方法	
3-2-1	病理組織切片の作製	33
3-2-2	AB-SO 染色	33
3-2-3	Gai1 および MC Tryptase 免疫組織化学	33
3-2-4	統計解析	33
3-3	結果	
3-3-1	AB-SO 染色と病理組織学的分類	35
3-3-2	AB-SO 染色、MC Tryptase および Gai1 発現と VEGF-A および 受容体の発現	35
3-4	考察	45
第4章	発生過程の皮膚肥満細胞における血管内皮増殖因子(VEGF)-A および 受容体の発現	
4-1	小序	47
4-2	材料と方法	
4-2-1	供試動物	48
4-2-2	アルシアンブルー染色	48
4-2-3	アルシアンブルー (AB)-サフラニン O(SO)染色	48

4-2-4	c-Kit、MC Tryptase、Ki67、VEGF-A、Flk-1、および Flt-1 免疫 組織化学	48
4-2-5	統計学的解析	49
4-3	結果	
4-3-1	AB-SO 染色による肥満細胞 (MC) の検出および数の計測	51
4-3-2	皮膚肥満細胞 (MC) における c-Kit、MC Tryptase および Ki67 の発現	51
4-3-3	皮膚肥満細胞 (MC) 発生段階における Flk-1 および Flt-1 の発現	51
4-4	考察	59
第 5 章 マウス骨髄由来肥満細胞における血管内皮増殖因子(VEGF-A)および VEGF 受容体-2 の発現と分化に対する作用		
5-1	小序	64
5-2	材料と方法	
5-2-1	マウス骨髄細胞の回収およびその培養	65
5-2-2	mBMMC の組織切片の作製	65
5-2-3	mBMMC の免疫組織化学および蛍光二重免疫組織化学	65
5-2-4	mBMMC の total RNA 抽出、定性的 RT-PCR および定量的 real time RT-PCR 解析	65
5-2-5	mBMMC に対する VEGF および Flk-1 inhibitor の添加	66
5-3	結果	
5-3-1	mBMMC 発生段階における mRNA 発現および c-Kit、VEGF-A、 Flk-1、および Flt-1 免疫組織化学的検索	69
5-3-2	mBMMC への VEGF および Flk-1 inhibitor 添加による mRNA 発	

現量の変化および蛍光二重免疫組織化学	70
5-4 考察	81
第6章 総括	86
謝辞	91
参考文献	92

略路一覧

c-Kit : 幹細胞因子受容体

FcεRI : IgE 受容体

Flk-1 : 血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR-2)

Flt-1 : 血管内皮増殖因子受容体 1 (VEGFR-1)

GATA-2 : GATA 結合タンパク-2

HSC : 造血幹細胞

IL-3 : インターロイキン 3

mBMMC : マウス骨髄由来肥満細胞

MC : 肥満細胞

MC Tryptase : 肥満細胞 Tryptase

MCT : 肥満細胞腫

MITF : 小眼球症関連転写因子

SCF : 幹細胞因子

VEGF-A : 血管内皮増殖因子-A

※アルファベット順

第1章 緒言

イヌにおいて肥満細胞腫 (mast cell tumor : MCT) は高頻度に発生する皮膚の悪性腫瘍 (7-21%) である (Kiupel et al., 2004)。臨床的には、MCT は、限局的に発生し外科的切除により根治する低悪性度の症例から、多発性で再発を繰り返し、さらには遠隔転移を示し致死的経過を辿る症例など様々な経過を示す (Rogers K.S., 1996)。病理組織学的には、以前より Grade I (低悪性度)、II (中悪性度)、III (高悪性度) に分類されており (Patnaik grading system; Patnaik 分類)、臨床的な悪性度を反映していると考えられている (Patnaik et al., 1994)。Grade I は腫瘍細胞が真皮内に局限しているタイプであり、Grade II では真皮内から真皮外へと腫瘍細胞が浸潤しているが、細胞の異型性は低い。これに対して、Grade III は Grade II と同様に真皮外への浸潤傾向を示すが、細胞の異型性が高度で、核分裂像も高頻度に認められる。しかし、近年では、Sabetti らが提唱している二段階の Grade 分類が、三段階の Grade 分類よりも予後を正確に示している可能性が示唆されている (Sabetti et al., 2015)。そこで Kiupel ら(2010)によって、核分裂像や多核、奇形核を呈する腫瘍細胞が多く認められる MCT を High-grade、それ以外を Low-grade に分類する二段階分類が提唱された (Kiupel grading system; Kiupel 分類)。また、皮下組織に局限して発生する MCT は臨床的に低悪性度である症例が多いことから、Patnaik と Kiupel の分類を適応せず、皮膚 MCT とは区別して subcutaneous MCT (皮下 MCT) として分類される (Newman et al., 2007; Thompson et al., 2011)。

イヌの皮膚 MCT では、細胞質内顆粒の減少、N/C 比の増加、核分裂像の増加など、未分化な肥満細胞の形質を反映していると考えられる特徴が、悪性度が高くなるに従って高頻度に認められることから、高悪性度の MCT においては、腫瘍細胞の分化を抑制し、未分化な状態を維持する制御機構が存在することが予測され、さらにこれらの制御機構が、腫瘍細胞の増殖や浸潤などの悪性形質の発現にも関与している可能性が示唆される。しかしながら、これらの制御機構に関しては不明な点が多い。

正常な肥満細胞は、骨髄造血幹細胞 (HSCs) 由来の細胞であり、HSCs は GATA-1/2、PU.1 によって骨髄中で肥満細胞前駆細胞に分化した後 (Harigae et al., 1998; Walsh et al., 2002)、血液によって全身を循環し、正着した末梢組織内で周囲の微少環境に応じて成熟肥満細胞へと分化すると考えられている (Tshori and Nechushtan., 2012)。しかしながら、近年、Fate mapping model による解析では、皮膚の肥満細胞は、yolk sac 由来の細胞、および aorta-gonad-mesonephros (AGM) 由来の HSCs が胎生期に皮膚に移動し、皮膚に局在し 長い寿命を持つ肥満細胞前駆細胞から、種々の因子によって機能的に成熟した肥満細胞へと分化することが明らかとなっている (Dahlin and Hallgren, 2015)。

肥満細胞の分化・成熟には、幹細胞因子 (stem cell factor: SCF) が最も重要な因子の 1 つと考えられており、受容体である c-Kit を介して SCF が作用することによって肥満細胞の分化・成熟が促進される (Reguera et al., 2000; Lewis et al., 2013)。さらに、IL-3 や IL-9 もまた、肥満細胞の分化や増殖を促進することが知られている (Bischoff et al., 2007)。イヌの皮膚 MCT においても、腫瘍細胞における SCF の発現が腫瘍の悪性動態に関連していることが報告されている (Amagai et al., 2014)。また、c-Kit 遺伝子の突然変異が高頻度で生じていることを明らかとなっており、リガンド非依存性に定常的な c-Kit のシグナリングが腫瘍細胞の発生や進展に深く関与しているものと考えられている (London et al., 1999)。しかしながら、病理組織学的悪性度による分類との相関性は低く、また、c-Kit の発現は、ほとんどのイヌ皮膚 MCT の腫瘍細胞に認められることから、MCT の分化制御における SCF/c-Kit シグナリングの関与はそれほど重要ではないものと考えられる。また、ヒトの肥満細胞腫や systemic mastocytosis においては、IL-3 受容体 α サブユニット (CD123) の発現が認められるが、腫瘍性肥満細胞の分化との関連性は低い (Pardnani et al., 2015; 2016)。このため、MCT 細胞の分化制御に、他の因子が深く関与している可能性が高い。

血管内皮増殖因子 (VEGF) -A は強力な血管新生因子で、主に内皮細胞が発現しており、VEGF-A の受容体 (VEGFRs) に結合することによって、血管内皮細胞の遊走

や増殖、血管新生を促進する (Ferrara et al., 2003; Folkman, 2006)。ほ乳類においては、VEGF-A と親和性がある 2 種類の VEGFRs (Flt-1 (VEGFR-1) , Flk-1 (VEGFR-2)) が同定されている。血管内皮細胞においては、VEGF-A/Flk-1 シグナリングが主に血管内皮細胞の増殖を亢進することによって血管新生を促進する (Ferrara et al., 2003)。一方、Flt-1 には、細胞外ドメインのみから構成される分泌型 (可溶型) と、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインから構成される膜結合型の 2 つの選択的スプライシングアイソフォームが存在し、共に、VEGF-A との親和性が Flk-1 の約 10 倍高いが、膜結合型のリン酸化シグナルは Flk-1 よりも非常に低い (Ferrara et al., 2003; Shibuya, 2001)。また、分泌型 Flt-1 は VEGF-A と結合することで、膜結合型 Flt-1 や Flk-1 との結合を阻害する decoy receptor として機能していると考えられている (Purpura et al., 2008)。さらに、分泌型および膜結合型 Flt-1 は Flk-1 と二量体を形成することによって、VEGF-A /Flk-1 シグナリングを抑制することが知られており、血管内皮細胞においても、Flt-1 は VEGF-A /Flk-1 シグナリングによる血管新生を抑制する (Bahramsoltan et al, 2010; Cai et al, 2012)。このため、Flk-1 と Flt-1 の相互作用によって VEGF-A の作用は制御されているものと考えられている。

VEGF-A は、血液細胞の分化においても重要な働きを担っている (Carmeliet et al, 1996; Ferrara et al, 1996)。VEGF-A は、顆粒球系および赤芽球系細胞において、前駆細胞からの分化を促進する (Dikov et al, 2001; Gabrilovich et al, 1998)。さらに、Flt-1 と Flk-1 の相互作用の存在も報告されており、HSCs においては、VEGF-A/Flk-1 シグナリングは HSCs 自体の細胞増殖と生存時間を促進するのに対し (Dias et al, 2000; Gerber et al, 2002; Santos et al, 2004)、VEGF-A/Flt-1 シグナリングは HSCs の分化を促進する (Gerber et al., 2002; Hattori et al., 2002)。また、リンパ球系細胞においては、VEGF-A/Flt-1 シグナリングは pro-B 細胞から pre-B 細胞への分化を促進するが、一方、VEGF-A/Flk-1 シグナリングは、これを抑制する (Huang et al, 2007)。

肥満細胞においても、IgE による刺激や低酸素状態によって VEGF-A の発現が誘導

されることが知られており (Boesiger et al., 1998; García-Román et al., 2010)、肥満細胞由来の VEGF-A が創傷治癒や血管新生に関与していることが示唆されている (Boesiger et al., 1998; Artuc et al., 1999; Szukiewicz et al., 2005)。さらに、Detoraki ら (2009) は、ヒト肺肥満細胞において Flt-1 や Flk-1 が発現し、VEGF-A /Flt-1 および VEGF-A /Flk-1 シグナリングによって肥満細胞の遊走が促進されていることを報告している。しかし、肥満細胞の分化・成熟過程における VEGF-A、Flt-1 および Flk-1 の関与は明らかではない。イヌの皮膚 MCT においては、VEGF-A、Flt-1 および Flk-1 の発現が報告されているが、腫瘍細胞の組織学的悪性度や臨床的な動態との関連性は認められていない (Rebuzzi et al., 2007; Thompson et al., 2016)。一方、イヌの皮下 MCT においては、臨床的に悪性度の高い腫瘍で Flk-1 とリン酸化 Flk-1 の発現が亢進していることが報告されている (Da Silva et al., 2017)。しかしながら、これらの研究において検索した症例数は少数であり、また、腫瘍細胞の分化度との関連性については検索されていない。

このため、本研究においては、イヌ皮膚 MCT 症例の組織学的悪性度、およびその組織学的特徴を強く反映している MCT 細胞の分化度と、MCT 細胞における VEGF-A と VEGFRs の発現との関連性を明らかにし、さらに肥満細胞の分化に対する VEGF-A と VEGFRs の作用を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では、イヌ MCT において、組織学的悪性形質の発現に対する VEGF-A、Flk-1 および Flt-1 の関与を明らかにすることを目的とし、イヌ MCT 症例における MCT 細胞での VEGF-A、Flk-1 および Flt-1 の発現と、Patnaik 分類、Kiupel 分類および c-Kit 細胞内局在パターンによって決定される組織学的悪性度、および Ki-67 と Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) の発現によって同定される細胞増殖活性との関連を解析した。

第 3 章では、MCT 細胞の分化・成熟度に対する VEGF-A および Flk-1 の関与を明らかにする目的で、肥満細胞の細胞質内顆粒の特性、および肥満細胞の脱顆粒に関連して発現する GTP 結合タンパク Gai1 と機能的に成熟した肥満細胞が産生する MC

Tryptase の発現と、**VEGF-A**、**Flk-1** および **Flt-1** の発現との関連について検索した。

第 4 章では、正常皮膚肥満細胞の分化・成熟における **VEGF-A**、**Flk-1** および **Flt-1** の関与を明らかにするために、胎生期、新生子および成熟期のラットにおける皮膚肥満細胞の分化・成熟過程での **VEGF-A**、**Flk-1** および **Flt-1** の発現を検索した。

第 5 章では、肥満細胞の分化に対する **VEGF-A/Flk-1** シグナリングの作用を明らかにするために、マウス骨髄由来肥満細胞 (**mBMMC**) を用いて **VEGF-A** および **Flk-1 inhibitor** の添加実験を行い、分化関連因子の発現の変化を検索した。

第 6 章では、全ての章の結果を受け、**MCT** および肥満細胞における **VEGF-A** および受容体の発現、およびその分化に関連する機能に関する総合的な考察を行った。

第2章 イヌの皮膚肥満細胞腫における血管内皮増殖因子 (VEGF) -A とその受容体の発現と組織学的区制度との関連

2-1 小序

イヌにおいて皮膚肥満細胞腫 (mast cell tumor : MCT) は病理組織学的には、一般的に三段階分類 (Patnaik 分類) または、二段階分類 (Kiupel 分類) に分類される。Patnaik 分類では、腫瘍細胞が真皮内に限局する Grade I (低悪性度)、腫瘍細胞が皮下組織に浸潤する II (中悪性度) および、腫瘍細胞が核異型や高い N/C 比を示す III (高悪性度) に分類される (Patnaik et al., 1984)。Kiupel 分類では高倍率 10 視野において 7 個以上の核分裂像、3 個以上の多核細胞もしくは、3 個以上の奇形核細胞のいずれかが認められた場合を High-grade に、その他は Low-grade に分類される (Kiupel et al., 2010)。また、いずれの分類においても、皮下組織に限局する MCT はその分類が適応されず、subcutaneous MCT (皮下 MCT) に分類する。一方、近年では、幹細胞因子 (SCF) の受容体である c-Kit の細胞内局在パターンと MCT の悪性度に相関性があることが報告されている (Costa et al., 2007)。免疫組織化学によって、c-Kit 陽性反応の局在 Pattern は Pattern I、II、III の 3 種類に分類され、Pattern II、III では、再発、合併症によって生存期間が明らかに減少することも報告されている (Kiupel et al., 2004)。c-Kit pattern I では細胞膜にのみ陽性反応が認められ、細胞質には陽性反応がほとんど認められない。Pattern II では細胞質に顆粒状の陽性反応が散見される。Pattern III では細胞質内にび慢性の陽性反応が認められる (Kiupel et al., 2004)。また *c-kit* 遺伝子の変異が c-Kit の恒常的な SCF 非依存性リン酸化を引き起こすことが報告されており、これが MCT 発生の因子の 1 つと考えられている (London et al., 1999; Reguera et al., 2000; Riva et al., 2005)。しかしながら、病理組織学的悪性度による分類との相関性は低く、また、c-kit の発現は、ほとんどのイヌ皮膚 MCT の腫瘍細胞に認められることから、MCT の分化制御における SCF/c-Kit シグナリングの関与はそれほど重要ではないものと考えられる。

血管内皮増殖因子 (VEGF) -A の発現は様々な腫瘍において発現、機能していることが認められている (Siemeister et al., 1998; Veikkola et al., 2000; Giles, 2001; Gerber and Ferrara, 2003)。多くの *in vitro* の研究によって VEGF-A とその受容体である Flk-1 のシグナリングが細胞の遊走や増殖、アポトーシス抑制による細胞生存に関与していることが明らかになっている (Dias et al., 2000)。また VEGF-A やその受容体 (VEGFRs) の発現がヒトやイヌの腫瘍の増大に関わっていることも分かっている (Brown et al., 1993; Yoshiji et al., 1997; Kato et al., 2007; Yonemaru et al., 2006)。

イヌ MCT においても、イヌ初代培養 MCT 細胞やイヌ MCT 細胞株で VEGF-A、Flt-1、Flk-1 の発現が認められており (Rebuzzi et al., 2006)、さらに近年 Da Silva ら (2017) が subMCT において Flk-1 とリン酸化 Flk-1 が高発現しており、その発現が生存期間の減少と関連していることを示した。しかし、イヌの MCT における VEGF-A および VEGFRs の発現と腫瘍の組織学的悪性度との関連性については未だに分かっていない。そのため本章では、MCT における VEGF-A、Flt-1 および Flk-1 の発現と組織学的分類 (Patnaik 分類および Kiupel 分類)、および c-Kit pattern との関連性を明らかにした。また正常なイヌの皮膚肥満細胞 (MC) における VEGF-A、Flt-1 および Flk-1 の発現について検索し、MCT 細胞との違いを明らかにした。

2-2 材料と方法

2-2-1 正常皮膚組織の採材および病理組織切片の作製

本章における動物実験は全て日本獣医生命科学大学動物実験委員会の承認を（承認番号: 30K-10）を得て行った。イヌの正常皮膚、脳、腎臓、肺および網膜は3頭のイヌから採材し、皮膚は4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液で一晩固定した。その他の臓器の処理に関しては2-2-3に示した。

92症例のMCTは日本獣医生命科学大学附属医療センターおよび獣医解剖学教室と関連のある動物病院から提供された。病理組織は4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液で1晩固定した。正常皮膚およびMCT固定された組織は常法に従ってパラフィン包埋した。また、43症例のパラフィンブロックは岩手大学病理学教室より提出された。すべてのパラフィンブロックから3 μ mの切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色および、各免疫組織化学に用いた。

2-2-2 MCTの病理組織学分類

MCT組織切片は常法に従ってHE染色を行い、Patonaikら（1984）の分類方法に従って浸潤、核多形性、巨細胞の割合および分裂像等に基づき、皮膚MCTをGrade I～IIIに分類した。またKiupelら（2004）の分類に基づいて二段階での分類も行なった。また、皮下組織に腫瘍細胞が限局するMCTは皮下MCTに分類した。分裂像は高倍率10視野における数をカウントし、1視野における数を計算した。

2-2-3 Western blottingによる解析

用いた抗体のイヌの組織との交差性を調べるためにWestern blottingを行なった。タンパク質の変性を防ぐため（Kohara et al., 2015）、10% TCAによって固定したイヌの脳（c-Kit）、腎臓（VEGF-A）、肺（Flt-1）、網膜（Flk-1）は、0°Cにて2% Triton X-100/8M 尿素でホモジナイズした後、1%ジチオトレイトールで還元した。次にドデ

シル硫酸リチウムを加え、pH を中性に補正し、可溶化した物質は SDS ポリアクリルアミドゲル (c-Kit, 10%; VEGF, 12%; Flt-1 and Flk-1, 6%) にて電気泳動し、PVDF メンブレン (Millipore) に転写した。PVDF メンブレンは 500mM NaCl / 0.1% Tween-20 / 20mM トリス緩衝液 pH7.4 (TBST) で洗浄し、1% ECL Blocking Agent (GE Healthcare) /TBST で 4°C にて一晩反応させた。その後メンブレンは、TBST により洗浄 (5 分間×3 回) し、以下の濃度の各一次抗体と常温で 1 時間反応させた ; 抗 c-Kit ウサギポリクローナル抗体 (1:1000, Dako)、抗 VEGF ウサギポリクローナル抗体 (1:1000, Santa Cruz)、抗 Flt-1 ウサギポリクローナル抗体 (1:2000, Santa Cruz)、抗 Flk-1 マウスモノクローナル抗体 (1:2000, Santa Cruz)。次に TBST により洗浄 (5 分間×3 回) した後に HRP 標識抗ウサギ Ig ロバポリクローナル抗体 (GE Healthcare; c-Kit, VEGF-A, Flt-1) もしくは HRP 標識抗マウス Ig ヒツジポリクローナル抗体 (GE Healthcare; Flk-1) と常温で 1 時間反応させた。その後、ECL Prime Detection System (GE Healthcare) を用いて化学発光を惹起させ、LAS-4000 mini によって検出した。

2-2-4 MCT の c-Kit 免疫組織化学的検索、c-Kit pattern 分類

脱パラフィン後、組織切片を 0.3%過酸化水素水/メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した後、0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) で 5 分 3 回ずつ洗浄した。その後電子レンジ 500W (5 分間×3 回) 処理を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中に行い、抗原を賦活化した。室温に 20 分間置いた後に再び 0.01M PBS により洗浄 (5 分間×3 回) し、その後 4% Block Ace (雪印乳業) で 1 時間ブロッキングを行った。そして一次抗体である抗 c-KIT ウサギポリクローナル抗体 (1:300, DAKO) /0.01M PBS を常温で一晩反応させた。次に 0.01M PBS で洗浄 (5 分間×3 回) 後、二次抗体ビオチン標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG (ENVISION, DAKO) で 1 時間反応させた。0.01M PBS で洗浄 (5 分間×3 回) 後、ジアミノベンチジン (DAB) 溶液 (ENVISION, DAKO) を用いて発色させ、抗体反応部位を可視化した。5 分間

流水で洗浄し蒸留水を通してから対比染色のためにヘマトキシリンで核の染色を行った。その後、5分間流水で洗浄し蒸留水を通してから脱水、透徹、封入を行った。

染色した症例の切片は c-Kit pattern I～IIIに分類した。腫瘍内の腫瘍細胞のうち60%以上が示す Pattern をその症例の c-Kit pattern とした。c-Kit pattern I は細胞膜上に、c-Kit pattern II は細胞質中に顆粒状に、c-Kit pattern III は細胞質にびまん性に陽性反応が認められた。

2-2-5 MCT の VEGF-A、Flk-1、Flt-1 免疫組織化学的検索

2-2-4 と同様に内因性ペルオキシダーゼ阻害を行った後、0.01M PBS で洗浄（5分間×3回）し、抗原賦活化のために0.01M クエン酸緩衝液（pH6.0）中で1時間温浴（65℃）処理した。20分間常温で置いた後に0.01M PBS で洗浄（5分間×3回）し、10%正常ヤギ血清（ヒストファイン）で1時間ブロッキングを行った。そして各一次抗体は以下の濃度に希釈し、常温で一晩反応させた；抗 VEGF ウサギポリクローナル抗体（1:100, Santa Cruz）/0.01M PBS、抗 Flk-1 マウスモノクローナル抗体（1:200, Santa Cruz）/0.01M PBS、抗 Flt-1 ウサギポリクローナル抗体（1:200, Santa Cruz）/0.01M PBS、抗 Ki67 マウスモノクローナル抗体（1:500, ABCAM）/0.01M PBS、抗 PCNA マウスモノクローナル抗体（1:2,000, Santa Cruz）/0.01M PBS。その後は2-2-4 と同様に抗体反応部位の可視化および対比染色、脱水、透徹、封入を行った。

腫瘍細胞内の腫瘍細胞において60%以上が陽性反応を示した症例を陽性症例とした。

2-2-6 正常皮膚 MC および MCT 症例の Ki67、PCNA 免疫組織化学

2-2-5 および 2-2-6 と同様の条件・方法で発色まで行い、水洗を行った。その後、2分間3%酢酸を通してから1%アルシアンブルー（AB）/3%酢酸液で10分間染色した。その後3%酢酸で染色液を落としてから、水洗、脱水、透徹後に封入した。

Ki67、PCNA 共に、高倍率10視野におけるAB染色陽性かつ、核内免疫反応が陽

性の細胞数を計測した。

2-2-7 正常皮膚 MC における c-Kit、VEGF-A、Flk-1 および Flt-1 の免疫組織化学

2-2-5 および 2-2-6 と同様の条件・方法で発色まで行い、水洗を行った。その後、2-2-6 と同様の方法で AB 染色を行い、水洗、脱水、透徹後に封入した。2-2-4～2-2-7 での免疫組織化学の条件は Table 2 にまとめた。

2-2-8 正常皮膚 MC における VEGF-A/MC Tryptase および c-Kit/Flk-1、MCT における VEGF-A/Flk-1 の蛍光二重免疫組織化学

脱パラフィン後、0.01M PBS で洗浄 (5 分間×3 回) し、抗原賦活化のために 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 1 時間温浴 (65°C) 処理した。20 分間常温で置いた後に 0.01M PBS で洗浄 (5 分間×3 回) し、5%正常ヤギ血清 (ヒストファイン) /0.01M PBS で 1 時間ブロッキングを行った。そして以下の組み合わせの混合一次抗体を常温で一晩反応させた ; MC:抗 VEGF ウサギポリクローナル抗体 (1:100) および抗 MC Tryptase マウスモノクローナル抗体 (1:100)、抗 c-Kit ウサギポリクローナル抗体 (1:100) および抗 Flk-1 マウスモノクローナル抗体 (1:100) ;MCT: 抗 VEGF ウサギポリクローナル抗体 (1:100) および抗 Flk-1 マウスモノクローナル抗体 (1:100)。次に 0.01M PBS で洗浄 (5 分間×3 回) 後、抗ウサギ Ig ロバポリクローナル抗体 (1:250, Invitrogen) および抗マウス Ig ヤギポリクローナル抗体 (1:250, Invitrogen) 混合二次抗体で 2 時間反応させた。0.01M PBS で洗浄 (5 分間×3 回) 後、BZ-X Viewer および BZ-X Analyzer を用いて解析した。

2-2-9 統計解析

VEGF-A、Flt-1 および Flk-1 の発現は χ^2 検定によって、病理組織学的分類、c-Kit pattern、核分裂像、Ki67 および、PCNA による MCT の悪性度との関連を統計学的に検索した。

Table 2. 使用抗体希釈倍率

Antibody	Blocking	Host species	Dilution	Supplier	Article No.
Anti-c-Kit	4% Block Ace	Rabbit, polyclonal	1:300 (1:100)*	Agilent, Santa Clara, CA., U.S.A.	A4502
Anti-VEGF-A	5% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:100	Cloud-Clone, Katy, TX., U.S.A.	LAA143Ca71
Anti-Flk1	10% goat serum	Mouse, monoclonal	1:200 (1:100)*	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-393163
Anti-Flt1	2% Block Ace	Rabbit, polyclonal	1:200 (1:100)*	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-316
Anti-MC Tryptase (10% goat serum)*		Mouse, monoclonal	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-59587
Anti-Ki67	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:500	ABCAM, Cambridge, U.K.	ab15580
Anti-PCNA	4% Block Ace	Mouse, monoclonal	1:20,000	Agilent, Santa Clara, CA., U.S.A.	M0879

*()内は蛍光免疫組織化学での条件

2-3 結果

2-3-1 Western blotting 解析

c-Kit、VEGF-A、Flt-1、Flk-1 の各抗体全てでイヌの組織との交差性が認められた (Figure 2-1)。ヒトやマウス、イヌで報告されているように (Yee et al., 1993; Thompson et al., 2016)、抗 c-Kit 抗体はイヌの脳で 150kDa、抗 VEGF-A 抗体はイヌの腎臓で 24kDa と 48kDa のバンドが検出された。また抗 Flk-1 抗体はイヌの網膜で 230kDa、190kDa、150kDa の 3 つのバンドが、抗 Flt-1 抗体はイヌの肺で 180kDa のバンドが検出された (Wen et al., 1997; Adham and Coomber, 2009; Thompson et al., 2016)。

2-3-2 イヌの正常皮膚 MC における VEGF-A および Flk-1 の発現

VEGF-A の発現は核ではなく細胞質に認められた ($62.3 \pm 7.5\%$; Figure. 2-2A)。MC Tryptase と VEGF-A の蛍光二重免疫組織化学でも VEGF-A の細胞質における発現が確認された (Figure 2-2C~F)。一方で Flk-1 の発現は肥満細胞の核内に認められ、細胞質には認められなかった ($57.3\% \pm 10.4\%$; Figure 2-2B)。Flk-1 と c-Kit の蛍光二重染色においても Flk-1 の発現は核内に確認された (Figure 2G-J)。また Flt-1、Ki67 および PCNA の発現は認められなかった。

2-3-3 MCT の病理組織学的分類、c-Kit pattern 分類および増殖能の評価

全 135 症例のうち、122 症例が皮膚 MCT、13 症例が皮下 MCT に分類された。

122 症例の MCT は Patnaik 分類では Grade I が 14 例、Grade II 86 例、Grade III が 22 例であり、Kiupel 分類では Low-grade は 93 例、High grade は 29 例であった。また皮膚 MCT 122 症例を c-Kit pattern で分類すると Pattern I が 30 例、Pattern II が 83 症例、Pattern III が 9 症例であった (Table 2-1)。

皮下 MCT 13 症例を c-Kit pattern で分類すると Pattern I が 5 例、Pattern II が

8 症例であった (Table 2-2)。

皮膚MCTならびに皮下MCTはいずれも Ki67は10視野における発現細胞数が0、 $0 < N < 30$ 、 $30 \leq N$ に、PCNAはPCNA陽性MCT細胞の割合を0、 $0 < N < 5$ 、 $5 \leq N$ に分類した (Table 2-1、2-2)。

2-3-4 MCTにおけるVEGF-A、Flt-1およびFlk-1免疫組織化学

VEGF-Aは正常皮膚MCとは異なり、陽性反応は細胞質だけでなく、核内にも認められた (Figure. 2-4)。皮膚MCTのPatnaik分類Grade Iでは4症例 (28.6%)、Grade IIでは16症例 (18.6%)、Grade IIIでは14症例 (63.6%)で陽性であった。Kiupel分類Low-gradeでは19症例 (20.4%)、High-gradeでは15症例 (51.7%)で陽性であった。またc-Kit pattern分類ではPattern Iでは4症例 (13.3%)、Pattern IIでは28症例 (33.7%)、Pattern IIIでは7症例 (77.8%)で陽性であった (Table 2-1)。

MCTの14症例においてFlt-1の発現は細胞質内に認められた。Patnaik分類Grade Iでは3症例 (21.4%)、Grade IIでは8症例 (9.3%)、Grade IIIでは3症例 (13.6%)で陽性であった。Kiupel分類Low-gradeでは11症例 (11.8%)、High-gradeでは3症例 (10.3%)で陽性であった。またc-Kit pattern分類ではPattern Iでは3症例 (10.0%)、Pattern IIでは9症例 (10.8%)、Pattern IIIでは2症例 (22.2%)で陽性であった (Table 2-1)。

Flk-1の陽性反応は正常皮膚MCと異なり、細胞質および核内で認められた (Figure. 2-5)。Flk-1は、Patnaik分類Grade Iでは4症例 (28.6%)、Grade IIでは36症例 (41.9%)、Grade IIIでは12症例 (54.6%)で陽性であった。Kiupel分類Low-gradeでは37症例 (39.8%)、High-gradeでは15症例 (51.72%) またc-Kit pattern分類ではPattern Iでは6症例 (20.0%)、Pattern IIでは39症例 (47.0%)、Pattern IIIでは7症例 (77.8%)で陽性であった。

またこれらの発現に関して病理組織学的分類およびc-Kit pattern分類との関連性を χ^2 検定で検索したところ、Grade分類ではVEGF-AにおいてGrade IIIで他のGrade

よりも発現が有意であった ($p<0.05$)。また c-Kit pattern 分類においては、VEGF-A の発現は Pattern III は I および II ($p<0.005$) で有意であり、Flk-1 の発現は Pattern II および III が Pattern I に対して有意であった ($p<0.01$)。また VEGF-A の発現は核分裂像が 7 個以上の症例において有意に発現していた ($p<0.01$)。一方で Flt-1 の発現はいずれにおいても有意差は認められなかった。以上のデータは全て Table 2-1 に示した。

また 13 症例の皮下 MCT においては、VEGF-A は 5 症例 (38.5%)、Flk-1 は 5 症例 (38.5%)、Flt-1 は 2 症例 (15.4%) で陽性であった。VEGF-A および Flk-1 の発現は c-Kit pattern II で Pattern I よりも有意であった ($p<0.05$) (Table 2-2)。

2-3-5 VEGF-A および Flk-1 の蛍光二重免疫組織化学

VEGF-A および Flk-1 免疫組織化学で皮膚 MCT 22 症例 (Grade I : 1 症例、II : 12 症例、III : 9 症例; Low-grade : 12 症例、High-grade : 10 症例; c-Kit pattern I : 1 症例、II : 16 症例、III : 5 症例) および、皮下 MCT 5 症例において、VEGF-A および Flk-1 が陽性であったことから、VEGF-A および Flk-1 の蛍光二重免疫組織化学を行った。その結果、全てにおいて腫瘍細胞において VEGF-A および Flk-1 の共発現が認められた ($97.9\pm 6.9\%$) (Figure 2-6)。またその発現部位について検索したところ、VEGF-A および Flk-1 いずれも腫瘍細胞の細胞質および核内においてその発現が認められた。

皮膚 MCT の 22 症例について、VEGF-A および Flk-1 共発現と Grade 分類および c-Kit pattern 分類との関連性を χ^2 検定で検索したところ、Patnaik 分類 Grade III、Kiupel 分類 High-grade、および c-Kit pattern Pattern III はそれぞれその他よりも共発現が有意であった ($p<0.001$)。また皮下 MCT の 5 症例では、c-Kit pattern II において有意に共発現が認められた ($p<0.05$)。

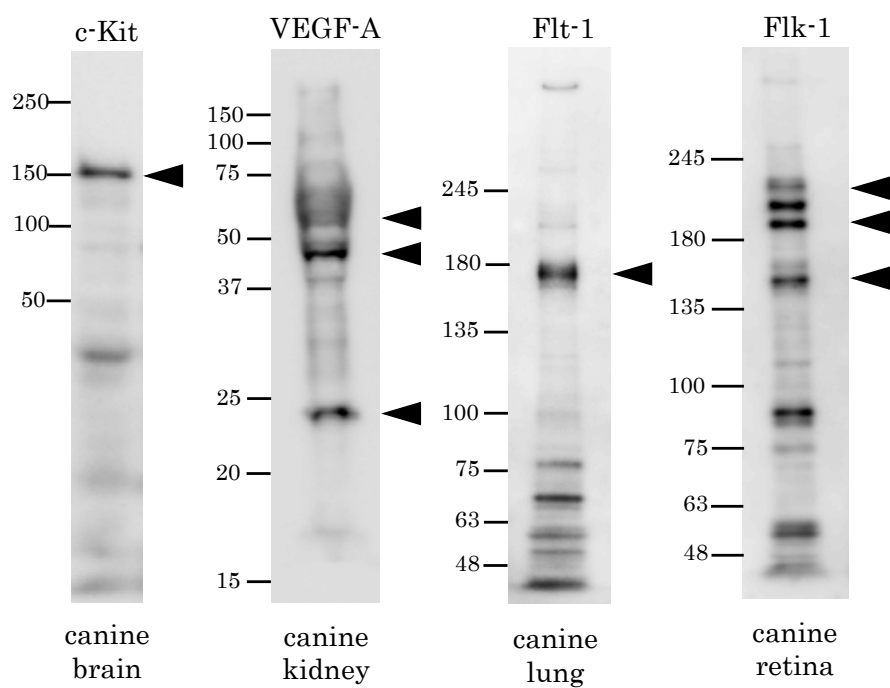


Figure 2-1 各抗体のイヌ組織との交差性
 本章で使用した抗体はイヌの臓器との交差性があることが確認された。
 それぞれのバンドに関しては矢頭で示した。

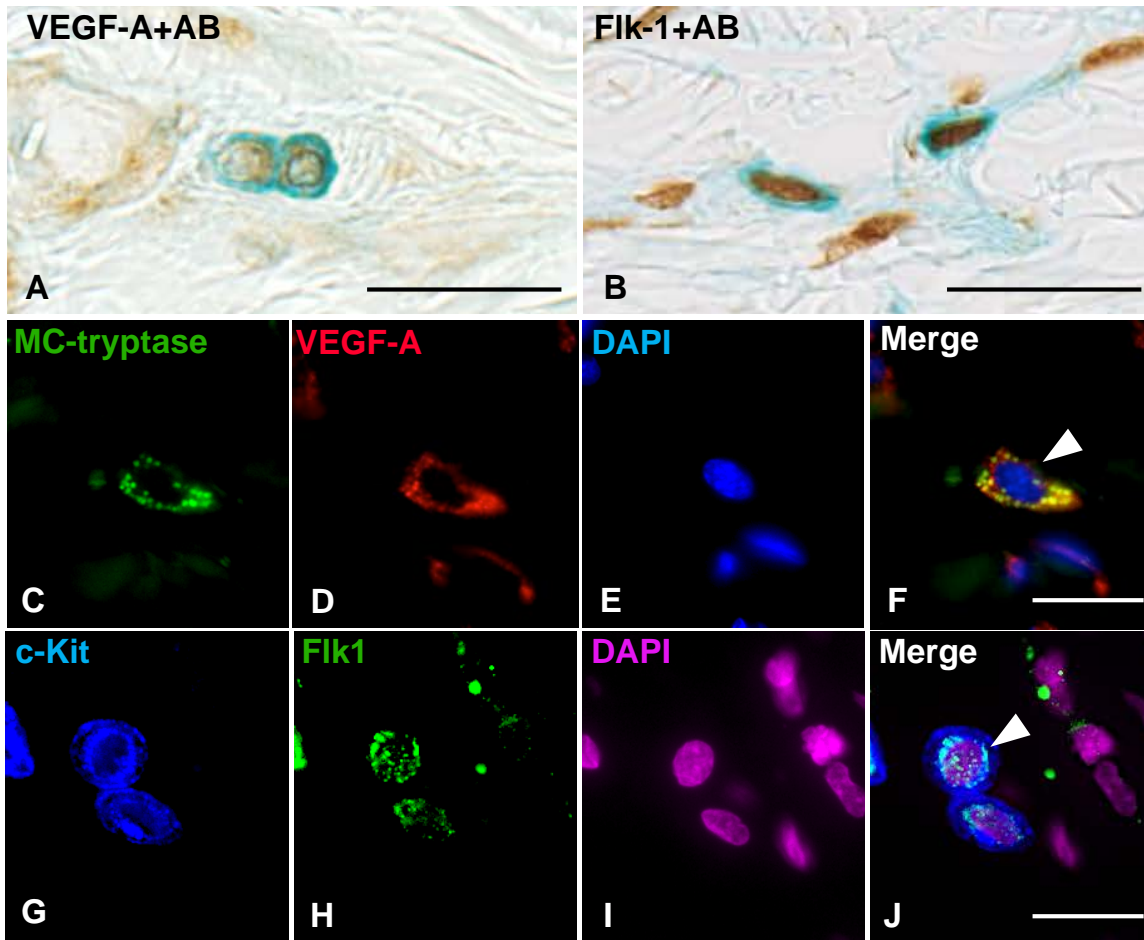


Figure 2-2 イヌの正常皮膚肥満細胞におけるVEGF-AおよびFlk-1の発現

A: 皮膚肥満細胞において細胞質にVEGF-Aの発現が認められた。

B: 皮膚肥満細胞において核内にFlk-1の発現が認められた。

(AB:アルシアンブルー 染色; A、Bのスケールバー: 20 μ m)

C-F: MC tryptaseおよびVEGF-Aの蛍光二重免疫組織化学。皮膚肥満細胞においてMC tryptase (C、緑)およびVEGF-A (D、赤)の発現は細胞質に認められた (F、黄、矢頭)。核内(青)における発現は認められなかった。

G-J: c-KitおよびFlk-1の蛍光二重免疫組織化学。皮膚肥満細胞においてc-Kit (G、青)陽性の肥満細胞においてFlk-1 (H、緑)の発現は核内(I、マゼンダ)に認められた。(C-Jのスケールバー: 10 μ m)

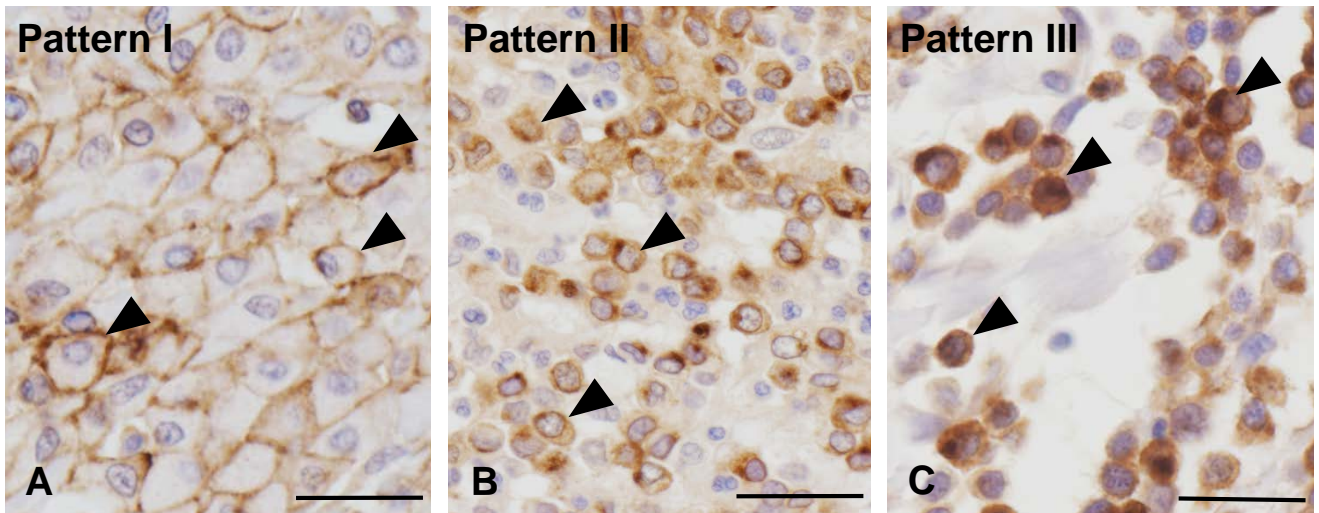


Figure 2-3 c-Kit Pattern分類

A: c-Kit pattern I では、c-Kit陽性反応が細胞膜に局在している。

B: c-Kit pattern II では、c-Kit陽性反応が細胞質内に顆粒状に認められる。

C: c-Kit pattern III では、c-Kit陽性反応が細胞質内にび慢性に認められる。

(悪性度: I < II < III、スケールバー: 20 μ m)

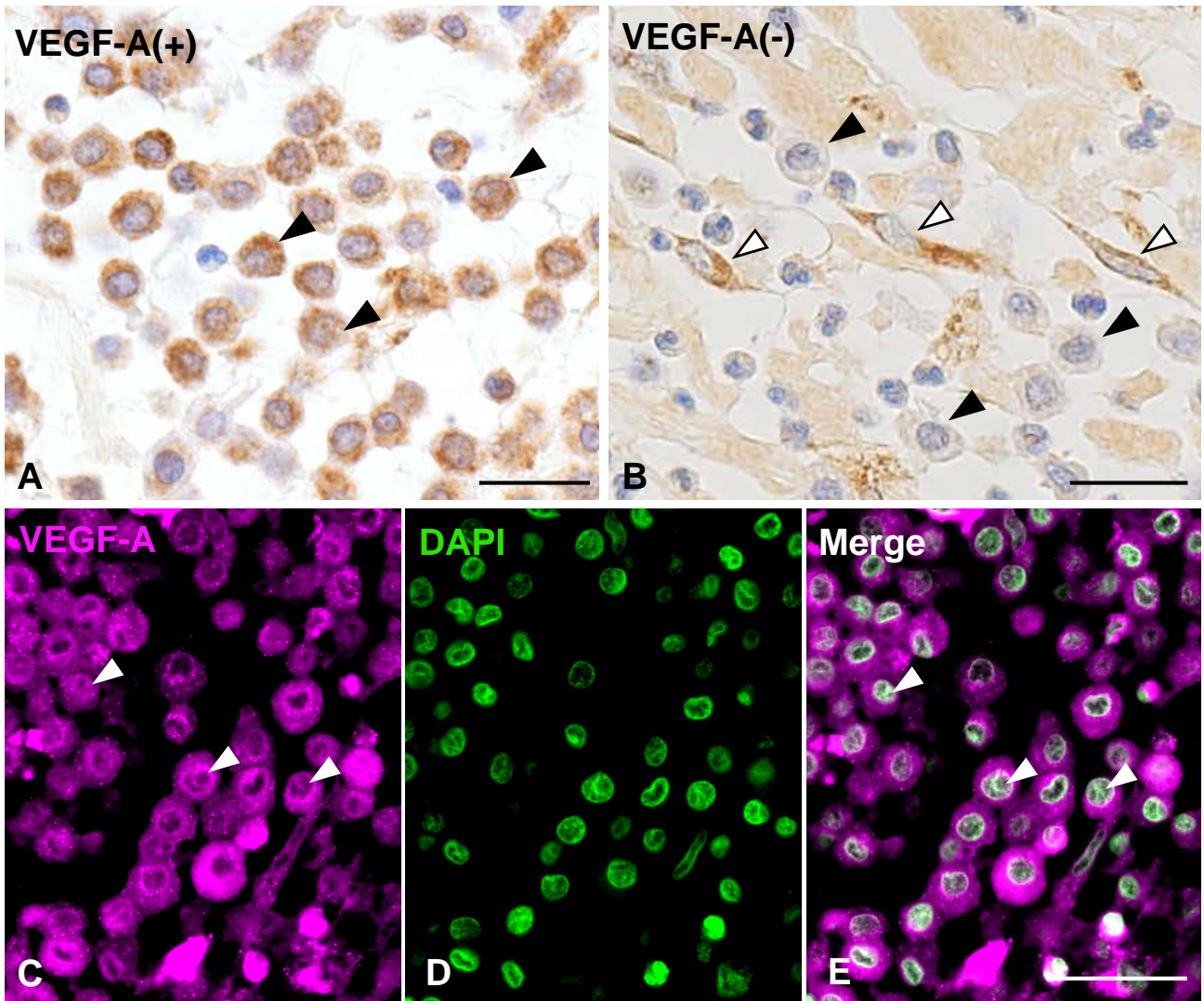


Figure 2-4 MCTにおけるVEGF-A免疫組織化学

A: MCT腫瘍細胞において、細胞質および核内にVEGF-Aの免疫陽性反応が認められる。

B: VEGF-A(-)症例において、間質細胞の細胞質に免疫陽性反応が認められる。

(A、B: 黒矢頭: MCT腫瘍細胞、白矢頭: 間質細胞、スケールバー: 20 μ m)

C-E: VEGF-Aの蛍光免疫組織化学。細胞質内および核内(DAPI: 緑)でVEGF-A(マゼンダ)の免疫反応が認められた。

(白矢頭: MCT腫瘍細胞、スケールバー: 20 μ m)

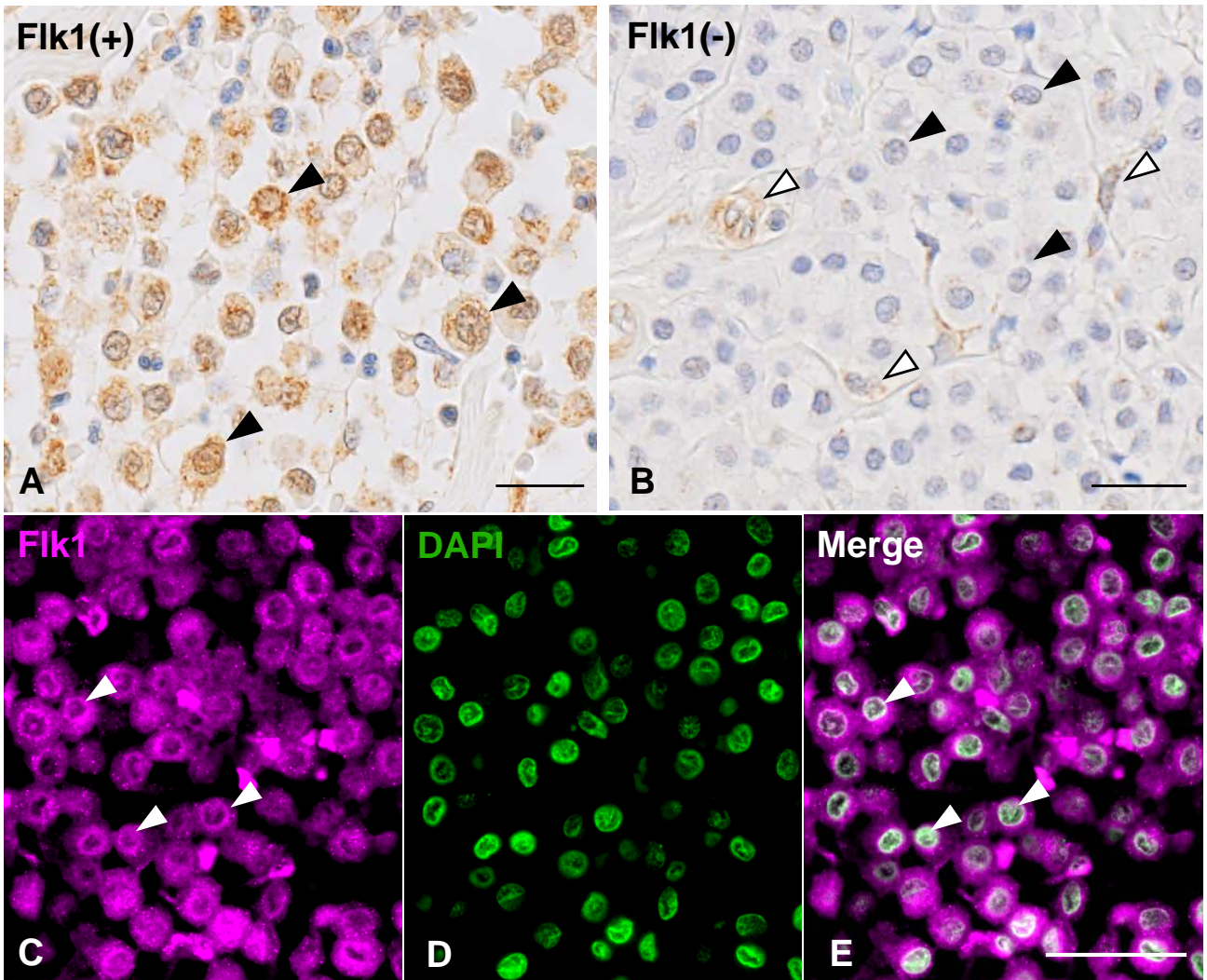


Figure 2-5 MCTにおけるFlk-1免疫組織化学

A: MCT腫瘍細胞において、細胞質および核内にFlk-1の免疫陽性反応が認められる。

B: Flk-1(-)症例において、内皮細胞の細胞質に免疫陽性反応が認められる。

(A、B: 黒矢頭: MCT腫瘍細胞、白矢頭: 間質細胞、スケールバー: 20 μ m)

C-E: Flk-1の蛍光免疫組織化学。細胞質内および核内(DAPI: 緑)でFlk-1(マゼンダ)の免疫反応が認められた。

(白矢頭: MCT腫瘍細胞、スケールバー: 20 μ m)

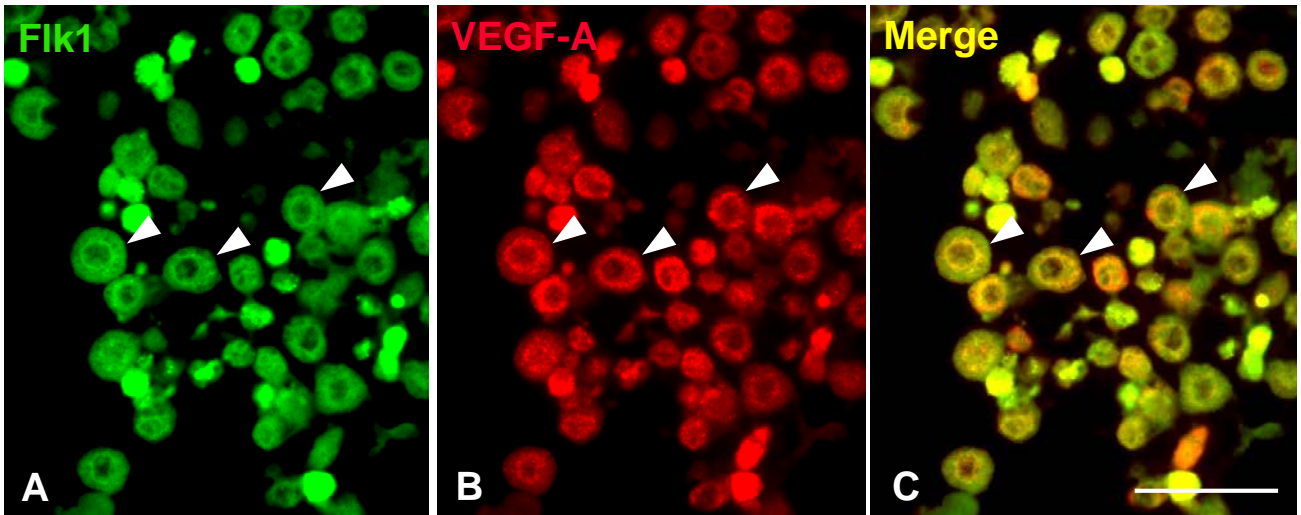


Figure 2-6 MCTにおけるVEGF-AおよびFlk-1蛍光二重免疫組織化学
Flk-1(A、緑)およびVEGF-A(B、赤)が同一腫瘍細胞内の細胞質および核内に発現(C、黄)しているのが認められる。白矢頭: MCT腫瘍細胞、スケールバー: 20 μ m。

Table. 2-1 イヌの皮膚MCTにおけるVEGF-A、Flt-1およびFlk-1の発現

		N	VEGF-A (%)	Flt-1 (%)	Flk-1 (%)	VEGF-A/ Flk-1 (%)
皮膚MCT		122	34 (27.9)	14 (11.5)	52 (42.6)	22 (18.0)
Patnaik分類 (Grade)	I	14	4 (28.6)	3 (21.4)	4 (28.6)	1 (7.1)
	II	86	16 (18.6)	8 (9.3)	36 (41.9)	12 (14.0)
	III	22	14 (63.6) ^a	3 (13.6)	12 (54.6)	9 (40.9) ^a
Kiupel分類	Low	93	19 (20.4)	11 (11.8)	37 (39.8)	12 (12.9)
	High	29	15 (51.7) ^b	3 (10.3)	15 (51.7)	10 (34.5) ^b
Mitotic figures	0≤N<7	101	22 (21.8)	11 (10.8)	42 (41.6)	14 (13.9)
	7≤N	21	12 (57.1) ^c	3 (14.3)	10 (47.6)	8 (38.1) ^c
c-Kit pattern	I	30	4 (13.3)	3 (10.0)	6 (20.0)	1 (3.3)
	II	83	28 (33.7)	9 (10.8)	39 (47.0) ^e	16 (19.3) ^f
	III	9	7 (77.8) ^d	2 (22.2)	7 (77.8) ^e	5 (55.6) ^d
Ki67	0	22	9 (40.9)	2 (9.1)	12 (54.6)	6 (27.3)
	0<N<30	40	7 (17.5)	6 (15.0)	17 (42.5)	5 (12.5)
	30≤N	18	9 (50.0)	3 (16.7)	7 (38.9)	5 (27.8)
PCNA	0	25	9 (36.0)	3 (12.0)	10 (40.0)	6 (24.0)
	0<N<5	64	11 (17.2)	5 (7.8)	27 (42.2)	7 (10.9)
	5≤N	33	14 (42.4)	6 (18.2)	15 (45.5)	9 (27.3)

a) $p<0.05$ vs Grade I and II, b) $p<0.01$ vs Low-grade, c) $p<0.01$ vs Mitotic counts $0\leq N<7$, d) $p<0.005$ vs c-Kit pattern I and II, e) $p<0.01$ vs c-Kit pattern I, f) $p<0.05$ vs c-Kit pattern I

Table. 2-2 イヌの皮下MCTにおけるVEGF-A、Flt-1およびFlk-1の発現

		N	VEGF-A(%)	Flt-1(%)	Flk-1(%)	VEGF-A/ Flk-1(%)
皮下MCT		13	5 (38.5)	2 (15.4)	5 (38.5)	5 (38.5)
Mitotic figures	0≤N<7	10	4 (40.0)	1 (10.0)	3 (30.0)	4 (40.0)
	7≤N	3	1 (33.3)	1 (33.3)	2 (66.7)	1 (33.3)
c-Kit pattern	I	5	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	II	8	5 (62.5)*	2 (25.0)	5 (62.5)*	5 (62.5)*
	III	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ki67	0	4	1 (25.0)	0 (0.0)	1 (25.0)	0 (0.0)
	0<N<30	4	3 (75.0)	1 (25.0)	3 (75.0)	3 (75.0)
	30≤N	3	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
PCNA	0	4	3 (75.0)	1 (25.0)	2 (50.0)	2 (50.0)
	0<N<5	6	2 (33.3)	1 (16.7)	2 (33.3)	2 (33.3)
	5≤N	3	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (33.3)	0 (0.0)

*) $p>0.05$ vs c-Kit pattern I

Table. 2-3 イヌの皮膚MCTにおけるVEGF-A/Flk-1の共発現

		Flk-1(+)	VEGF-A(+)/ Flk-1(+)	VEGF-A(-)/ Flk-1(+)
			(%)	(%)
皮膚MCT		52	22 (42.3)	30 (57.7)
Patnaik分類 (Grade)	I	4	1 (25.0)	3 (75.0)
	II	36	12 (33.3)	24 (66.7)
	III	12	9 (75.0) ^a	3 (25.0)
Kiupel分類	low	37	12 (32.4)	25 (67.5)
	high	15	10 (66.7) ^b	5 (33.3)
Mitotic figures	0≤N<7	42	14 (33.3)	28 (66.7)
	7≤N	10	8 (80.0)	2 (20.0)
c-Kit pattern	I	6	1 (16.7)	5 (83.3)
	II	39	16 (41.0)	23 (59.0)
	III	7	5 (71.4) ^c	2 (28.6)

a) $p < 0.05$, vs Grade II, b) $p < 0.05$, vs Low-grade, c) $p < 0.05$, vs c-Kit pattern I

Table. 2-4 イヌの皮下MCTにおけるVEGF-A、Flt-1およびFlk-1の発現

		Flk-1(+)	VEGF-A(+)/ Flk-1(+)(%)	VEGF-A(-)/ Flk-1(+)(%)
皮下MCT		5	4 (80.0)	1 (20.0)
Mitotic figures	0≤N<7	3	3 (100.0)	0 (0.0)
	7≤N	2	1 (50.0)	1 (50.0)
c-Kit pattern	I	0	0 (0.0)	0 (0.0)
	II	5	4 (80.0)	1 (20.0)
	III	0	0 (0.0)	0 (0.0)

2-4 考察

本章において、MCT 細胞における VEGF-A の発現は、Patnaik 分類、Kiupel 分類、および c-Kit pattern による組織学的悪性度の高い MCT において有意に多く認められ、Flk-1 の発現は c-Kit pattern による組織学的悪性度の高い MCT において有意に多く認められた。Kiupel ら (2004) は c-Kit pattern II および III が MCT の再発率と生存率の低下に関連していることを明らかにし、Costa ら (2007) は c-Kit pattern と組織学的悪性度および腫瘍の細胞増殖の関連を明らかにした。これらのことから今回の VEGF-A と Flk-1 の MCT 細胞における発現は、MCT の悪性形質発現に関与しているものと考えられた。

VEGF-A は、種々の環境下で非腫瘍性肥満細胞からも産生され、血管新生を促進していることが明らかとなっている (Boesiger et al., 1998; de Souza Junior et al., 2015; Detoraki et al., 2009; McHale et al., 2019)。さらに、肥満細胞における VEGF-A の発現はプロスタグランジン E₂、コルチコトロピン放出ホルモンおよび IgE による刺激によって促進される (Boesiger et al., 1998; Abdel-Majid and Marshall, 2004; Cao et al., 2005)。近年、SCF/c-Kit シグナリングによって皮膚由来肥満細胞における VEGF-A の発現が増加することが報告されている (McHale et al., 2019)。今回の結果では、悪性度の高い MCT 症例において、VEGF-A の発現が有意に認められた。Halsey ら (2017) は、高悪性度の MCT では、リン酸化 c-Kit の増加が生じていることを明らかにしている。このため、本研究においても高悪性度の MCT では SCF/c-Kit シグナリングが増加し、VEGF-A の発現を促進している可能性が示唆される。また VEGF-A の発現に関して、MCT と正常皮膚肥満細胞においてその発現の局在が異なっていた。MCT では腫瘍細胞の細胞質および核において VEGF-A の局在が認められたが、正常の皮膚肥満細胞においては、細胞質にのみ認められた。VEGF の核内移行は低酸素下において Large-VEGF-A (L-VEGF-A) から分離された 180 アミノ酸からなるタンパク質であり、腎細胞癌や乳腺癌においてそれらの正常細胞と比較して VEGF の核内移行が増加していることが報告されている (Rosenbaum-Dekel et al., 2005)。また血

管内皮細胞においても創傷治癒と VEGF 核内移行の関連が示唆されている (Li and Keller, 2000)。Cheng ら (2018) は、L-VEGF144 が多形性膠芽腫において細胞分裂促進因子として腫瘍細胞の増殖を促進している可能性を示した。これらのことから L-VEGF-A および核内 VEGF-A が腫瘍の拡大や成長に関与していることが示唆されており、今回 MCT で認められた核内 VEGF-A の発現も腫瘍の悪性形質の発現に関与している可能性が考えられる。

腫瘍細胞による VEGF-A 産生による血管内皮細胞の活性は腫瘍血管新生や腫瘍進行に関与している (Siemeister et al., 1998; Veikkola et al., 2000; Giles, 2001; Gerber and Ferrara, 2003; Shinkaruk et al., 2003)。このことから、MCT 細胞における VEGF-A の産生が MCT の血管新生や増大に関与していることが示唆される。しかしながら、VEGF-A はまた Flt-1 や Flk-1 を介したパラクラインやオートクラインループによって腫瘍細胞自身の増殖因子として作用していることが報告されている (Siemeister et al., 1998; Veikkola et al., 2000; Giles, 2001; Gerber and Ferrara, 2003)。今回の結果では VEGF-A を発現する腫瘍細胞のほとんどで Flk-1 の発現が認められており、VEGF-A が Flk-1 を介したオートクラインループで作用していると考えられる。また VEGF-A (-) /Flk-1 (+) MCT 症例で腫瘍内の線維芽細胞や血管内皮細胞において VEGF-A の発現が認められたことから、VEGF-A はパラクラインループによっても腫瘍細胞の Flk-1 に作用していると考えられる。

ヒトの急性骨髄性白血病や B 細胞性急性リンパ球性白血病細胞などの造血器腫瘍において、VEGF-A/Flk-1 シグナリングは腫瘍細胞の増殖や生存、遊走を増強する (Dias et al., 2000)。また、Flk-1 は正常および腫瘍化肥満細胞においても発現が報告されている (Rebuzzi et al., 2007; Detoraki et al., 2009; Thompson et al., 2015; Da Silva et al., 2017)。イヌの subMCT において、リン酸化 Flk-1 および全 Flk-1 の高発現が明らかに生存率を低下させており、Flk-1 シグナリングの活性化が MCT の悪性形質の発現に関与していることが示唆されている (Da Silva et al., 2017)。さらにヒトの肺から分離された正常肥満細胞とヒト肥満細胞白血病細胞株において VEGF-A/Flk-1 シ

グナリングの活性が細胞遊走を促進していることが報告されている (Santos and Dias, 2004; Detoraki et al., 2009)。しかし、MCT 増殖能の評価として用いた Ki67 および PCNA との VEGF-A、Flk-1 発現、および VEGF-A/Flk-1 共発現において関連は認められなかった。これらのことから、今回の MCT の結果からは Flk-1 (+) MCT 細胞において遊走能が上がることによって皮下組織浸潤といった悪性の挙動を示している可能性が考えられる。しかし、Flk-1 と VEGF-A 両方もしくは一方の発現を診断基準のひとつとするには、さらに詳細な生物学的挙動 (再発率、リンパ節転移、生存期間) との関連を検索する必要がある。

正常の皮膚肥満細胞において、Flk-1 の免疫陽性反応が細胞質ではなく核内に認められた。一方で、MCT 細胞では細胞質および核内の両方で認められた。Flk-1 は他の受容体と異なり、血管内皮細胞において細胞質のエンドゾーム内にその多くが貯蔵されている (Gampel et al., 2019)。さらに細胞質内 Flk-1 は VEGF-A の刺激によって活性化し、内皮一酸化窒素合成酵素 (eNOS) や shear stress によって核内に輸送されることが報告されている (Dougher and Terman, 1999; Feng et al., 1999; Santos et al., 2007)。またヒトメラノーマおよび B 細胞性悪性リンパ腫において、Flk-1 の細胞質内での発現は患者の予後の不良と関連している (Alberto et al, 2005; Giatromanolaki et al, 2008; Pisacane and Risio, 2005)。Pisacane と Risio (2005) は VEGF の産生は良性のメラノーマでも認められるが、Flk-1 が細胞質と核に局在しているのは高度な浸潤性を示す悪性メラノーマであることを報告している。これらのことから、イヌ MCT においても細胞質内での Flk-1 発現は腫瘍の進行に寄与している可能性が示唆される。

今回の蛍光二重免疫組織化学において、VEGF-A (+) /Flk-1 (+) 症例の腫瘍細胞での VEGF-A と Flk-1 の共発現が確認された。病理組織学的分類および c-Kit pattern 分類のいずれにおいても、悪性度が高い症例において VEGF-A (-) /Flk-1 (+) と比較して、VEGF-A (+) /Flk-1 (+) 共発現の MCT が有意多かったことから、VEGF-A/Flk-1 のオートクラインシグナリングが MCT 腫瘍の悪性形質発現に関与し

ている可能性が示唆される。近年の研究で、VEGF-A/Flk-1 細胞内オートクラインループは細胞外オートクラインループとは異なるシグナリング経路を介して作用していることが示されている (Santos and Dias, 2018)。ヒト造血幹細胞および急性白血病細胞においては、細胞内オートクラインは細胞の生存および増殖もしくはそのいずれかを増強させるが、細胞外オートクラインもしくはパラクラインループでは同様の作用はほとんど、もしくは全く認められなかった (Dias et al., 2000; Gerber et al., 2002; Santos and Dias, 2018)。Kampen (2012)は、細胞質内 Flk-1 の発現が VEGF-A/Flk-1 の細胞内オートクラインシグナリングに重要であることを示唆している。今回の免疫組織化学の結果、ほとんどの VEGF-A(+)/Flk-1(+)MCT において、細胞質内 VEGF-A と細胞質内 Flk-1 の共局在が認められた。このため、イヌの皮膚 MCT においては VEGF-A/Flk-1 の細胞内オートクライン機構が腫瘍進行に関与している可能性を示しているかもしれない。しかしこれらの細胞質における発現の詳しい作用については分かっていない。

本章において、VEGF-A および Flk-1 の発現、および VEGF-A と Flk-1 の共発現を示す MCT は、組織学的悪性度が高度であることが明らかとなった。このことから MCT 細胞の悪性化に VEGF-A および Flk-1 が関与している可能性が示唆された。また、イヌの正常皮膚肥満細胞においては細胞質内 VEGF-A および核内 Flk-1 のみ認められたが、イヌ MCT においては、VEGF-A および Flk-1 が細胞質内と核内に局在していることが明らかとなった。VEGF-A および Flk-1 の細胞内局在部位の変化が、MCT の進展に寄与している可能性が示唆された。

第3章 イヌの皮膚肥満細胞腫における血管内皮増殖因子 (VEGF-A) および VEGF 受容体-2 発現腫瘍細胞の分化度

3-1 小序

一般的に、悪性度の高い腫瘍細胞は低分化であることが知られており (Abhimanyu, 2017)、MCT においても、高悪性度の腫瘍細胞は細胞質内顆粒の減少、N/C 比の増加、核分裂像の増加など未成熟な肥満細胞に類似の形態学的特徴を示している (Simoes and Schonig, 1994)。このため、高悪性度の MCT においては、正常な分化・成熟の制御が変化し、未分化な状態を維持するメカニズムが存在していることが予測され、さらにこれらの制御機構が、腫瘍細胞の増殖や浸潤などの悪性形質の発現にも関与している可能性が示唆される。皮膚の肥満細胞 (MC) の分化や増殖には、幹細胞因子 (SCF) と SCF 受容体 c-Kit が深く関与していることが知られているが、低悪性度および高悪性度を含め大部分の MCT で c-Kit の発現が認められており、MCT の分化度と c-Kit の発現には有意な関連性は認められない。さらに MCT においては、c-Kit 遺伝子の突然変異が高頻度で生じていることが明らかとなっており、リガンド非依存性に恒常的な c-Kit のシグナリングが腫瘍細胞の発生や進展に深く関与しているものと考えられている (London et al., 1999)。しかしながら、病理組織学的悪性度による分類との相関性は低く、MCT の分化度との関連性は低いものと考えられる。このため、MCT 細胞の分化制御に、他の因子が深く関与している可能性が高い。

正常な肥満細胞は、骨髄造血幹細胞 (HSCs) 由来の細胞であり、HSCs は GATA-1/2、PU.1 によって骨髄中で肥満細胞前駆細胞に分化した後 (Harigae et al., 1998; Walsh et al., 2002)、血液によって全身を循環し、生着した末梢組織内で周囲の微少環境に応じて成熟肥満細胞へと分化すると考えられている (Tshori and Nechushtan., 2012)。しかしながら、近年、Fate mapping model による解析では、皮膚の肥満細胞は、yolk sac 由来の細胞、および aorta-gonad-mesonephros (AGM) 由来の HSCs が胎生期に皮膚に移動し、皮膚に局在し 長い寿命を持つ肥満細胞前駆細胞から、種々の因子によ

って機能的に成熟した肥満細胞へと分化することが明らかとなっている (Dahlin and Hallgren, 2015)。

最終的に成熟した肥満細胞は、ヒトでは Tryptase を含む MC_T と Tryptase と chymase のいずれも多く含む MC_{TC} に分類される (Irani et al., 1986)。一方でマウスでは肥満細胞の分類は肥満細胞の存在部位によって 2 種類に分類されており、主に皮膚などの結合組織に存在するものを結合組織型肥満細胞 (CTMC)、肺や腸管の粘膜層に存在するものを粘膜型肥満細胞 (MMC) としている (Enerbäck, 1974)。またマウスの肥満細胞は顆粒中のプロテオグリカンの種類が異なっており、CTMC では主にヘパリンを、MMC ではコンドロイチン硫酸を含んでいる (Seldin et al., 1985; Razin et al., 1983)。このため、マウス CTMC および MMC では、アルシアンブルー (AB) -サフラニン O (SO) 染色によって細胞質内顆粒は異なって染色性を示し、CTMC は SO 陽性顆粒を優位に、MMC は AB 陽性顆粒を優位に含んでいることが明らかとなっている。さらに、CTMC においては、未成熟な CTMC は AB 陽性顆粒を優位に含んでいるが、成熟するに従って SO 陽性顆粒が増加していき、成熟 CTMC では SO 陽性顆粒が優位となる (Scott et al., 1964)。

成熟肥満細胞は様々な顆粒を生成しており、主に IgE の Fc 受容体への結合によって顆粒の分泌 (脱顆粒) が引き起こされる (Okayama et al., 2008)。近年、脱顆粒に関連して発現する GTP 結合タンパクサブタイプの

Gai1 肥満細胞の顆粒内には、ヒスタミンやセロトニンなどのアミンやサイトカインが含まれているが、さらに肥満細胞特異的なプロテアーゼである Tryptase や chymase、カルボキシペプチダーゼ A3 など存在する (Pejler et al., 2007; 2010; Lundquist et al., 2011)。Tryptase は活性化した肥満細胞によって分泌される肥満細胞特異的なトリプシン様セリンプロテアーゼであり、細胞外マトリックスのプロメタロマトリックスプロテアーゼの活性化 (Gruber et al., 1989)、受容体であるプロテアーゼ活性化受容体 (PAR-2) を介した肺線維芽細胞 (Akers et al., 2000) やヒトの真皮内線維芽細胞の増殖、および I 型コラーゲンの産生の促進 (Abe et al., 1998) など

の作用が報告されている。ヒト Tryptase には α 、 β 、 γ があり、単量体の α -Tryptase と β -Tryptase は細胞外に分泌される。一方でヘパリンによって四量体を形成する β -Tryptase は細胞質の分泌顆粒内に貯蔵され肥満細胞が活性化されると分泌され、活性のある Tryptase である。 γ -Tryptase は分泌顆粒の膜を支持するプロテアーゼであり、肥満細胞活性化時に細胞膜に移動する (Caughey, 2006)。マウスにおいてヒト β -Tryptase と同等であるとされるのがマウス (m) MCP-6 と mMCP-7 であり、mMCP-6、mMCP-7 mRNA 発現は CTMC に特徴的である (Reinolds et al., 1991)。MMC においては、mMCP-2 mRNA 発現が認められる (Serafin et al., 1990)。活性化することで分泌される MC Tryptase を含有し、脱顆粒能を呈する肥満細胞は機能的に成熟していると考えられる。

第 2 章において、血管内皮増殖因子 (VEGF)-A および VEGF-A 受容体である Flk-1 の発現が、MCT の悪性度と関連があったことから、VEGF-A および Flk-1 が MCT 細胞を悪性形質を示す未成熟な状態に維持させている可能性が示唆される。

このため、本章では、VEGF-A と Flk-1 の発現と MCT 細胞の分化・成熟との関連性を明らかにする目的で、肥満細胞の細胞質内顆粒の特性、肥満細胞の脱顆粒に関連して発現する GTP 結合タンパク Gai1 の発現、および機能的に成熟した肥満細胞が産生する MC Tryptase の発現と、VEGF-A および Flk-1 の発現との関連について検索した。

3-2 材料と方法

3-2-1 病理組織切片の作製

第2章で使用した正常のイヌの皮膚およびMCT症例の切片を使用した。

3-2-2 AB-SO 染色

切片を脱パラフィン後、水洗し、2分間3%酢酸を通してから1% AB/3%酢酸液(pH 2.5)で30分間染色した。その後3%酢酸で染色液を落としてから、水洗し、0.1N SO染色液で10分間染色した。その後水洗、脱水、透徹後に封入した。

3-2-3 Gai1 およびMC Tryptase 免疫組織化学

第2章と同様の方法で免疫組織化学を行った。各抗体の条件はTable 3に示した。

3-2-4 統計解析

AB-SO染色、Gai1 およびMC Tryptase の発現と病理組織学的分類、c-Kit pattern 分類、細胞分裂像、および増殖能との関連性を χ^2 検定によって検索した。また、AB-SO染色、Gai1 およびMC Tryptase の発現とVEGF-A およびFlk-1との発現の関連性を χ^2 検定によって検索した。

Table 3. 使用抗体希积倍率

Antibody	Blocking	Host species	Dilution	Supplier	Article No.
Anti-Gαi1	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:500	ABCAM, Cambridge, U.K.	ab228623
Anti-MC Tryptase	2% Block Ace	Mouse, monoclonal	1:200	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-59587

3-3 結果

3-3-1 AB-SO 染色、Gai1 および MC Tryptase の発現と病理組織学的分類

イヌの皮膚肥満細胞は AB-SO 染色によって AB 優位 (AB>SO) および SO 優位の染色性 (AB<SO) の両方が認められた (Fig. 3-1)。

MCT を AB-SO 染色によって染色したところ、非染色性 (Negative)、AB>SO、および AB<SO の染色性が認められた (Fig. 3-2)。

AB-SO 染色による分類を病理組織学的分類、および c-Kit pattern 分類との関連を解析したところ、イヌ皮膚 MCT では Patnaik 分類の GradeIII で、I および II と ($p<0.05$)、Kiupel 分類では High-grade ($p<0.05$) で、AB>SO および Negative の染色性が有意であった。また核分裂像が多い症例においては、Negative な染色性が有意に認められた (Table 3-1)。一方で、皮下 MCT においては、AB-SO 染色に対する関連は認められなかった (Table 3-2)。

また、Gai1 および MC Tryptase の発現と病理組織学的分類の関連について解析したところ、皮膚 MCT、皮下 MCT いずれも発現と悪性度との関連は認められなかった (Table 3-3、3-4)。

3-3-2 AB-SO 染色、MC Tryptase、および Gai1 発現と VEGF-A および受容体の発現

イヌ皮膚 MCT 122 症例は、AB<SO が 38 症例 (31.1%)、AB>SO が 42 症例 (34.4%)、Negative が 15 症例 (12.2%) であった。AB<SO 症例で、VEGF-A 陽性は 5 症例 (13.2%)、Flt-1 陽性は 3 症例 (7.9%)、Flk-1 陽性は 9 症例 (23.7%)、VEGF-A および Flk-1 共発現 (VEGF-A/Flk-1) 陽性は 1 症例 (2.6%) であった。AB>SO 症例で、VEGF-A 陽性は 17 症例 (40.5%)、Flt-1 陽性は 5 症例 (11.9%)、Flk-1 陽性は 26 症例 (61.9%)、VEGF-A/Flk-1 共発現陽性は 15 症例 (35.7%) であった。Negative 症例で、VEGF-A 陽性は 7 症例 (46.7%)、Flt-1 陽性は 4 症例 (26.7%)、Flk-1 陽性は 9 症例 (60.0%)、VEGF-A/Flk-1 共発現陽性は 5 症例 (33.3%) であった。VEGF-A、Flk-1 発現、お

よび VEGF-A/Flk-1 共発現はいずれも AB>SO および Negative の症例において、AB<SO 症例よりも有意に発現が認められた (Table 3-5)。

正常皮膚肥満細胞および MCT 細胞において、MC Tryptase 免疫反応は細胞質内に顆粒状に、Gai1 の免疫反応は細胞膜上に認められた (Fig. 3-1、3-2)。118 症例のうち MC Tryptase 陽性は 42 症例であり、かつ VEGF-A 発現は 13 症例 (31.0%)、Flt-1 発現は 8 症例 (19.0%)、Flk-1 発現は 17 症例 (40.5%) であり、MC Tryptase と VEGF-A および受容体の発現に関して関連は認められなかった (Table 3-5)。

110 症例のうち Gai1 陽性は 46 症例であり、あり、かつ VEGF-A 発現は 6 症例 (13.0%)、Flt-1 発現は 4 症例 (8.7%)、Flk-1 発現は 16 症例 (34.8%) であった。Gai1 の発現と VEGF-A および Flk-1 発現の統計学的解析では、Gai1 発現が陰性である場合、VEGF-A および Flk-1 の発現が陽性である傾向が認められた (VEGF-A、 $p<0.005$; Flk-1、 $p<0.05$) (Table 3-5)。

また、皮下 MCT においては、AB-SO 染色、MC Tryptase、および Gai1 発現と VEGF-A および受容体の発現の関連は認められなかった (Table 3-6)。

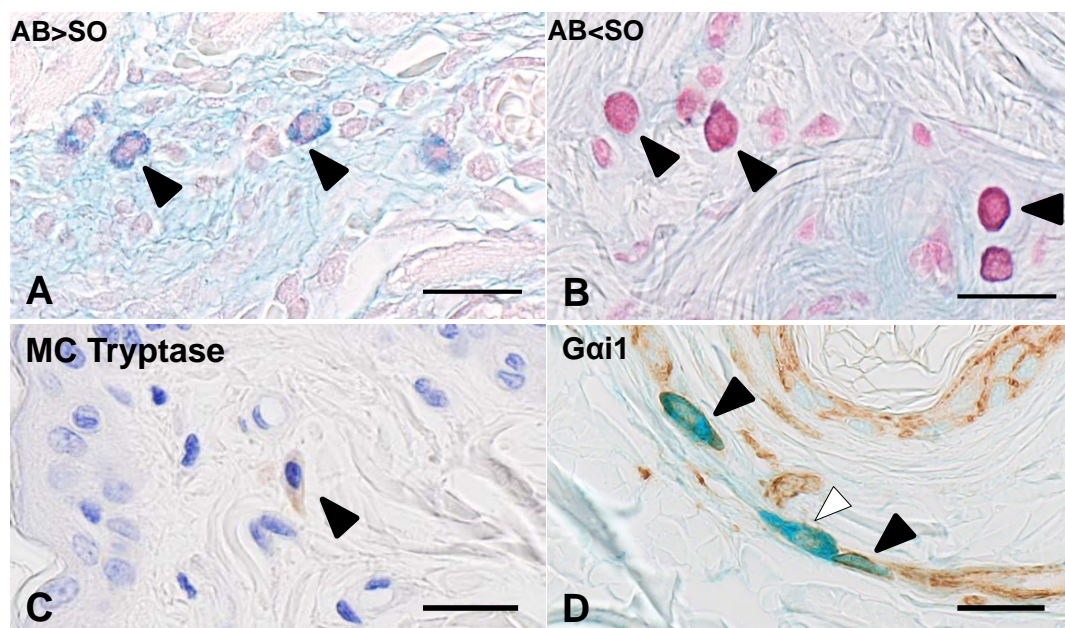


Figure 3-1 正常イヌの皮膚肥満細胞のAB-SO染色

正常イヌの皮膚肥満細胞ではAB>SO、AB<SO肥満細胞の両方が認められる。

A: AB>SO肥満細胞(黒矢頭)。

B: AB<SO肥満細胞(黒矢頭)。

C: MC Tryptase陽性肥満細胞(黒矢頭)。

D: Gai1陽性肥満細胞(黒矢頭)とGai1陰性肥満細胞(白矢頭)。

(スケールバー:20 μ m)

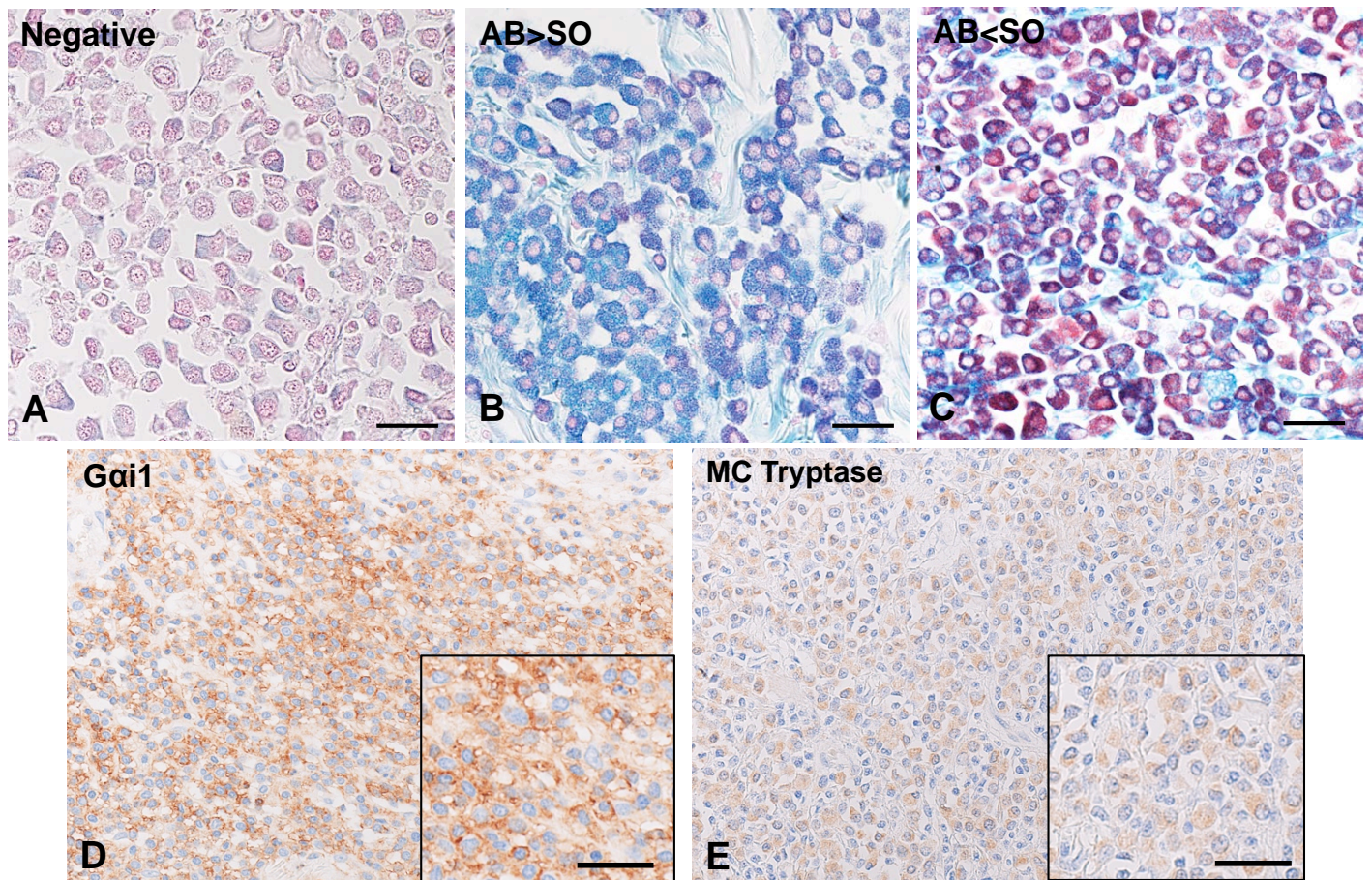


Figure 3-2 MCTのAB-SO染色、Gai1およびMC Tryptase免疫組織化学
 MCTのAB-SO染色ではNegative、AB>SO、AB<SOの3種類の染色性が認められた。
 腫瘍内におけるMCT細胞の60%が示す染色性をその症例の染色性とした。

A: Negative MCT細胞。

B: AB>SO MCT細胞。

C: AB<SO MCT細胞。

D: Gai1免疫組織化学。MCT細胞の細胞膜が染色される。

E: MC Tryptase免疫組織化学。MCT細胞の細胞質内に顆粒状に染色される。

(A-Eのスケールバー:50μm)

Table 3-1 イヌ皮膚MCTにおけるAB-SO染色と病理組織学的分類

		AB-SO staining			
		N	AB<SO (%)	AB>SO (%)	Negative (%)
Patnaik分類	I	8	4 (50.0)	4 (50.0)	0 (0.0)
	II	66	31 (47.0)	26 (39.4)	9 (13.6)
	III	21	3 (14.3)	12 (57.1) ^a	6 (28.6) ^{b, c}
Kiupel分類	Low	65	31 (47.7)	28 (43.1)	5 (7.7)
	High	27	4 (14.8)	14 (51.9) ^d	10 (37.0) ^e
Mitotic figures	0≤N<7	75	36 (48.0)	34 (45.3)	5 (6.7)
	7≤N	20	2 (10.0)	8 (40.0)	10 (50.0) ^f
c-Kit pattern	I	27	13 (48.2)	11 (40.7)	3 (11.1)
	II	59	23 (39.0)	26 (44.1)	10 (17.0)
	III	9	2 (22.2)	5 (55.6)	2 (22.2)
Ki67	0	18	7 (38.9)	8 (44.4)	3 (16.7)
	0<N<30	37	17 (46.0)	17 (46.0)	3 (8.1)
	30≤N	16	4 (25.0)	9 (56.2)	3 (18.8)
PCNA	0	19	7 (36.8)	9 (47.4)	3 (15.8)
	0<N<5	50	25 (50.0)	20 (40.0)	5 (10.0)
	5≤N	26	6 (23.1)	13 (50.0)	7 (26.9) ^g

a: p<0.05 vs Grade II, b: p<0.05 vs Grade I, c: p<0.01 vs Grade II, d: p<0.05 vs Low-grade, e: p<0.001 vs Low-grade, f: p<0.001 vs 0≤N<7, g: p<0.05 vs 0<N<5

Table 3-2 イヌ皮下MCTにおけるAB-SO染色と病理組織学的分類

		AB-SO staining			
		N	AB<SO (%)	AB>SO (%)	Negative (%)
Mitotic figures	0≤N<7	7	5 (71.4)	1 (14.3)	1 (14.3)
	7≤N	1	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
c-Kit pattern	I	4	4 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	II	4	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)
	III	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ki67	0	2	2 (100.0)	8 (44.4)	3 (16.7)
	0<N<3 0	3	2 (66.7)	0 (0.0)	1 (33.3)
	30≤N	2	0 (0.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
PCNA	0	3	2 (66.7)	0 (0.0)	1 (33.3)
	0<N<5	5	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
	5≤N	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Table 3-3 イヌ皮膚 MCTにおけるGai1およびMC Tryptaseの発現と病理組織学的分類

		N	Gai1(%)	N	MC Tryptase (%)
Patnaik分類 (Grade)	I	11	7 (63.6)	13	5 (38.5)
	II	78	33 (42.3)	85	31 (36.5)
	III	21	6 (28.6)	20	6 (30.0)
Kiupel分類	Low	82	35 (42.7)	91	33 (36.3)
	High	28	11 (40.7)	27	9 (33.3)
Mitotic figures	0≤N<7	64	38 (59.3)	28	37 (37.8)
	7≤N	7	7 (100.0)	81	5 (25.0)
c-Kit pattern	I	26	11 (42.3)	9	10 (35.7)
	II	75	32 (42.7)	98	24 (29.6)
	III	9	5 (55.6)	20	5 (55.6)
Ki67	0	28	8 (28.6)	29	5 (25.0)
	0<N<30	36	20 (55.5)	38	14 (48.3)
	30≤N	13	5 (38.5)	51	11 (21.6)
PCNA	0	18	3 (16.7)	23	10 (43.5)
	0<N<5	60	32 (53.3)	62	18 (29.0)
	5≤N	30	11 (36.7)	32	14 (43.8)

Table 3-4 イヌ皮下MCTにおけるGai1およびMC Tryptaseの発現と病理組織学的分類

		N	Gai1(%)	N	MC Tryptase(%)
Mitotic figures	0≤N<7	9	6 (66.7)	10	3 (30.0)
	7≤N	2	3 (100.0)	3	0 (0.0)
c-Kit pattern	I	4	3 (75.0)	5	2 (40.0)
	II	7	5 (71.4)	8	1 (12.5)
	III	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)
Ki67	0	3	2 (66.7)	4	2 (50.0)
	0<N<30	4	3 (75.0)	4	0 (0.0)
	30≤N	3	2 (66.7)	3	0 (0.0)
PCNA	0	3	3 (100.0)	4	2 (50.0)
	0<N<5	6	4 (66.7)	6	1 (16.7)
	5≤N	2	1 (50.0)	3	0 (0.0)

Table 3-5 イヌ皮膚MCTにおけるAB-SO染色、Gai1、およびMC Tryptaseの発現とVEGF-Aおよび受容体の発現症例数

		N	VEGF-A(%)	Flt-1(%)	Flk-1(%)	VEGF-A/ Flk-1(%)
AB-SO staining	AB<SO	38	5 (13.2)	3 (7.9)	9 (23.7)	1 (2.6)
	AB>SO	42	17 (40.5) ^a	5 (11.9)	26 (61.9) ^c	15 (35.7) ^c
	Negative	15	7 (46.7) ^b	4 (26.7)	9 (60.0) ^d	5 (33.3) ^e
Gai1	(+)	46	6 (13.0)	4 (8.7)	16 (34.8)	3 (6.5)
	(-)	64	24 (37.5) ^f	7 (10.9)	35 (54.7) ^g	19 (29.7)
MC Tryptase	(+)	42	13 (31.0)	8 (19.0)	17 (40.5)	7 (16.7)
	(-)	76	19 (25.0)	6 (7.9)	34 (44.7)	14 (18.4)

a: p<0.01 vs AB<SO, b: p<0.01 vs AB<SO, c: p<0.001 vs AB<SO, d: p<0.05 vs AB<SO, e: p<0.005 vs AB<SO, f: p<0.005 vs Gai1(+), g: p<0.05 vs Gai1(+)

Table 3-6 イヌ皮下MCTにおけるAB-SO染色、Gai1、およびMC Tryptaseの発現とVEGF-Aおよび受容体の発現症例数

		N	VEGF-A(%)	Flt-1(%)	Flk-1(%)	VEGF-A/ Flk-1(%)
AB-SO staining	AB<SO	5	1 (20.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
	AB>SO	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Negative	2	2 (100.0)	2 (100.0)	2 (100.0)	2 (100.0)
Gai1	(+)	8	4 (50.0)	2 (25.0)	3 (37.5)	3 (37.5)
	(-)	3	1 (33.3)	0 (0.0)	1 (33.3)	1 (33.3)
MC Tryptase	(+)	2	1 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	(-)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

3-4 考察

本章の結果、イヌの皮膚 MCT において、病理組織学的分類で高悪性度の症例で、有意に AB>SO および AB-SO Negative の染色性を示していたことから、高悪性度の MCT は、腫瘍細胞が未成熟で分化段階の低い腫瘍細胞が多いことが示された。さらに、VEGF-A および Flk-1 を発現している MCT は、AB>SO および AB-SO Negative MCT に有意に多く認められた。このため、VEGF-A および Flk-1 は、未成熟な肥満細胞と類似の形質を示す悪性度の高い MCT において発現していることが示唆された。さらに、Gai1 の発現は、VEGF-A および Flk-1 の発現を示さない症例に有意に多く認められた。Gai1 は、肥満細胞において脱顆粒に関連する G タンパク質であることが報告されており、また培養肥満細胞においては分化・成熟の進行と共に発現が増加することが報告されている (Takano et al., 2004)。以上の結果から、VEGF-A、および Flk-1 を発現する肥満細胞は脱顆粒能が低い未成熟な分化段階の肥満細胞の特性を有しているものと考えられた。このため、VEGF-A および Flk-1 は、MCT 細胞の分化・成熟を抑制し、MCT 細胞を未成熟な状態に維持している可能性が示唆された。

Kiupel ら (2004) は、イヌ MCT において、MC Tryptase の発現と局所再発や致死率の増加などの MCT の生物学的挙動との間に関連性はないことを報告している。今回、我々の検索においても MC Tryptase の発現と VEGF-A および Flk-1 の発現や AB-SO 染色のパターンとの関連性は認められなかった。ヒト骨関節炎において、軟骨細胞では Tryptase 受容体 PAR-2 を高発現しており (Xiang et al., 2006)、Tryptase を添加することによって VEGF の産生が上昇することが報告されている (Masuko et al., 2007)。さらにヒト線維芽細胞において PAR-2 の発現が報告されている (Aker et al., 2000; Gruber et al., 2004)。第 2 章において、VEGF-A 陰性症例においても間質細胞での VEGF-A の発現が認められたことから、Tryptase が MCT 内の間質細胞に作用することによって間質細胞での VEGF-A 発現を増強しているのかもしれない。一方で Tryptase には線維芽細胞からのコラーゲン I の産生を促進する作用も報告されている (Abe et al., 1998) ことから、MCT 内での線維化に関与している可能性も

示唆される。しかし、このような機能に関しては、MCT 間質内に存在する細胞のより詳細な研究が必要である。

本章において、第2章で明らかとなった VEGF-A および Flk-1 を発現している MCT 細胞の分化度について検索した。MCT の AB-SO 染色の結果から、悪性度の高い MCT 細胞においては分化・成熟度が低下しており、かつ VEGF-A および Flk-1 の発現と分化・成熟度と関連していたことから、VEGF-A および Flk-1 発現 MCT 細胞は未成熟な分化段階の肥満細胞の性質を保持している可能性が示唆される。さらに VEGF-A および Flk-1 がその未成熟な性質の維持に関与している可能性が考えられた。

第4章 発生過程の皮膚肥満細胞における血管内皮増殖因子 (VEGF-) A およびその受容体の発現

4-1 小序

第2章でイヌの正常皮膚肥満細胞においては、血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) は細胞質内に、VEGF 受容体 2 (Flk-1) は核内に発現していることが明らかになった。一方で悪性度の高い肥満細胞腫 (MCT) 細胞では、いずれも細胞質内と核内の両方で発現が認められた。これらの発現部位の違いについては細胞が腫瘍化することによってその局在が変化することが示唆される。腫瘍細胞は正常な細胞と比較して、未成熟もしくは未分化な状態であることが明らかになっており (Abhimanyu, 2017)、第3章のアルシアンブルー (AB) -サフラニン O (SO) 染色によって、MCT 細胞も同様に高悪性度の症例の腫瘍細胞では未成熟な肥満細胞の性状を示すことが明らかとなり、さらに VEGF-A/Flk-1 シグナリングが MCT 細胞を未成熟な状態に維持している可能性が示唆された。

しかし、発生過程の皮膚肥満細胞の分化・成熟過程における VEGF-A およびその受容体 (Flk-1, Flt-1) の発現、およびその関与については、未だに明らかになっていない。

このことから本章において、ラットの発生段階における皮膚肥満細胞での VEGF-A およびその受容体の発現を免疫組織化学によって検索した。さらにラットの発生段階に伴う皮膚皮膚肥満細胞の分化・成熟過程における AB-SO 染色による顆粒の染色性の違い、c-Kit、MC Tryptase、および Ki67 の発現について検索した。

4-2 材料と方法

4-2-1 供試動物

本章における動物実験は全て日本獣医生命科学大学動物実験委員会の承認を（承認番号: 2019-44）を得て行った。Wistar rat メスのスメアにおいて精子が確認された日を妊娠 0 日 (E0) とし、E13~20 までの胎子および出生後 1、7、14、28、60、90 日齢 (Day 1~90) の頸部から背部の皮膚を採材し、4%パラホルムアルデヒド/0.1M PB で一晩固定した。その後、定法に従ってパラフィン包埋し、それぞれ 3 μ m の切片を作製した。

4-2-2 アルシアンブルー (AB) 染色

全ての切片は脱パラフィン後、水洗後、2 分間 3%酢酸を通した後、1%アルシアンブルー/3%酢酸液で 30 分間染色を行なった。その後、余分な AB を 3%酢酸で落としてから、水洗した。さらに脱水、透徹後に封入した。

各胎齢および日齢のそれぞれ 4 標本を用いて、真皮 1mm²内に認められる AB 陽性 MC を 10 視野カウントし、平均値および標準偏差を算出した。

4-2-3 アルシアンブルー (AB) -サフラニン O (SO) 染色

第 3 章 3-2-2 に記載した同様の方法によって染色を行なった。MC はその顆粒の染色性によって、AB>SO (AB 染色優位)、AB=SO (AB 染色、SO 染色同程度)、AB<SO (SO 染色優位) に分類した (Figure. 4-1-A~C)。各胎齢および日齢のそれぞれ 3 標本を用いて 100 個の AB あるいは SO 陽性 MC 中の AB>SO、AB=SO および AB<SO の個数をカウントし、4 標本の平均値および標準偏差を算出した。

4-2-4 c-Kit、MC Tryptase、Ki67、VEGF-A、Flk-1、および Flt-1 免疫組織化学

発色までは第 2 章 2-2-5 と同様の免疫組織化学の方法で行い、水洗後 2 分間 3%酢

酸を通してから 1%アルシアンブルー/3%酢酸液で 10 分間染色し、肥満細胞を検出した。使用した抗体や条件に関しては、Table 4 に示した。

各胎齢および日齢のそれぞれ 4 標本を用いて 100 個の AB 陽性 MC 中の免疫組織化学陽性細胞をカウントし、4 標本の平均値および標準偏差を算出した。

4-2-5 統計学的解析

AB 染色、AB-SO 染色、および免疫組織化学の定量的解析結果は、one-way ANOVA および Tukey's post hoc テストによって統計学的処理を行い、 $P < 0.05$ を示した場合に、統計的に有意差ありと評価した。

Table 4. 使用抗体希釈倍率

Antibody	Blocking	Host species	Dilution	Supplier	Article No.
Anti-c-Kit	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:500	Agilent, Santa Clara, CA., U.S.A.	A4502
Anti-VEGF-A	5% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:100	Cloud-Clone, Katy, TX., U.S.A.	LAA143Ca71
Anti-Flk1	4% Block Ace	Mouse, monoclonal	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-393163
Anti-Flt1	4% Block Ace	Rabbit, polyclonal	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-316
Anti-MC Tryptase	10% goat serum	Mouse, monoclonal	1:500 (1:100)*	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-59587
Anti-Ki67	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:500	ABCAM, Cambridge, U.K.	ab15580

*0内は蛍光免疫組織化学での条件

4-3 結果

4-3-1 AB-SO 染色による肥満細胞 (MC) の検出および数の計測

E16 以降の皮膚において AB 陽性 MC が認められた。また、AB 染色された MC の総数をカウントしたところ、E16 から Day 14 までは数は増えていき、その後減少した。AB-SO 染色での染色性によって、発生段階での肥満細胞に対する割合を表に示した。Day1 まではほぼ全ての MC が AB>SO を示し、その後 D7 から AB=SO および AB<SO を示す MC が増加していった (Figure 4-1-D および E)。

4-3-2 皮膚肥満細胞 (MC) における c-Kit、MC Tryptase および Ki67 の発現

c-Kit の発現は AB 陽性 MC 全てで認められた。また MC Tryptase 陽性 MC は E17 から増加し、E19 以降はほとんどの MC においてその発現が認められた。

その一方で、Ki67 陽性 MC は E17 から Day 21 まで増加していき、その後減少した (Figure 4-2)。

4-3-3 皮膚肥満細胞 (MC) 発生段階における Flk-1 および Flt-1 の発現

VEGF-A を発現する MC は全ての胎齢および日齢で認められたが、その発現細胞数はわずかであった。Day 14 において、Flk-1 との蛍光二重免疫組織化学を行なったところ、VEGF-A/Flk-1 を共発現する MC と Flk-1 のみ発現する MC が認められたが、VEGF-A のみを発現する MC は認められなかった (Fig. 4-3、4-4)。

Flk-1 発現 MC は E17 から Day 90 まで認められたが、特に Flk-1 発現 MC 数は E20 から Day 28 において多かった。さらに Flk-1 の MC 内発現部位について、細胞質のみ (cytFlk-1) の MC と核内および細胞質内の両方で発現 (nuc/cytFlk-1) している MC について検索したところ、cytFlk-1 MC は E20 から増加し、Day 28 まで Flk-1 発現 MC の過半数を占めていた。しかし Day 60 および 90 では Flk-1 発現 MC 減少に伴って減少した。一方で、nuc/cytFlk-1 MC は E19 から増加し、Day21 まで

およそ 30%の割合で認められ、Day 28 に一気に減少し、Day 60 および 90 でも同程度の割合存在した。また核内および細胞質内の Flk-1 の発現は、Day 1 から 21 までの皮膚 MC の Flk-1 と c-Kit の蛍光二重免疫組織化学によって確認した (Figure 4-3)。

Flt-1 発現 MC 数は E19 から Day 90 まで認められた。Flk-1 と同様に Flt-1 も MC 細胞質内のみ (cytFlt-1)、もしくは核内および細胞質内両方 (nuc/cytFlt-1) と MC 内での発現局在の違いが認められた。E19 から Day14 までは cytFlt-1 MC が Flt-1 発現 MC の過半数を占めていたが、Day21 および 28 では nuc/cyt Flt-1 MC の割合が多くなっていた。しかしその後、Day 60 および 90 では減少した。蛍光二重免疫組織化学によって、E19 から Day90 において MC Tryptase 発現 MC が Flt-1 を発現していることが明らかとなった。さらに Day 1 から 28 では cytFlt-1 MC および nuc/cytFlt-1 が明らかに認められた (Figure 5)。

さらに Flk-1 および Flt-1 の蛍光二重免疫組織化学を行ったところ、Day1 から 28 までの AB 染色陽性 MC において Flk-1 および Flt-1 の共発現が認められた。これらの共発現部位は、核内および細胞質内両方で認められた。しかし、Day28 の Flk-1/Flt-1 共発現 MC においては、Flk-1 は細胞質内に限局していた。

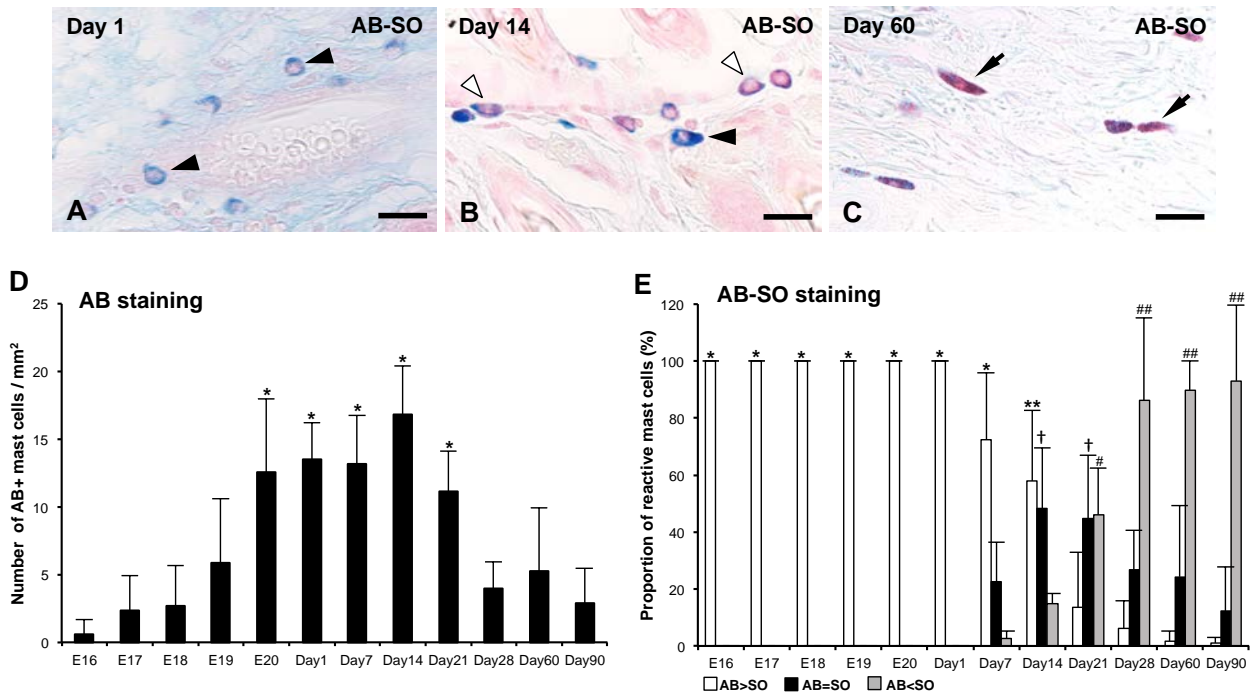


Figure 4-1 皮膚MCの総数およびAB-SO染色による分類

A: AB>SO MCのみがDay 1で認められた。

B: AB>SO、AB=SO MCがDay 14で認められた。

C: AB<SO MCが認められた。

(A-Cのスケールバー: 20μm)

D: 皮膚1mm²に認められた皮膚MCのE16からDay 90までの数。

E: AB>SO、AB=SO、AB<SO MCのE16からDay 90までの割合 (平均±SD)。

* $p < 0.001$ vs Days 7-21; ** $p < 0.001$ vs Days 21-90; † $p < 0.001$ vs Days 1 and 90;

$p < 0.001$ vs Days 7; ## $p < 0.001$ vs Days 7 and 14。

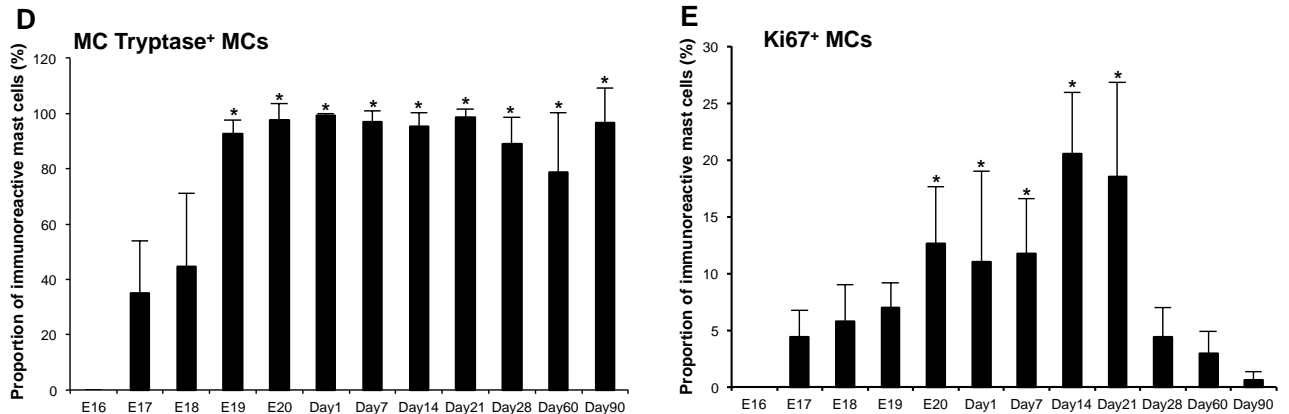
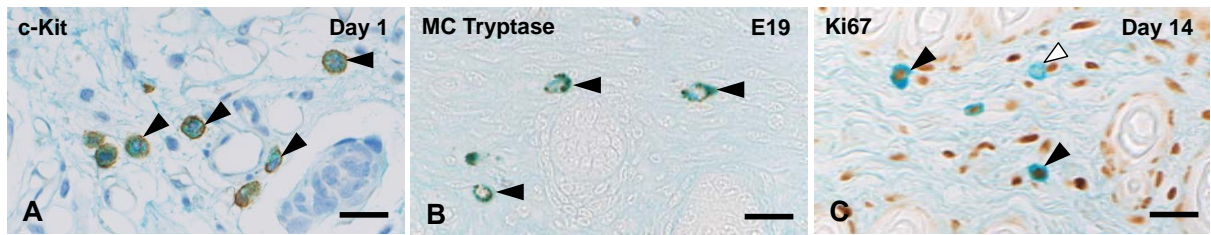


Figure 4-2 c-Kit、MC Tryptase、Ki67によるMCの免疫組織化学

A: c-Kitの免疫反応は、Day 1のすべてのAB陽性MCの細胞膜または細胞質において、認められる（黒矢頭）。

B: MC Tryptase免疫反応は、E19すべてのAB陽性MCの細胞質において、認められる（黒矢頭）。

C: Ki67免疫反応は、Day 14の一部のMCの核内において認められる（黒矢頭）。白矢頭はKi67陰性MCを示している。

(A-Cのスケールバー: 20 μ m)

D: E16からDay 90までのMC Tryptase陽性MC数の割合（平均 \pm SD）を示す。

* $p < 0.001$ vs E17 and 18。

E: E16からDay 90までのKi 67陽性MC数の割合（平均 \pm SD）を示す。* $p < 0.001$ vs E17 and Days 28-90。

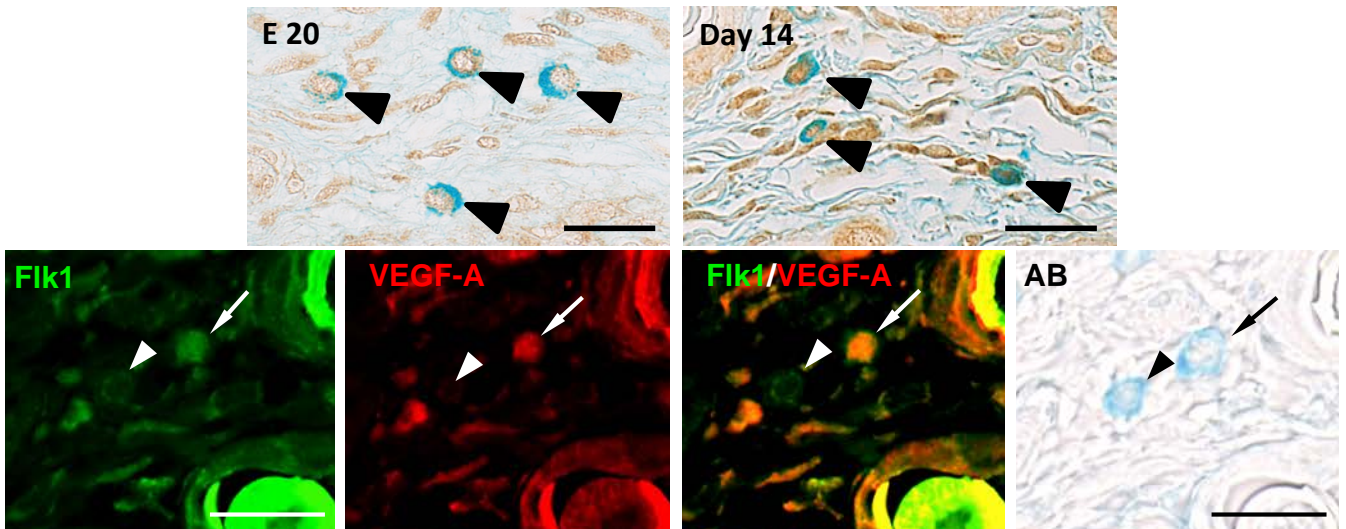


Figure 4-3 皮膚MCにおけるVEGF-A免疫組織化学
 VEGF-Aの発現は全ての胎齢および日齢において、少数のMCにおいて認められる（黒矢頭）。いずれの胎齢および日齢において、VEGF-A免疫反応は皮膚MCの核内もしくは核膜上に認められる。

A-D: VEGF-AおよびFlk-1蛍光二重免疫組織化学

A-C: Day 14 MCにおいて、核/細胞質内Flk-1（緑）と核内VEGF-A（赤）の共発現（白矢印）、もしくは細胞質内Flk-1のみの発現認められる（白矢頭）。

D: Day 14 MCはAB染色によって検出し、色の異なる矢頭および矢印は、それぞれ同じ細胞を示している。

（スケールバー: 20 μ m）

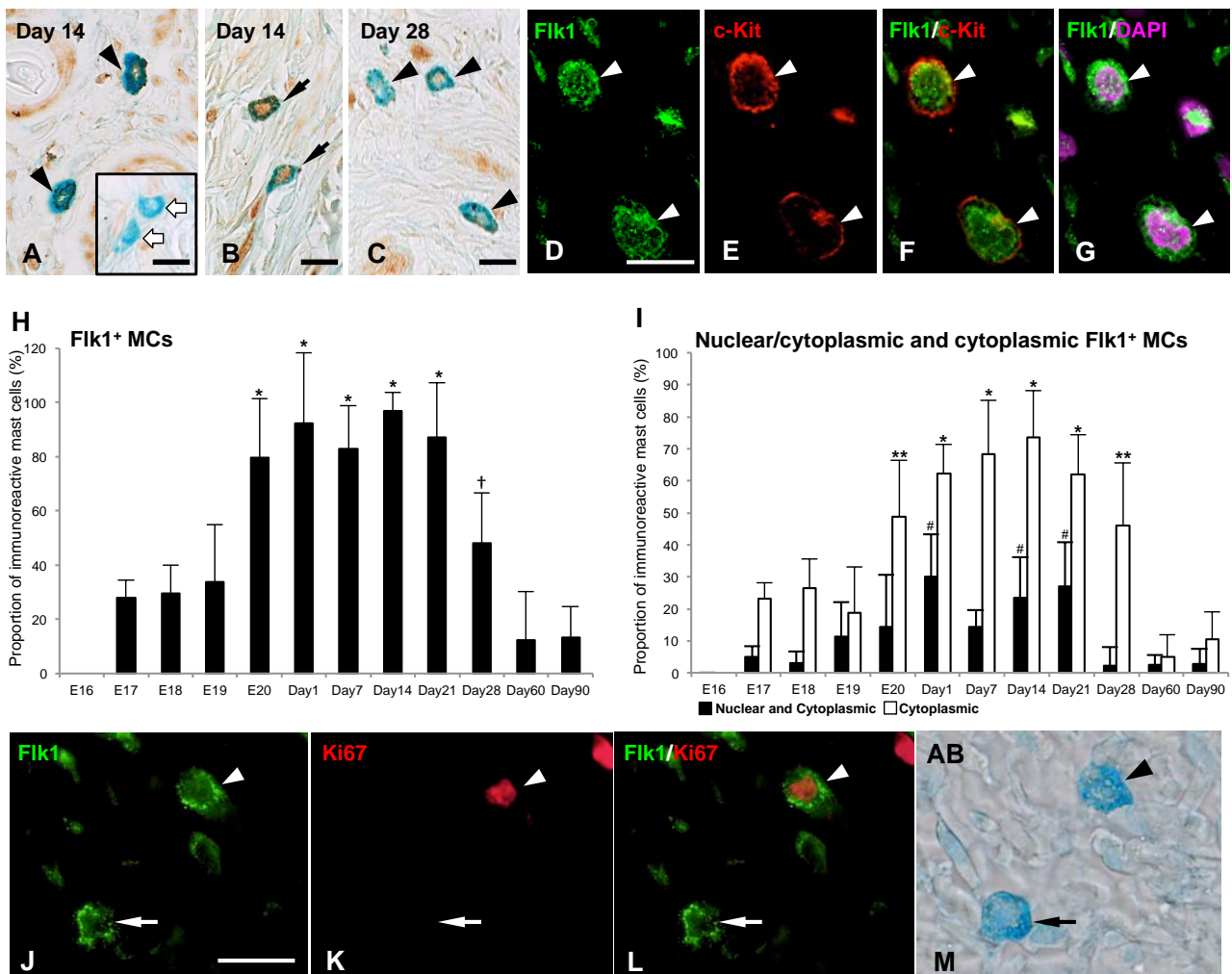


Figure 4-5 皮膚MCにおけるFlk-1免疫組織化学

A, B: Flk-1の免疫反応は、Day 14のMCの核および細胞質（黒矢印）、または細胞質のみ（黒矢頭）に認められる。白矢印はFlk-1陰性MCを示している。
 C: Flk-1免疫反応は、Day 28 MCでは細胞質にのみ認められる。
 D-G: Flk-1（緑）とc-Kit（赤）の蛍光二重免疫組織化学によって、Day 14 c-Kit陽性MCでのFlk-1の発現（D-F）、およびc-Kit陽性MCにおける核内および細胞質でのFlk-1の発現（G; Flk-1:緑、核:マゼンダ）が認められる。
 H: E16からDay 90までのFlk-1陽性MC数の割合（平均±SD）。* $p < 0.001$ vs E17-19 and Days 60-90; † $p < 0.001$ vs Days 60-90。
 I: E16からDay 90までの核および細胞質内、または細胞質内のみFlk-1陽性MC数の割合（平均±SD）。* $p < 0.001$ vs E17-19 and Days 60-90; ** $p < 0.001$ vs Days 60-90; # $p < 0.001$ vs E19-Day 14 and Days 28-90。
 J-M: Flk-1（緑）およびKi67（赤）の蛍光二重免疫組織化学によって、Flk-1およびKi67共発現MCが認められる。MCはAB染色で検出（M）。
 (A-G、J-Kのスケールバー: 20 μ m)

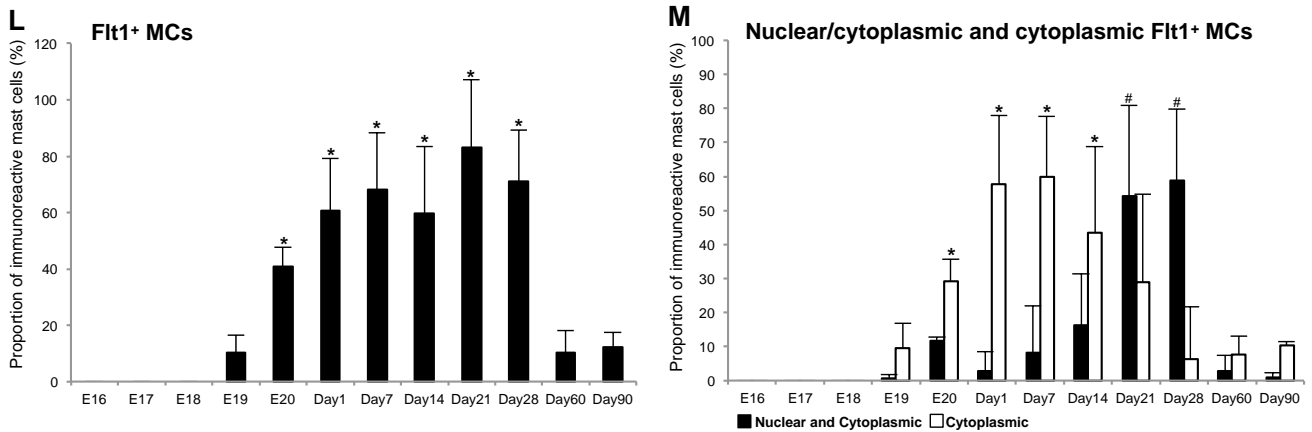
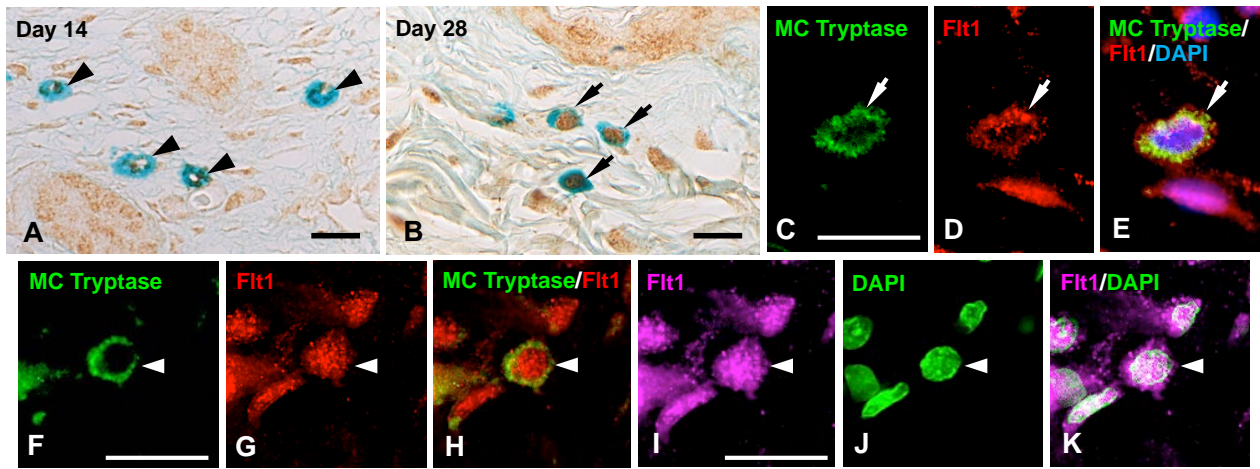


Figure 4-6 皮膚MCにおけるFlt-1免疫組織化学

A: Day 14 MCではFlt-1免疫反応は細胞質にのみ認められる (黒矢頭)。
 B: Day 28 MCではFlt-1免疫反応は核と細胞質の両方で認められる (黒矢印)。
 C-E: MC Tryptase (緑) とFlt-1 (赤) の蛍光二重免疫組織化学によって、Day 14 MC Tryptase陽性MCで細胞質内にFlt-1の発現が認められる。
 F-K: MC Tryptase (緑) とFlt-1 (赤) の蛍光二重免疫組織化学によって、Day 28 MC Tryptase陽性MCでのFlt-1の発現が認められる。MC Tryptase陽性MCにおいて、Flt-1の発現が細胞質内 (H; 黄)、および核内 (K; 白) に局在している (白矢頭)。

(A-Kのスケールバー: 20μm)

L: E16からDay 90までのFlk-1陽性MC数の割合 (平均±SD)。 * $p < 0.001$ vs E19 and Days 60-90。

M: E16からDay 90までの核および細胞質内、または細胞質内のみFlk-1陽性MC数の割合 (平均±SD)。 * $p < 0.001$ vs E19 and Days 28-90; # $p < 0.001$ vs E19-Day 7 and Days 60-90。

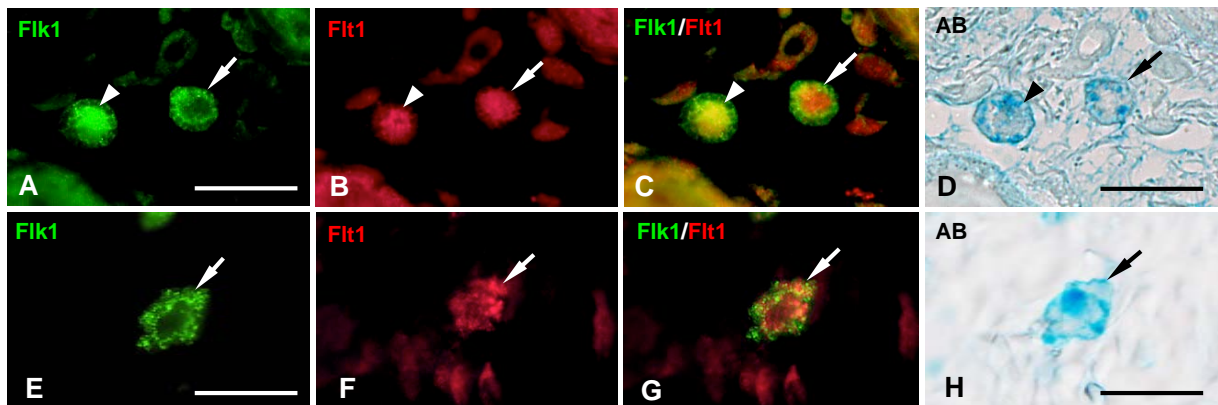


Figure 4-7 Flk-1およびFlt-1蛍光二重免疫組織化学

A-C: Day 21 MCにおいて、核/細胞質内Flk-1（緑）と核/細胞質内Flt-1（赤）の共発現（白矢頭）、もしくは細胞質内Flk-1と核/細胞質内Flt-1の共発現認められる（白矢印）。

E-G: Day 28 MCにおいて、細胞質内Flk-1と核/細胞質内Flt-1の共発現認められる（白矢印）。

D, H: Day 21およびDay 28 MCはAB染色によって検出し、色の異なる矢頭および矢印は、それぞれ同じ細胞を示している。

4-4 考察

この章では、皮膚 MC の分化段階と VEGF-A、Flk-1、および Flt-1 の発現部位の関連を明らかとした。皮膚 MC における VEGF-A の発現は、E18 から認められ、Day 90 まで認められた。VEGF-A 陽性 MC の割合は低かったが、Day 14 および Day 21 おいて多く認められた。また Flk-1 および Flt-1 の発現は、特に Day 1 から Day 28 において多く認められたが、Day 60 以降ではその発現はかなり減少した。MC における Flk-1 および Flt-1 の発現に関して、今まで口腔内扁平上皮癌浸潤 MC および正常肺から分離された MC における報告のみであり、皮膚 MC における Flk-1 および Flt-1 の発現について報告はされていなかった。

皮膚 MC の分化は未成熟の MC が皮膚へと移動し、胎生期後期に成熟すると考えられている。未成熟な MC は細胞質内に AB 陽性顆粒のみを有しており、MC の分化が進むに伴って、AB 陽性顆粒から SO 陽性顆粒を含有するようになる (Coms et al, 1965)。AB-SO 染色によって、E16 から Day 1 までは AB>SO 未成熟 MC のみが存在しており、Day 7 以降から AB<SO 成熟 MC が増え、Day 7 まで増加していった。このことから、Day 7 から Day 28 の間に特に皮膚 MC が分化していることが示唆される。また、Day 60 および Day 90 では AB>SO 未成熟 MC が認められなかったことから、成熟したラットの皮膚で分化する MC が減少していることが示唆される。このことから皮膚 MC における Flk-1 および Flt-1 の発現は皮膚 MC の分化の制御に重要な役割があるのではないかと考えられる。

Flk-1 は血管新生において重要な VEGF-A の受容体であり、急性白血病や B 細胞慢性リンパ性白血病、血液幹細胞といった様々な血液細胞において、VEGF-A/Flk-1 シグナリングが細胞増殖や生存を増強していることが分かっている (Doughter et al, 1999; Huang et al, 2007)。Flk-1 陽性 MC の割合は AB 陽性 MC の数と E17 から Day 90 日齢において同調した動きを示していた。さらに、VEGF-A 陽性 MC が Day 14 および Day 21 において多く認められ、Flk-1 陽性 MC が E20 から Day 21 まで顕著に発現レベルが高く、それは Ki67 陽性 MC 割合の増加に伴っていた。これらの結

果から VEGF-A/Flk-1 シグナリングが皮膚において MC 増殖の制御に関わっている可能性を示唆している。Detraki ら (2004) は VEGF-A が特に Flk-1 を介して肺 MC の化学的遊走を促進していることを明らかにした。これより、今回確認された MC の増加は MC の増殖と同様に VEGF-A/Flk-1 シグナリングによる化学的遊走によって起きているのかもしれない。しかし、マウスにおいて、皮膚 MC は肺や皮膚にいる MC 前駆細胞から主に分化しており、骨髄から遊走した細胞ではないことが報告されている (Gentek et al, 2018)。さらに、胎生期ならびに生後において、皮膚の MC が他の組織から遊走してきたことは報告はない。そのため、発生段階における皮膚 MC の遊走に VEGF-A と Flk-1 が関与していることを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

今回の結果から、皮膚の MC は細胞質および核において Flk-1 免疫活性が認められた。他の成長因子と異なり、Flk-1 の多くは血管内皮細胞の細胞質内 endosomal strage pool に存在することが報告されている (Cai et al, 2006; Cai et al, 2011; Gampel et al, 2006)。eNOS や shear stress 下では、細胞質内 Flk-1 レベルは VEGF-A の刺激によって増加した後に核内へと移行する (Dougher et al, 1999; Feng et al, 1999; Santos et al, 2007)。血管内皮細胞および急性骨髄性白血病細胞株において、VEGF-A/Flk-1 シグナリングは Flk-1 の核内移行を誘導し、細胞増殖を増加させる (Frago et al, 2007)。さらに、Flk-1 の持続的な核内局在は増殖活性のある様々な腫瘍細胞において認められている (Blazquez et al, 2006; Domingues et al, 2011; Fox et al, 2004; Stewart et al, 2003; Zhang et al, 2005)。Domingues ら (2011) は VEGF-A による Flk-1 の活性化に依存して、核内 Flk-1 が自身のプロモーターに結合して転写を促進させていると結論づけている。このことから、核内 Flk-1 は皮膚 MC において、Flk-1 の発現を増加を制御することによって Flk-1 の増加作用を増強しているのかもしれない。

Flt-1 と Flk-1 を共発現している内皮細胞において、Flt-1 の主な働きは Flk-1 を介した VEGF-A の血管新生作用の調整である (Bahramsoltani et al, 2010; Cai et al, 2012)。膜結合型 Flt-1 ホモメリック受容体は、VEGF-A 刺激によるリン酸化は弱い

にも関わらず、Flk-1による細胞増殖を低下させる (Ahmed et al, 1977; Bussolati et al, 2001; Rahimi et al., 2000; Zeng et al., 2002)。さらに可溶性 Flt-1 はスプライシングバリエーションによって生成され、VEGF-A と強い親和性があるため、decoy receptor として働き、VEGF-A/Flk-1 シグナリングを抑制する (Fuh et al., 1998; Park et al., 1994; Roeskl et al., 1998)。また、両方の Flt-1 のアイソフォームが Flk-1 とヘテロダイマーを形成することによって、Flk-1 シグナリングを抑制する (Cudmore et al., 2012; Huang et al., 2007; Kendall et al., 1996)。この Flk-1 と Flt-1 の反対の作用は、血液細胞の系統においても認められている。Huang ら (2007) は、ProB 細胞から PreB 細胞への分化を Flt-1 が促進している一方で、Flk-1 がこの過程を抑制していることを明らかにした。ヒトの血液幹細胞においては、VEGF-A/Flt-1 シグナリングが細胞周期や分化を促進しており (Gerber et al., 2002; Hattori et al.)、一方で VEGF-A/Flk-1 シグナリングでは細胞の生存や分化を促進している (Dias et al., 2000, Gerber et al., 2002; Hattori et al.)。これらの報告から、今回の結果において、MC が Flt-1 および Flk-1 いずれも発現していることは、2つの VEGFRs が皮膚 MC の成熟に相互に関与していることを示している。

面白いことに、今回、核内 Flt-1 を発現する肥満細胞の数が Day 14 から Day 28 にかけて増加していることを明らかにした。膜結合型 Flt-1 は一般に細胞膜上や細胞質内コンパートメントに存在する (Cai et al., 2006; Decaussin et al., 1999; Lee et al., 2007; Mittar et al., 2009; Mousavi et al., 2019)。しかしながら、様々な組織や腫瘍細胞において核内の発現は認められている (Andersson et al., 2010, Cai et al., 2006; Cai et al., 2011; Lee et al., 2007; Vincent et al., 2005)。核内 Flt-1 はその機能について詳しいことはわかっていないが、核内 Flk-1 と同様に転写因子として機能していると考えられている (Lee et al., 2007; Vincent et al., 2005)。そのため、核内 Flt-1 は Day 14 から Day 28 にかけて、皮膚 MC において Flt-1 の発現を促進しているのかもしれない。Lee ら(2007)

は、VEGF-A 刺激は Flt-1 の細胞内移動および核内局在を誘導することを明らかにし、

そしてそれは Flk-1 ではなく、Flt-1 のみを発現するヒト乳がん細胞において VEGF-A/Flt-1 細胞内オートクラインシグナリングによる細胞生存や増殖に関与していると考察している。しかしながら、Flt-1 および Flk-1 を共発現している内皮細胞において、VEGF-A 刺激は核内の Flk-1 を増加させ、Flt-1 を減少させることで、血管新生を促進させる (Cai et al., 2012)。Cai らは、Flt-1 の核内移行は、Flt-1 のリガンドのひとつで、VEGF-A/Flk-1 シグナリングによる血管新生を抑制する色素上皮由来因子によって、促進されることを明らかにした (Cai et al., 2011; 2012)。さらに、核内における Flt-1 と Flk-1 の比率が血管新生の主要な決定因子であるとしている (Cai et al., 2012)。これらの結果から、Flt-1 は核内における Flk-1 の機能をも抑制していることを示唆している。

また今回、VEGF-A の発現が認められる MC が各胎齢および日齢の皮膚において少数認められたが、その発現は核内もしくは核膜上であった。また VEGF-A と Flk-1 の共発現 MC も認められたことから、皮膚 MC の分化・成熟段階においても、VEGF-A/Flk-1 オートクラインシグナリングの関与が考えられた。

今回の結果では、核内 Flt-1 は Day 28 で最大レベルで、一方 Flk-1 はほとんど減少している。さらに、同時に Ki67 陽性 MC は劇的に減少し、AB<SO MC は最大数に近づいている。これらの結果は、MC 核内における Flt-1 の割合が Flk-1 と比較して多くなり、核内 VEGF-A と Flk-1 の結合を阻害し、その機能を抑制することによって、未成熟な MC の増殖を低下させ、最終的な成熟の誘導を引き起こしている可能性を示している。

本章においては、ラットの発生段階に伴う皮膚 MC の分化・成熟段階に VEGF-A および受容体の発現が認められた。特に Flk-1 と Flt-1 は、発現 MC の割合や局在の変化から、これらの受容体が協調的に MC の分化・成熟段階に関与していることが示唆された。本章の結果から、VEGF-A または Flk-1 を発現する MCT と同様に低分化、未成熟な MC においても、その発現が認められたこと、さらには VEGF-A および Flk-1 の核内での発現が認められたことから、MCT における VEGF-A および Flk-1 の核内

での発現は、MCT 細胞の低分化状態の維持に深く関与していると考えられる。

第5章 マウス骨髄由来肥満細胞における血管内皮増殖因子(VEGF-A)およびVEGF受容体-2の発現と分化に対する作用

5-1 小序

肥満細胞の分化・成熟には、GATA-1/2、MITF および PU.1 など、多数の転写因子が関連しており (Tsai et al., 1994)、GATA-1 は成熟した肥満細胞で、GATA-2 は未成熟の肥満細胞において発現していることが明らかとなっている (Harige et al., 1998)。特に GATA-2 は、肥満細胞 lineages への分化決定に必須であり (Harige et al., 1998; Matsuda et al., 2007)、c-Kit および MC トリプターゼなどの発現を促進することが報告されている (Maeda et al., 2010; Minami et al., 2004)。また、皮膚肥満細胞においても、皮膚での分化・成熟に重要な役割を果たしていることが示唆されている (Jippo et al., 1996)。

第4章までに、悪性度の高く、低分化な MCT において、VEGF-A および Flk-1 がその形態の維持に関与している可能性が示唆された。また正常皮膚肥満細胞において、その VEGF-A および Flk-1 が成熟・分化に関連している可能性が示唆された。しかし、MCT や肥満細胞の分化・成熟に対する VEGF-A および Flk-1 の作用のメカニズムに関しては不明である。

マウス骨髄由来肥満細胞 (mBMMC) は肥満細胞の炎症や感染の研究において汎用されている初代培養細胞であり、採取したマウス骨髄細胞に対して IL-3 および SCF を添加することによって、骨髄細胞から肥満細胞への分化を誘導する培養方法である (Michael et al., 1992)。

そこで本章では、mBMMC を用いて、骨髄細胞から肥満細胞への分化・成熟過程における VEGF-A および Flk-1 の発現について検索した。さらに VEGF-A および Flk-1 inhibitor の添加によって VEGF-A/Flk-1 シグナリングの肥満細胞の成熟・分化に対する作用を検索した。

5-2 材料と方法

5-2-1 マウス骨髄細胞の分離および培養

4 週齢の ICR オスマウスの両後肢から骨髄細胞を回収した。回収した骨髄細胞は 100ug/ml streptomycin (Meiji, Tokyo, Japan) および 100ng/ml penicillin を添加した RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, USA) /10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT) に溶解した。さらに mouse recombinant IL-3 (5ng/ml)、および mouse recombinant SCF (20ng/ml) を添加してから 35mm dish に播種し、37°C、5%CO₂、加湿状態で 8 週間培養した。なお培養液は 3 日おきに交換した。

5-2-2 mBMMC の組織切片の作製

mBMMC は 0.01M PBS を用いて回収し、1,500rpm、5 分間の遠心によって 3 回洗浄を行った。mBMMC は 4%パラホルムアルデヒドによって一晩固定した。翌日 4%パラホルムアルデヒドを除去し、1%アルギン酸ナトリウム中に mBMMC を浮遊させ、1500rpm、5 分間遠心した。上清を取り除いた後、1M 塩化カルシウムによって細胞塊をゲル化した (Basch, 1986)。その後は定法に従って、3μm のパラフィン切片を作製した。

5-2-3 mBMMC の免疫組織化学

培養 2-8 週 mBMMC の c-Kit、VEGF-A、Flk-1、Flt-1 に対する免疫組織化学を第 2 章と同様の方法で行なった。使用した抗体の条件は Table 5 に示した。

5-2-4 mBMMC の total RNA 抽出、定性的 RT-PCR および定量的 real time RT-PCR 解析

肥満細胞の分化を制御している転写因子 (GATA2、MITF)、肥満細胞の分化・成熟に伴って増加する因子 (c-Kit、MCP6、FceR1) および VEGF-A、Flk-1 および Flt-1

の mRNA の発現を Reverse transcription PCR (RT-PCR) 法にて検索した。

mBMMC の total RNA は酸性グアニジン・フェノールクロロホルム法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) を用いて、培養開始後 2、3、4、5、6、7 および 8 週目に抽出した。

逆転写 (RT) は Rever Tra Dash RT-PCR Kit (Toyobo, Osaka, Tokyo) を用いて、メーカーが推奨するプロトコールに従って行った。それぞれの反応には 1ug の total RNA を使用した。

定性的 PCR では Rever Tra Dash RT-PCR Kit (Toyobo) および Bio-Rad C1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) を使用した。定性的 RT-PCR に使用したプライマーは Table 5-1 に示した。Thermal cycling parameter は Activation; 95°C 1 分間の後、Denature、Annealing、Extend を各プライマーに適した温度、時間、cycle 数で行い、最後に Elongation; 72°C 7 分間を行った。詳細は Fig 5-1 に示した。

定量 real-time RT-PCR は TB Green® Fast qPCR Mix (TakaRa Bio Inc., Shiga, Japan) と TaKaRa Thermal Cycler Dice TP800 (TaKaRa) を用いて行った。定量的 real time RT-PCR に使用したプライマーは Table 5-2 に示した。Thermal cycling parameter は Activation; 95°C 2 分間、Denature; 95°C 3 秒間、Annealing/Extend; 60°C 30 秒間を 40cycle 繰り返し、dissociation step は 95°C15 秒間、60°C30 秒間、95°C15 秒間で行った。インターナルコントロールとして GAPDH を使用し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で定量した。

5-2-5 mBMMC に対する VEGF および Flk-1 inhibitor の添加

Flk-1 の発現が認められる培養 3.5 週目の mBMMC を用いて、IL-3 および SCF 添加群 (mBMMC (IL-3+/SCF+)) と非添加群 (mBMMC (IL-3-/SCF-)) を準備した。各群それぞれに、VEGF-A (50ng/ml; FUJIFILM Wako, Osaka, Japan; VEGF-A 添加群)、あるいは Flk-1 inhibitor (70nM; Merck, NJ, USA; Flk-1 inhibitor 添加群)

を添加し、24 時間培養した。対照群 (Control 群) は mBMMC (IL-3+/SCF+) と非添加群 mBMMC (IL-3-/SCF-) それぞれに 0.01M PBS を同容量添加した。24 時間培養後、それぞれの細胞の組織標本の作製および total RNA の抽出を行ない、それぞれ蛍光免疫組織化学 (VEGF-A および Flk-1) 、または定量的 real-time RT-PCR を 5-2-2~5-2-4 と同様に行なった。

Table 5. 使用抗体希釈倍率

Antibody	Blocking	Host species	Dilution	Supplier	Article No.
Anti-c-Kit	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:500 (1:300)*	Agilent, Santa Clara, CA., U.S.A.	A4502
Anti-VEGF-A	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:100	Cloud-Clone, Katy, TX., U.S.A.	LAA143Ca71
Anti-Flk1	10% goat serum	Mouse, monoclonal	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-393163
Anti-Flt1	10% goat serum	Rabbit, polyclonal	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-316
Anti-MC Tryptase	10% goat serum	Mouse, monoclonal	1:500 (1:100)*	Santa Cruz, Dallas, TX., U.S.A.	sc-59587

*0内は蛍光免疫組織化学での条件

5-3 結果

5-3-1 mBMMC 発生段階における mRNA 発現および c-Kit、VEGF-A、Flk-1、および Flt-1 免疫組織化学的検索

mBMMC を 8 週間培養を行なった結果、肥満細胞 lineages に特異的に発現する *c-kit*、*mitf* および *fcgr1* の mRNA 発現が培養 3 週以降の定性的 RT-PCR で認められた。そのため、mBMMC を用いた本培養実験系においては、培養 3 週以降は明らかに肥満細胞 lineages への分化・成熟が進行しているものと考えられた。*vegf-a* mRNA の発現は培養 3 週から 8 週まで認められ、一方、*flk-1* mRNA の発現は培養 3 週から 6 週、*flt-1* mRNA の発現は培養 3 週から 5 週で認められた (Fig. 5-1)。さらに、定量的 real-time RT-PCR *c-kit*、*gata 2*、*mitf*、*mcp6* (MC Tryptase)、*vegf-a* および *flk-1* mRNA の発現量の変化を解析した結果を Fig. 5-2 に示す。*vegf-a* および *flk-1* mRNA は、培養 4 週目で非常に高いレベルを示したが、培養 3 週目および 5~8 週目では発現は比較的低いレベルであった。

c-Kit、VEGF-A、Flk-1、および Flt-1 の免疫組織化学は、定性的 RT-PCR において mRNA 発現が認められた培養週において行なった。c-Kit 陽性反応は培養時期によって細胞内の局在が変化し、培養 3 および 4 週では、大部分の細胞において細胞質内にびまん性の陽性反応が認められたが、培養 5 週から顆粒状の陽性反応を示す細胞が、7 週以降では細胞膜に陽性反応を示す細胞が認められた (Fig. 5-3)。VEGF-A 免疫組織化学においては、培養 3 週から 5 週にかけて、細胞質内、あるいは核内および細胞質内に陽性反応を示す細胞が多く認められたが、6 週以降では、陽性反応を示す細胞は減少していた (Fig. 5-4)。Flk-1 免疫組織化学においては、培養 4 週から 5 週にかけて、多くの細胞で細胞質内、あるいは核内および細胞質内に陽性反応が認められたが、培養 3 週および 6~8 週においては陽性反応を示す細胞は、培養 4 週および 5 週と比較して減少しており、核内に陽性反応を示す細胞はほとんど認められなかった (Fig. 5-5)。Flt-1 免疫組織化学においては、培養 3 週から 5 週では陽性反応を示す

細胞は少なく、核内に陽性反応を認める細胞はごくわずかであり、培養 6 週以降ではさらに減少し、培養 7 週では陽性細胞は認められなくなった (Fig. 5-6)。

5-3-2 mBMMC の分化に対する VEGF および Flk-1 inhibitor の作用

mBMMC (IL-3+/SCF+) において、Flk-1 inhibitor の添加によって、*Gata2* mRNA ($p<0.05$) および *c-kit* mRNA (有意差なし) の増加が認められた。また、mBMMC (IL-3-/SCF-) においては、Flk-1 inhibitor の添加によって、*Mitf* mRNA の減少が認められた (Fig. 5-7)。VEGF-A の添加による *Gata2* mRNA および *c-kit* mRNA の発現量の変化は認められなかった。

さらに VEGF-A および Flk-1 inhibitor 添加の影響による VEGF-A および Flk-1 局在の変化について、蛍光免疫組織化学によって核染色である DAPI とマージし、その局在を検索したところ、有意な局在の変化は認められなかった (Fig. 5-8)。

Table. 5-1 定性的RT-PCRプライマー

Name (cycle数)	Sequence(5'-3')	Product (bp)	Dnature (°C/M)	Annealing (°C/M)	Extend (°C/M)
<i>c-kit</i> (35)	Fw. AGC AAG AGT TAA CGA TTC CGG AG Rev. CCA GAAAGG TGT AAG TGC CTC CT	344	95/1	60/1	72/1
<i>mitf</i> (35)	Fw. CTA GAG CGC ATG GAC TTT CC Rev. AAG TTG GAG CCC ATC TTC CT	246	95/1	65/1	72/1
<i>vegf</i> (30)	Fw. TTT ACT GCT GTA CCT CCA CCA Rev. ATC TCT CCT ATG TGC TGG CTT T	320, 520	95/1	65/1	72/1
<i>flk-1</i> (30)	Fw. GCC AAT GAA GGG GAA CTG AAG AC Rev. TCT GAC TGC TGG TGA TGC TGT C	547	95/1	60/1	72/1
<i>flt-1</i> (30)	Fw. TTCAACACCTCTGTGCATGTGT Rev. ATACACGGTGCAAGTGAGGACTT	490	95/1	60/1	72/1
<i>fcεRI</i> (35)	Fw. TTGGTCATTGTGAGTGCCACC Rev. GTGTCCACAGCAAACAGAATC	428	95/1	60/1	72/1
<i>gapdh</i> (35)	Fw. TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA Rev. ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	397	95/1	55/1	72/1

M: minute

Table. 5-2 定量real-time RT-PCRプライマー

Name	Sequence(5'-3')	Product (bp)
<i>c-kit</i>	Fw. AGC AAG AGT TAA CGA TTC CGG AG Rev. CCA GAA AGG TGT AAG TGC CTC CT	344
<i>mitf</i>	Fw. CTA GAG CGC ATG GAC TTT CC Rev. AAG TTG GAG CCC ATC TTC CT	246
<i>gata2</i>	Fw. CCA GCA AAT CCA AGA AGA GC Rev. AGA CTG GAG GAA GGG TGG AT	193
<i>vegf</i>	Fw. TTT ACT GCT GTA CCT CCA CCA Rev. ATC TCT CCT ATG TGC TGG CTT T	320
<i>flk-1</i>	Fw. GCT TGC TCC TTC CTC ATC TC Rev. CCA TCA GGA AGC CAC AAA GC	273
<i>mmcp6</i>	Fw. GCC CAG CCA ATC AGC G Rev. CCA GGG CCA CTT ACT CTC AGA	64
<i>gapdh</i>	Fw. TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA Rev. ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	397

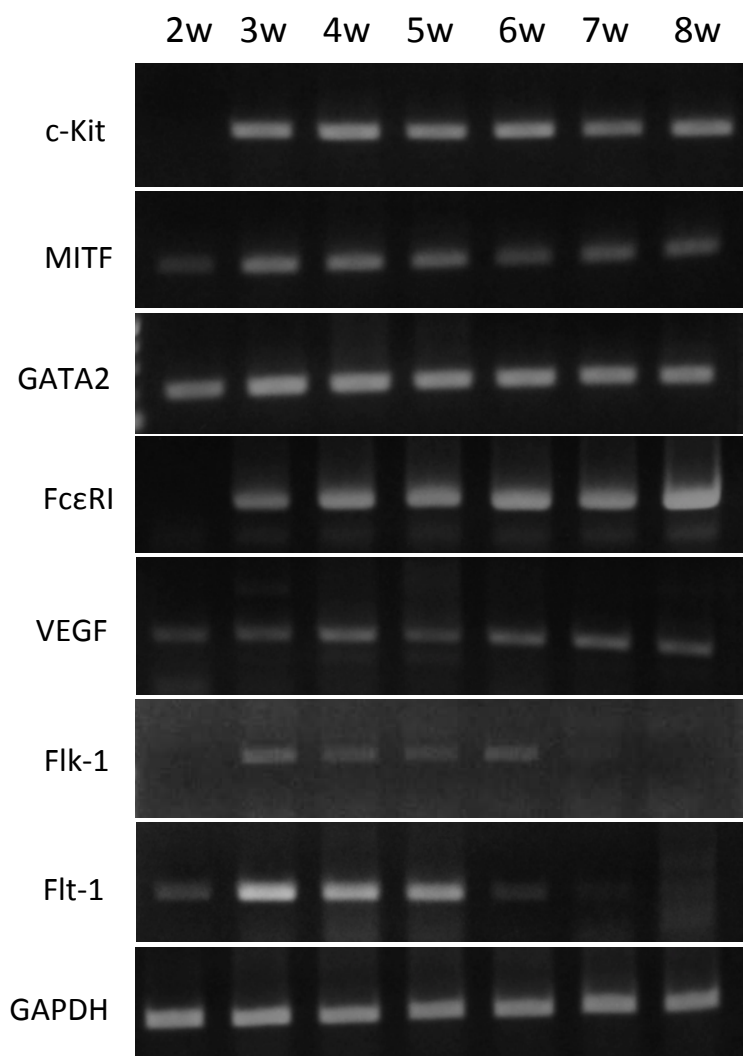


Figure 5-1. IL-3およびSCF添加mBMMCにおける分化関連因子、VEGFおよびFlk-1の発現の変化

c-Kit、MITF、GATA2、およびFcεRIのmRNAが培養3週以降にすべて検出されたことから、培養3週以降を肥満細胞リネージとした。

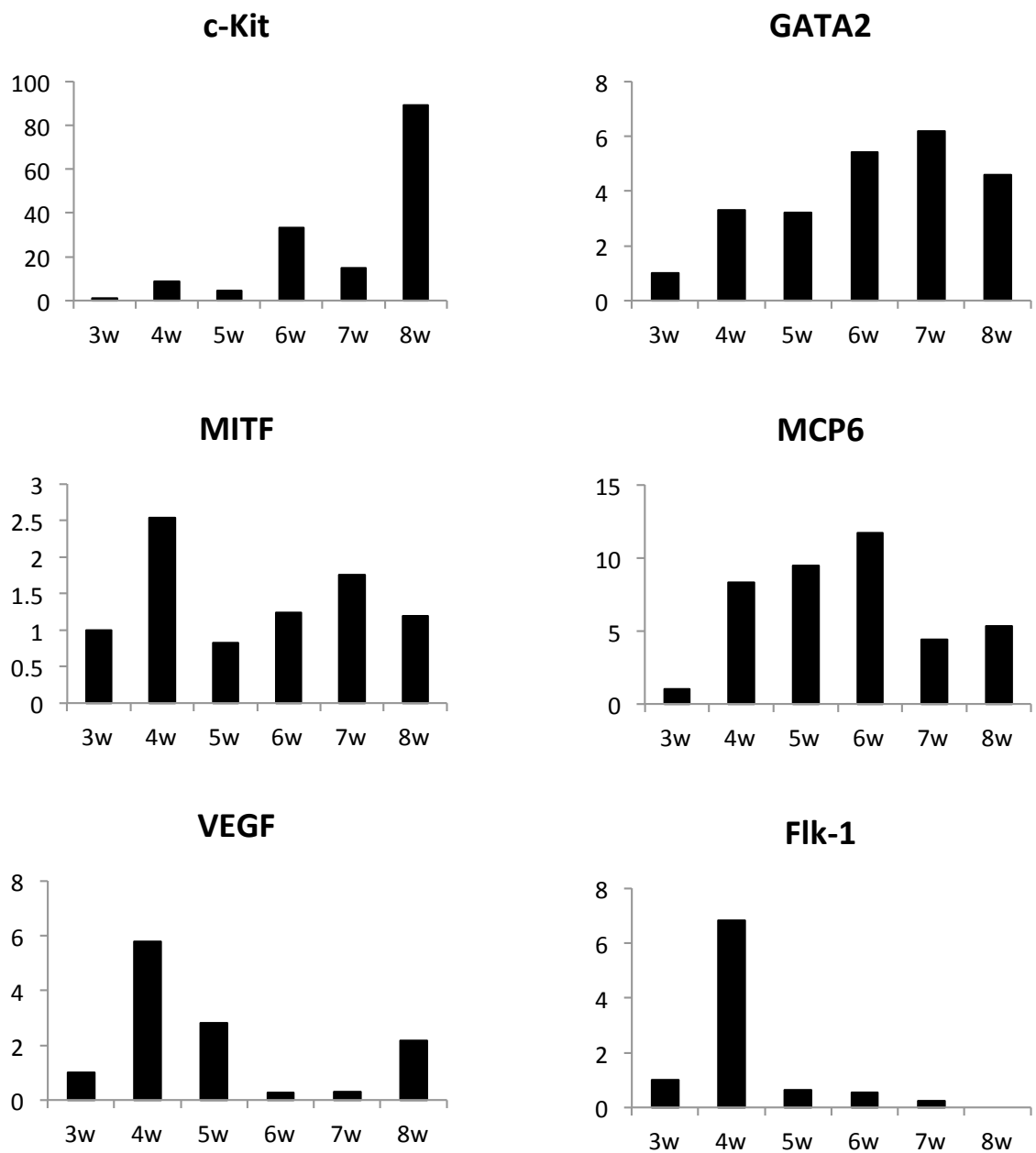


Figure 5-2 培養週ごとのmBMMC mRNA量の変化
 定性的PCRで肥満細胞への分化・成熟過程と考えられた培養3週の
 mBMMCを1として、それぞれのmRNAの発現量の変化を示した。

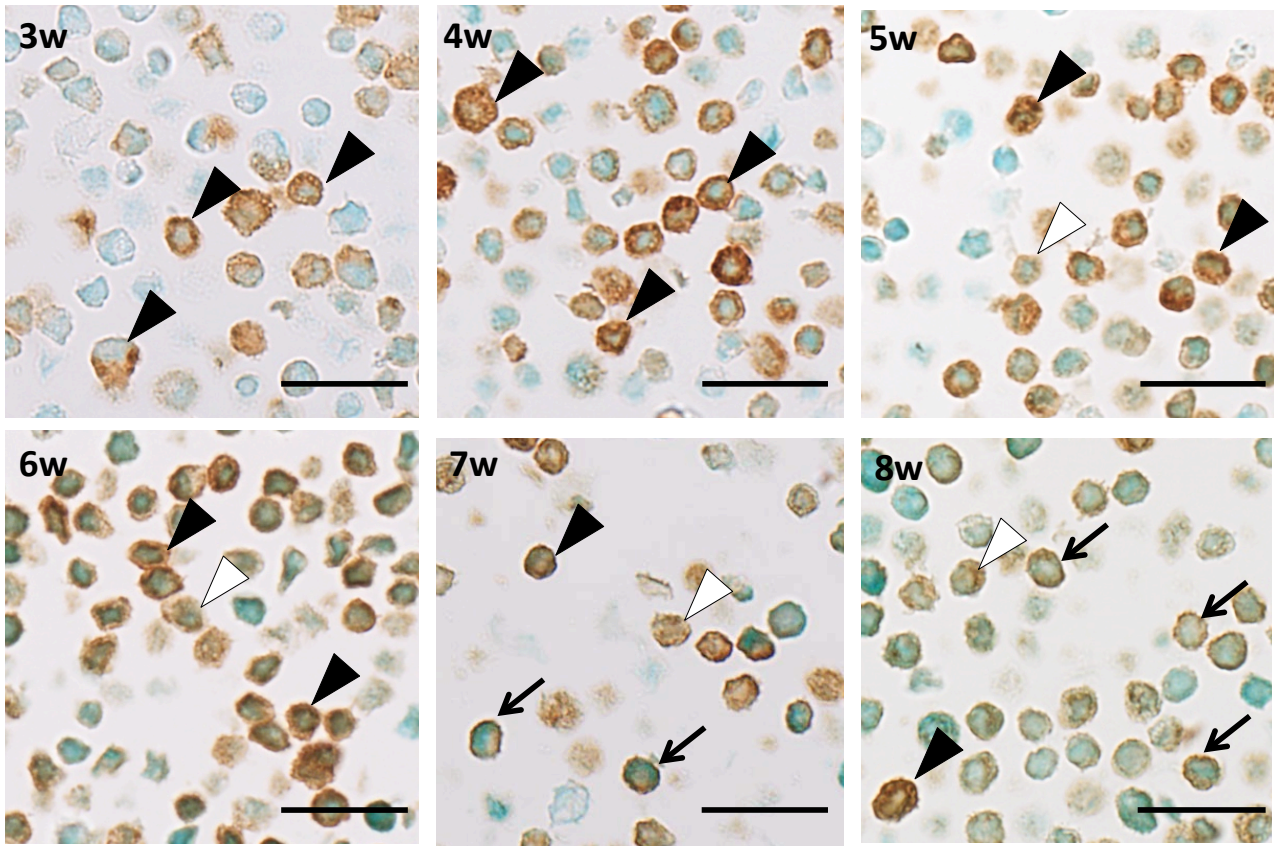


Figure 5-3 mBMMCにおけるc-Kit免疫組織化学

培養3週から8週にかけてのmBMMCのc-Kit免疫組織化学を行なった。培養3および4週では、細胞質内にびまん性の免疫反応が認められる（黒矢頭）。また培養5週から顆粒状の免疫反応を示す細胞（白矢頭）が、7週以降のmBMMCでは細胞膜上に免疫反応が認められる（黒矢印）。

（スケールバー：20 μ m）

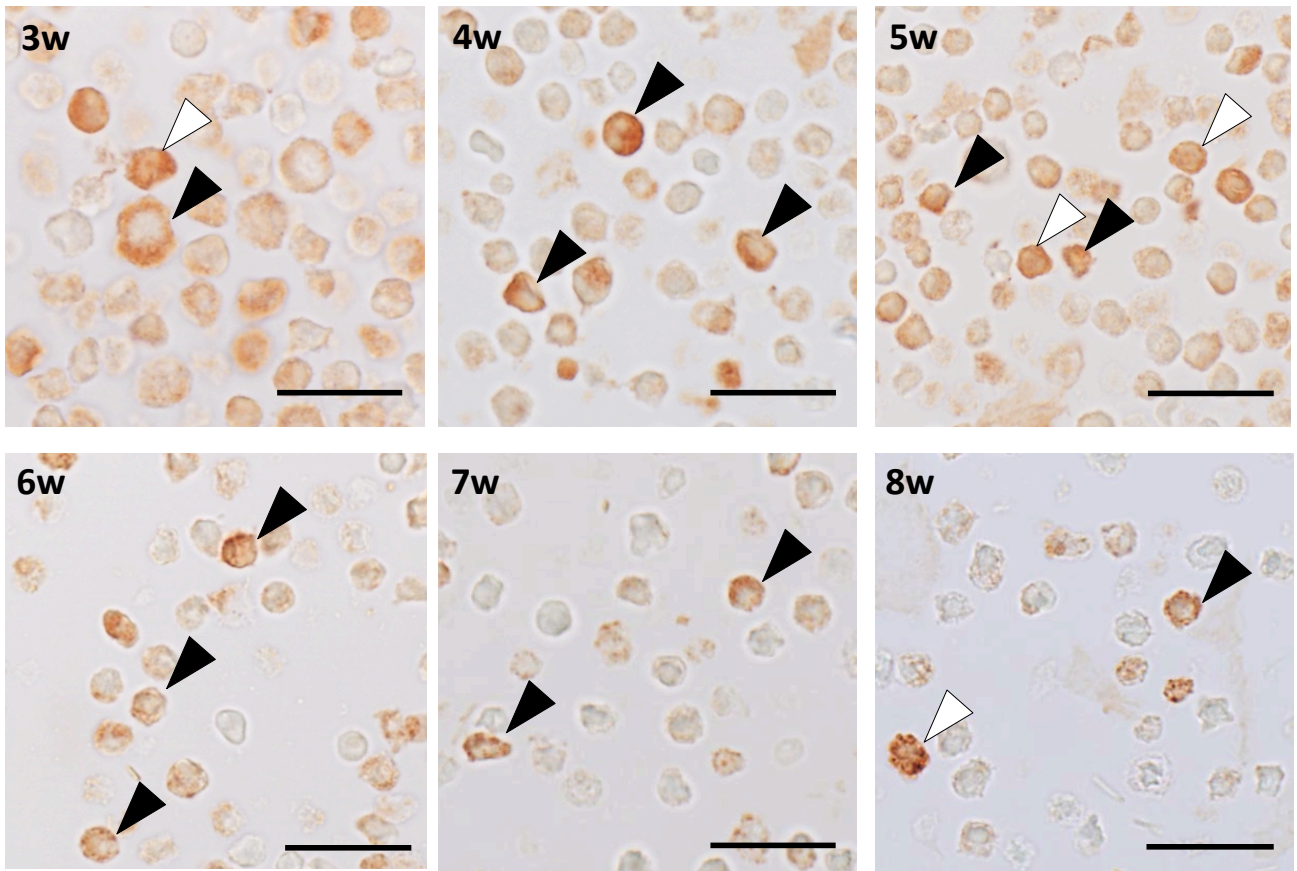


Figure 5-4 mBMMCにおけるVEGF-A免疫組織化学

培養3週から8週にかけてのmBMMCのVEGF-A免疫組織化学を行なった。培養3週から5週にかけて、細胞質内（黒矢頭）もしくは核内および細胞質内（白矢頭）に免疫反応を示すmBMMCが多く認められる。培養6週から免疫陽性mBMMCは減少している。

（スケールバー：20μm）

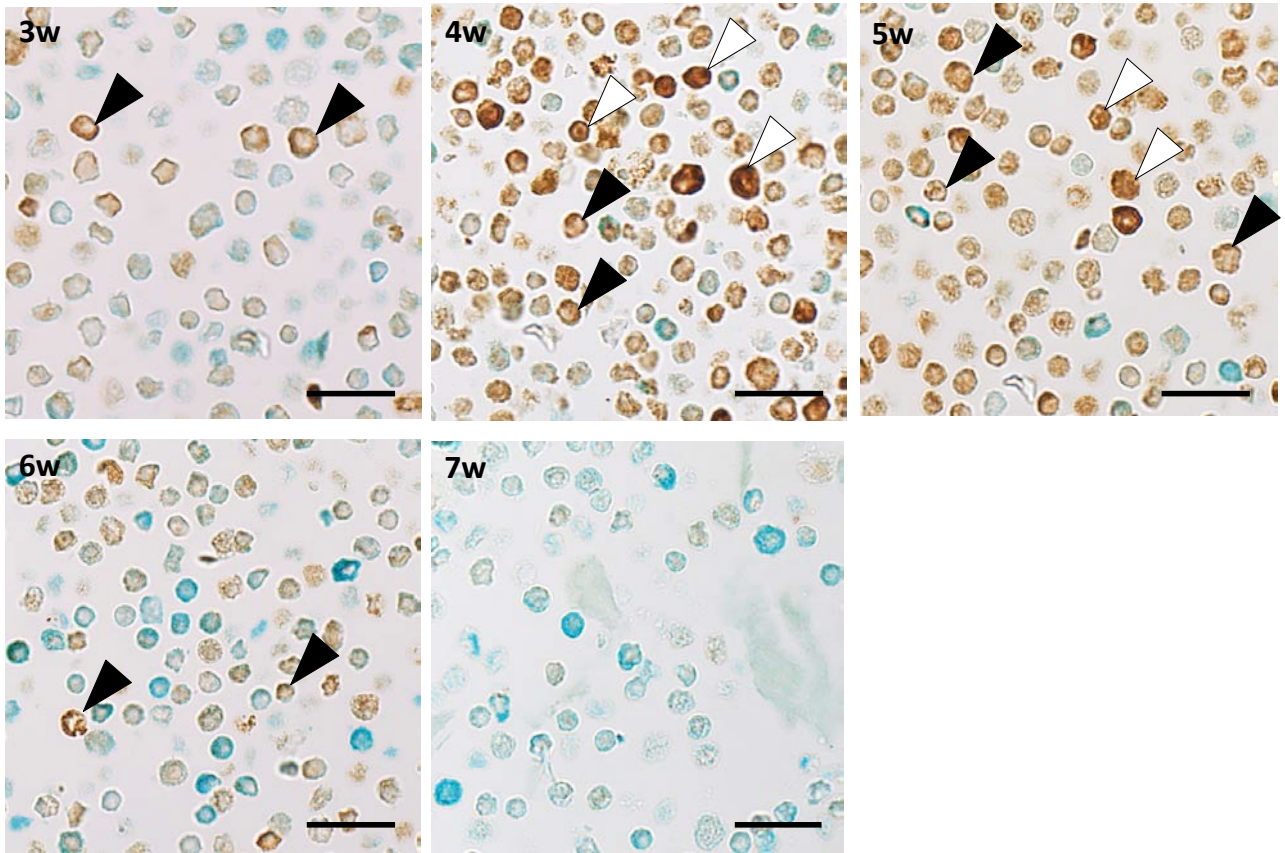


Figure 5-5 mBMMCにおけるFlk-1免疫組織化学

培養3週から6週にかけてのmBMMCのFlk-1免疫組織化学を行なった。培養4週から5週にかけて、多くのmBMMCにおいて細胞質内（黒矢頭）もしくは核内および細胞質内（白矢頭）に免疫反応認められる。一方で培養3週および6週での免疫陽性mBMMCは、培養4週および5週と比較して少なく、核内陽性細胞はほとんど認められない。

（スケールバー：20 μ m）

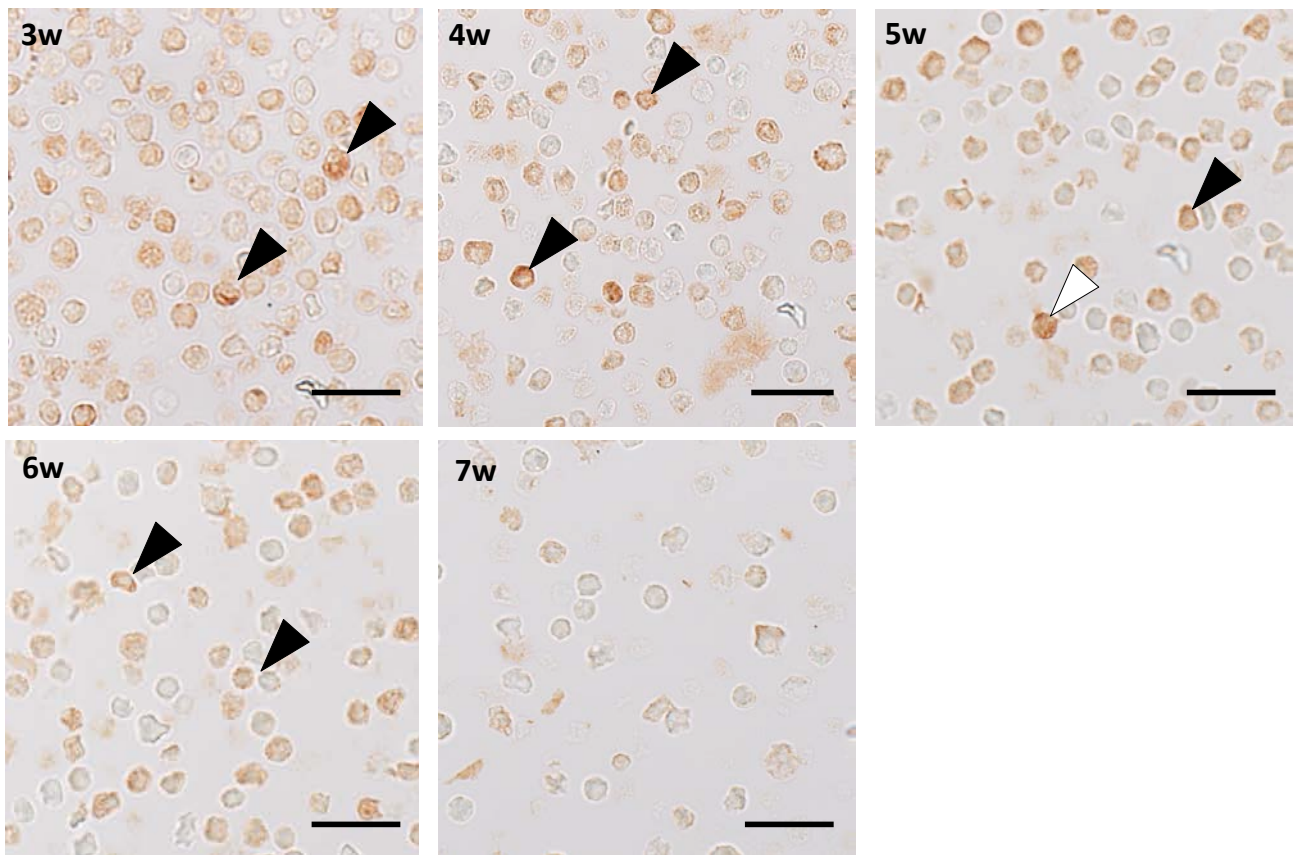


Figure 5-6 mBMMCにおけるFlt-1免疫組織化学

培養3週から5週にかけてのmBMMCのFlt-1免疫組織化学を行なった。
培養3週から5週いずれのmBMMCにおいても、Flt-1免疫陽性mBMMCは少
なく、核内に免疫陽性反応を認める腫瘍細胞はごくわずかである。
(スケールバー：20 μ m)

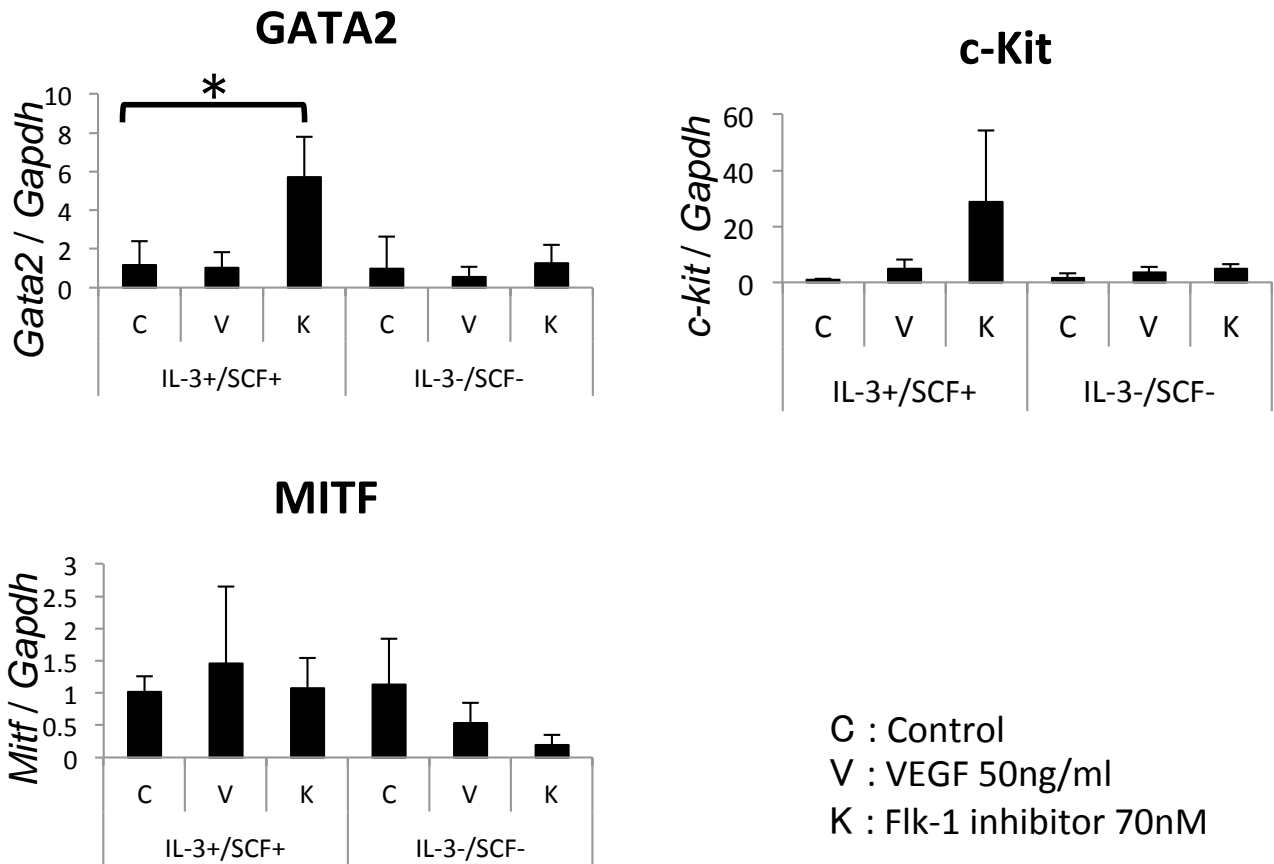


Figure 5-7 mBMMCに対するVEGF-AおよびFlk-1 inhibitorの添加
mBMMC (IL-3+/SCF+)、およびmBMMC (IL-3-/SCF-) をControl群、
VEGF-A群、Flk-1 inhibitor群に分け、各サイトカインを添加して、24時間培
養しtotal RNAの定量的real-time RT-PCRを行なった。
mBMMC (IL-3+/SCF+) Flk-1 inhibitor群において、有意に*Gata2* mRNAの
発現量が増加した ($p < 0.05$)。また、*c-kit* mRNAの増加が認められた

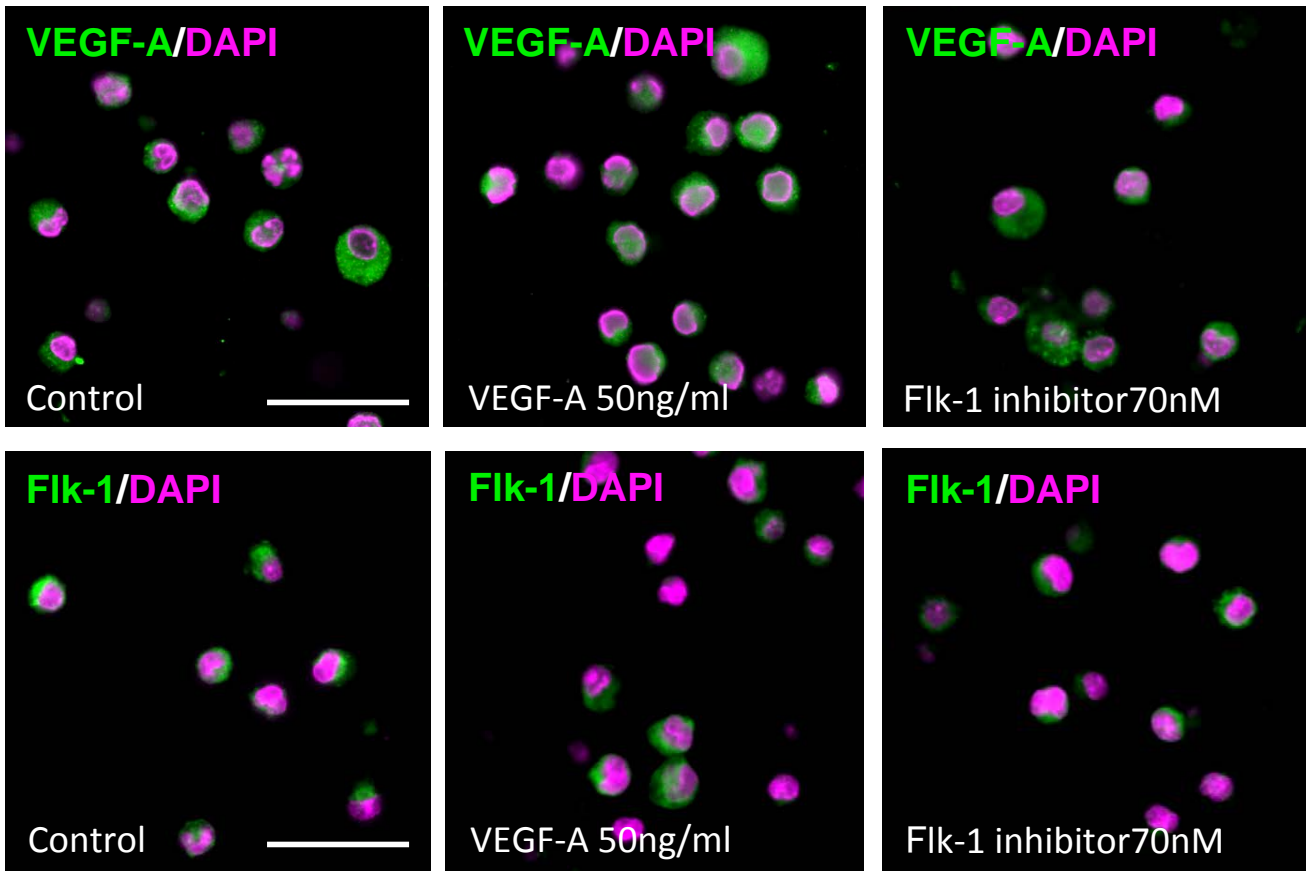


Figure 5-8 VEGF-AおよびFlk-1 inhibitorの添加によるVEGF-AおよびFlk-1の局在
 VEGF-A、もしくはFlk-1inhibitorを添加したmBMMCにおけるVEGF-Aおよび
 Flk-1の局在を、蛍光二重免疫組織化学によって検索した。
 いずれにおいても、発現局在に関して有意な違いは認められなかった。
 (スケールバー：20 μ m)

5-4 考察

今回、第4章の結果から、胎生期および成長期のラットにおいて、Flk-1 と Flt-1 の協調作用が皮膚肥満細胞の分化・成熟を制御していることが示唆された。本章索においても、IL-3 および SCF 添加によって肥満細胞への分化を誘導した培養肥満細胞 mBMMC で、培養3週から6週に *flk-1* mRNA の発現が認められ、特に培養4週目で高いレベルの発現量を示した。また、*flt-1* mRNA の発現は培養3週から5週にのみ認められた。さらに、*vegfa* mRNA の発現は培養3週から8週目に認められ、*flk-1* mRNA と同様に特に培養4週目で高いレベルの発現量を示した。このことから Flk-1 および Flt-1 の発現は培養初期から中期に限定して認められることが明らかとなり、胎生期および成長期の皮膚肥満細胞と同様に、分化・成熟過程にある肥満細胞の制御に Flk-1 と Flt-1 が関与していることが示唆された。さらに、同時期に VEGF-A の発現も高度に認められたことから、肥満細胞の分化・成熟に対する VEGF-A/Flk-1 および VEGF-A/Flt-1 の作用はオートクラインループによってもたらされているものと考えられた。

さらに、Flk-1 が高度に発現している培養3-4週目において、Flk-1 のリン酸化シグナリングを特異的に阻害することによって、c-Kit と GATA2 の発現の増加が認められた。GATA2 は造血幹細胞の分化に重要な転写因子のひとつであり (Tsai et al., 1994)、また GATA1 や PU.1 と協調して、造血幹細胞から肥満細胞への分化を促進する (Harigae et al., 1998; Walsh et al., 2002)。Maeda らは、肥満細胞において、GATA2 と Sp1 が c-Kit 遺伝子のプロモーター領域に結合することによって、c-Kit の発現を促進させることを報告している (Maeda et al., 2010)。また、GATA2 は、肥満細胞の成熟に伴って増加する MC トリプターゼの発現を促進することも明らかとなっている (Minami et al., 2004)。さらに、SCF/c-Kit シグナリングも肥満細胞の分化・成熟を促進することが知られており、サフラニン O 陽性の細胞質内顆粒を増加させる (Tsai et al, 1991)。このため、未成熟な肥満細胞においては、Flk-1 シグナリングによって、GATA2 の発現の抑制、およびそれによって誘導される c-Kit の発現の抑制

が生じ、その結果、肥満細胞の分化・成熟が抑制的に制御されているものと考えられた。また、mBMMC の培養過程における定量的な mRNA の検索では、培養 3 週目で *flt-1* mRNA の高度な発現を示し、その後 4-8 週目では急激に減少傾向を示したが、*gata2* mRNA の発現は *flt-1* mRNA の発現が低値を示す 6-8 週目で高度な発現を示した。この結果も、Flk-1 の発現の減少とシグナリングの減少の結果、GATA2 発現の増加が誘導され、肥満細胞の分化・成熟が促進されたことを反映しているのかもしれない。また、GATA2 の発現は、転写因子である STAT5 によって促進されることが報告されている (Li et al., 2015)。STAT5 は c-Kit の下流シグナリングに存在する転写因子であり (Shelburne et al., 2003)、STAT5 の DNA への結合は SCF/ c-Kit シグナリングによって活性化される (Ryan et al., 1997)。このため、今回の結果、Flk-1 シグナリングの阻害は、GATA2 の発現を促進し、その結果 c-Kit の発現を誘導することが示唆されたが、さらに c-Kit の発現の増加に伴う c-Kit シグナリングの亢進が、再度 GATA2 の発現を増加させ、肥満細胞の分化・成熟の促進的な制御を増幅させている可能性が示唆された。

今回、培養肥満細胞における c-Kit 免疫組織化学において、培養初期にはほとんどの細胞が細胞質内に高度な陽性反応を示したが、培養日数を経るに従って細胞質内陽性反応を示す細胞は減少し、細胞膜に局限した陽性反応を示す細胞が増加していた。このため、肥満細胞における c-Kit の局在は分化・成熟過程で変化し、未分化な肥満細胞では細胞質内に、成熟した肥満細胞では細胞膜に局在するものと考えられた。イヌの肥満細胞腫 (MCT) においては、比較的良性の MCT では c-Kit が細胞膜に局限しているのに対し、悪性度の高い MCT においては細胞質内に顆粒状あるいはびまん性に局在している (Kiupel et al., 2004; Costa et al., 2007)。本章の結果から、イヌ MCT 細胞における c-Kit の細胞内の局在も MCT 細胞の分化度を反映している可能性が示唆され、高分化の MCT 細胞は細胞膜に局限する c-Kit pattern I を呈し、より未分化な形質を保持する MCT 細胞は細胞質内に局在する c-Kit pattern II や III を呈しているのかもしれない。

本章においては、mBMMCにおける VEGF-A と Flk-1 の発現およびその機能を検索した。その結果、Flk-1 は肥満細胞の分化・成熟過程において一時的に発現し、そのシグナリングによって GATA2 や c-Kit の発現を制御していることが明らかとなった。さらに Flk-1 の発現時期には、VEGF-A の発現も認められたことから、VEGF-A/Flk-1 オートクラインシグナリングによって GATA2 や c-Kit の発現を制御し、肥満細胞の分化・成熟を調整している可能性が示唆された (Fig. 5-9、5-10)。

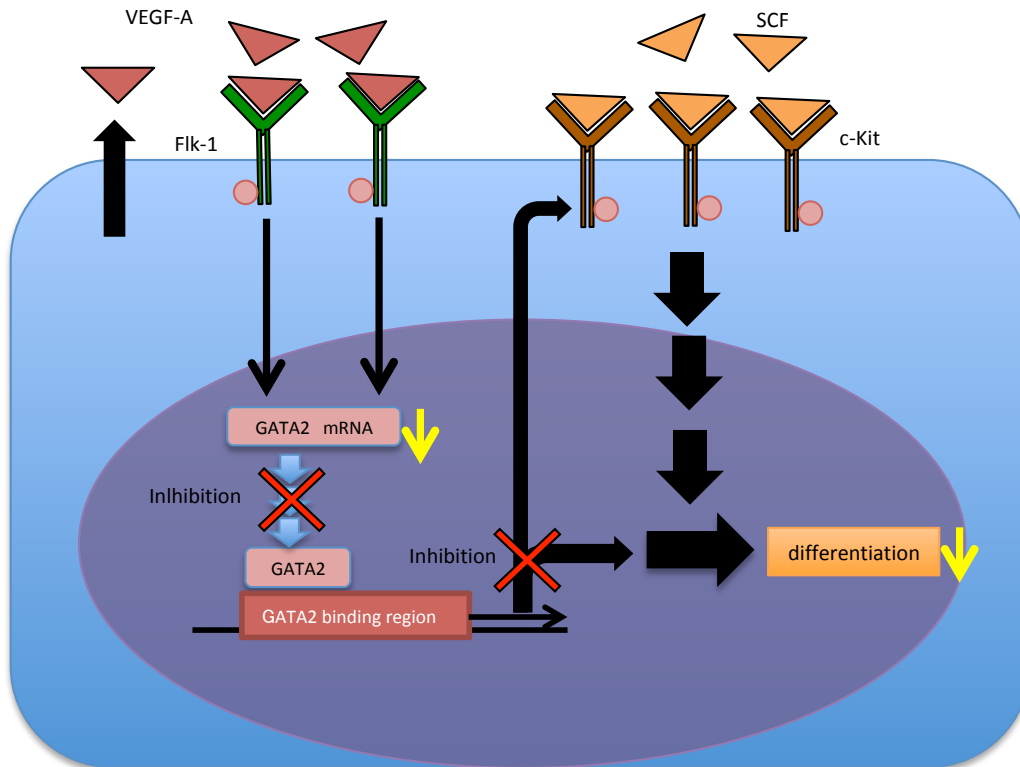


Figure 5-9 培養初期の肥満細胞の分化に対するVEGF-A/Flk-1の作用機構
 Flk-1を発現する培養初期の肥満細胞では、Flk-1シグナリングによって *gata 2* mRNA発現を低下させ、さらにGATA2により促進されるc-Kitの発現が減少することによって、肥満細胞の分化を抑制的に制御していると考えられる。

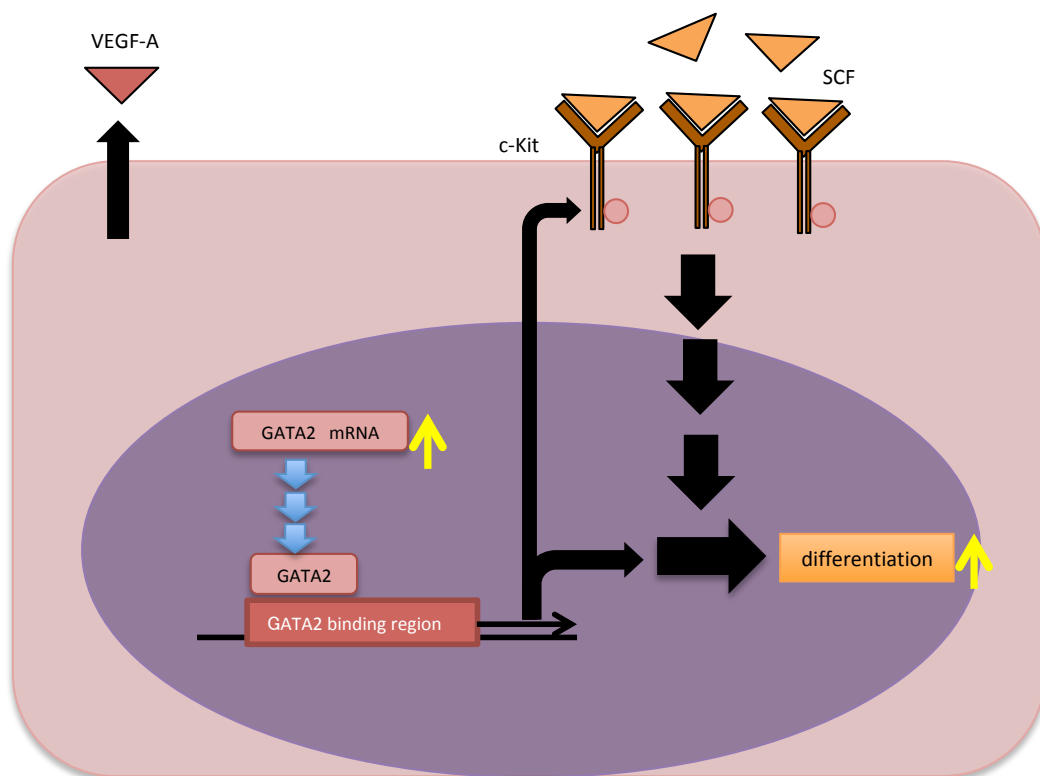


Figure 5-10 培養後期の肥満細胞の分化

Flk-1を発現していない培養後期の肥満細胞では、Flk-1シグナリングによる抑制が起こらないことで、*gata 2* mRNA発現が増加し、さらにGATA2によりc-Kitの発現が亢進されることによって、肥満細胞の分化が進んでいくと考えられる。

第6章 総括

皮膚肥満細胞腫 (MCT) はイヌの皮膚腫瘍の中で最も多い腫瘍の1つである。高悪性度の MCT は、細胞質内顆粒の減少、核分裂像の増加および高 N/C 比等の未分化な肥満細胞の特徴を示し、これらの形質と腫瘍細胞の悪性動態の関連が示唆されている。このため、高悪性度の皮膚 MCT では、正常な分化・成熟の制御が変化し、未分化な状態を維持するメカニズムが存在することが予測され、さらにこれらの制御機構が、腫瘍細胞の増殖や浸潤などの悪性形質の発現にも関与している可能性が示唆される。皮膚の肥満細胞 (MC) の分化や増殖には、幹細胞因子 (SCF) と SCF 受容体 c-Kit が深く関与していることが知られているが、分化制御に対する他の因子の関与については不明な点が多い。また、MCT においても分化を制御している機序は不明である。血管内皮増殖因子 (VEGF) -A は、受容体 (VEGFRs) である Flt-1 および Flk-1 を介して主に血管新生を制御しているが、造血幹細胞および各系統の血液細胞の分化・成熟の制御にも重要な役割を担っている。このため、VEGF-A、Flk1 および Flt1 は、皮膚肥満細胞およびイヌの皮膚 MCT の分化・成熟の制御に関連している可能性が示唆されるが、詳細な検索はなされていない。

本研究では、イヌの皮膚 MCT における腫瘍細胞の分化や悪性形質発現に対する対する VEGF-A と VEGFRs の関与を明らかにすることを目的として、イヌの皮膚 MCT 症例における VEGF-A および VEGFRs の発現と組織学的悪性度および腫瘍細胞の分化度との関連性の解析、発生過程の皮膚 MC における VEGF-A と VEGFRs の発現と MC の分化度との関連性の解析、初代培養 MC を用いた VEGF-A と Flk-1 の MC の分化に対する作用の解析を行った。

第2章では、イヌの皮膚 MCT における VEGF-A と VEGFRs 発現と組織学的悪性度の関係を明らかにするために「イヌの皮膚肥満細胞腫における VEGF-A および VEGFRs の発現と組織学的悪性度との関連」に関する研究を行なった。イヌの皮膚 MCT 135 症例を用いて、病理組織学的分類 (Patnaik 分類 : Grade I ~ III、Kiupel

分類 : low-grade と high-grade)、および c-Kit 免疫組織化学陽性反応の細胞内局在による分類 (c-Kit pattern I ~ III) によって組織学的悪性度を評価した。同時に、MCT 細胞の増殖能を Ki67 と増殖性細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織化学によって評価した。さらに、MCT における VEGF-A、Flk-1、および Flt-1 の免疫組織化学を実施し、MCT 細胞におけるこれら分子の発現と組織学的悪性度との関連性を解析した。その結果、VEGF-A 陽性となる MCT は、悪性度の高い MCT (Patnaik 分類 Grade III と Kiupel 分類 high-grade) および c-Kit pattern III を示す MCT に有意に多く認められ、Flk-1 陽性 MCT は c-Kit pattern III を示す MCT で有意に多く認められた。さらに、VEGF-A と Flk-1 の共発現は、Patnaik 分類 Grade III と Kiupel 分類 high-grade および c-Kit pattern II と III で有意に多く認められた。一方、Flt-1 と腫瘍の悪性度との関連性は認められなかった。また、正常な皮膚 MC では、VEGF-A 陽性反応は細胞質内に、Flk-1 陽性反応は核内のみに認められたが、MCT では細胞質内と核内に共に認められた。以上の結果から、イヌの皮膚 MCT において、VEGF-A と Flk-1 は腫瘍の悪性化に関連して発現することが示唆された。特に VEGF-A と Flk-1 の共発現が高悪性度の MCT に多く認められたことから、VEGF-A/Flk-1 オートクラインによるシグナリングが悪性形質発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。正常な MC では VEGF-A が Flk-1 に作用して細胞の遊走を促進することが報告されている。さらに Flk-1 の細胞質内移行の増加は VEGF-A/Flk-1 の intracrine シグナリングを増加させ、細胞の生存延長をもたらすことが報告されている。従って、MCT では VEGF-A と Flk-1 が、MCT 細胞の周囲組織への遊走促進と生存の延長によって、腫瘍の悪性形質発現に関与している可能性が示唆された。

第3章では、VEGF-A と Flk-1 の発現とイヌ皮膚 MCT の分化度との関連性を明らかにするために、「イヌの皮膚肥満細胞腫における VEGF-A および Flk-1 の発現と腫瘍細胞の分化度」に関する研究を行った。皮膚 MC は成熟過程において細胞質内顆粒のアルシアンブルー (AB) とサフラニン O (SO) の染色性が変化し、未成熟 MC では AB 陽性顆粒が SO 陽性顆粒よりも優位 (AB>SO) で、成熟に伴って SO 陽性顆粒

が増加し SO 陽性顆粒が AB 陽性顆粒よりも優位になる (AB<SO)。また、分化・成熟に伴って、脱顆粒に関連する GTP 結合タンパク $Gi\alpha 1$ の発現や MC 特異的トリプターゼ (MC トリプターゼ) の発現の増加が認められる。そこで、イヌ皮膚 MCT 症例を用いて、細胞質内顆粒の AB-SO 染色、 $Gi\alpha 1$ および MC トリプターゼの免疫組織化学を行い、MC 細胞の分化度を評価し、MCT 細胞における VEGF-A と Flk-1 の発現との関連性を解析した。その結果、AB-SO 陰性、AB>SO および $Gi1$ 陰性の MCT 症例において VEGF-A と Flk-1 が有意に認められた。以上から、VEGF-A と Flk-1 を発現する腫瘍細胞は、分化・成熟度が低い細胞であると考えられた。このため、VEGF-A/Flk-1 シグナリングは MCT 細胞をより未成熟な状態に維持することによって悪性形質の発現に寄与している可能性が示唆された。

第 3 章の結果、VEGF-A と Flk-1 が MCT の分化・成熟の制御に関与している可能性が予測された。そこで第 4 章では、正常な皮膚 MC においても、VEGF-A と Flk-1 が MC の分化・成熟に対する関与しているかどうかを明らかにするために、「発生過程の皮膚肥満細胞における VEGF-A と VEGFRs の発現」に関する研究を行った。胎生期から成長期のラットの皮膚を用い、分化・成熟の指標となる AB-SO 染色、c-Kit、MC トリプターゼ、および $Gi\alpha 1$ 免疫組織化学、また、高い増殖能を持つ未成熟 MC の指標となる Ki67 免疫組織化学を行い、VEGF-A、Flk1 および Flt1 の発現との関連性を評価した。MC は胎齢 16 日目 (E16) から認められ、生後 7 (D7) ~28 日齢 (D28) にかけて AB>SO MC (未成熟 MC) の減少と AB<SO MC (成熟 MC) の増加、Ki67 陽性 MC の増加が認められたが、D60 と D90 ではほとんどが AB<SO MC であり、Ki67 陽性 MC は認められなかった。Flk-1 陽性反応は E17、Flt1 陽性反応は E19 から MC に認められ、D7~D28 で大部分の MC に発現が認められたが、D60 と D90 ではほとんど認められなかった。VEGF-A 陽性反応は E17 から D90 まで、少数の MC にのみ認められた。これらの結果から、Flk-1 と Flt-1 は分化・成熟過程にある皮膚 MC において発現し、VEGF-A /Flk-1 および VEGF-A /Flt-1 シグナリングの協調的な制御が MC の分化や成熟に関与している可能性が示唆された。

以上の研究から、VEGF-A と Flk-1 の発現がイヌの皮膚 MCT および皮膚 MC の分化・成熟の制御に関与している可能性が示された。そこで、最後に（第 5 章「マウス骨髄由来肥満細胞における VEGF-A と Flk-1 の発現とその機能」）、MC の分化に対する VEGF-A/Flk-1 シグナリングの作用をより詳細に明らかにするために、マウス骨髄由来の初代培養 MC (mBMMC) を用いて、MC の分化過程における VEGF-A および Flk-1 の発現と、MC の分化に伴って増加する c-Kit および MC トリプターゼ、MC 系統への分化を誘導する転写因子 GATA2 および MITF の発現との関連性を検討した。その結果、vegf と Flk-1 mRNA の発現は培養 3 週から認められ 4 週で有意に増加しその後減少した。また、vegf と Flk-1 mRNA の減少後、5 週目から c-kit および GATA2 mRNA の発現が増加した。さらに培養 3.5 週の mBMMC に Flk-1 inhibitor を添加した結果、gata2 と c-kit mRNA の増加が認められた。このことから、VEGF-A/Flk-1 シグナリングは GATA2 と c-Kit の発現を抑制することによって MC の分化・成熟を制御している可能性が示唆された。

本研究では、イヌ研究では、イヌの皮膚 MCT における組織学的悪性度および分化度に対する VEGF-A と VEGFRs の関与を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、VEGF-A および VEGFRs の一つである Flk-1 を発現する MCT は、細胞分化度が低く悪性度の高い腫瘍であることが明らかになった。さらに Flk-1 は、未成熟 MC が皮膚で分化・成熟する過程において GATA2 の発現を抑制することで MC の分化を抑制的に制御していることが示唆された。これらの研究から、イヌの皮膚 MCT では、VEGF-A/Flk-1 シグナリングが MC の転写因子 GATA2 や c-Kit の発現を制御することによって未成熟 MC の形質をそのまま維持させ、この結果 MCT の悪性形質発現に生じている可能性が示された。この機構を抑制することが、イヌ MCT の悪性化を制御するための新しい戦略につながる可能性が考えられる (Fig. 6)。

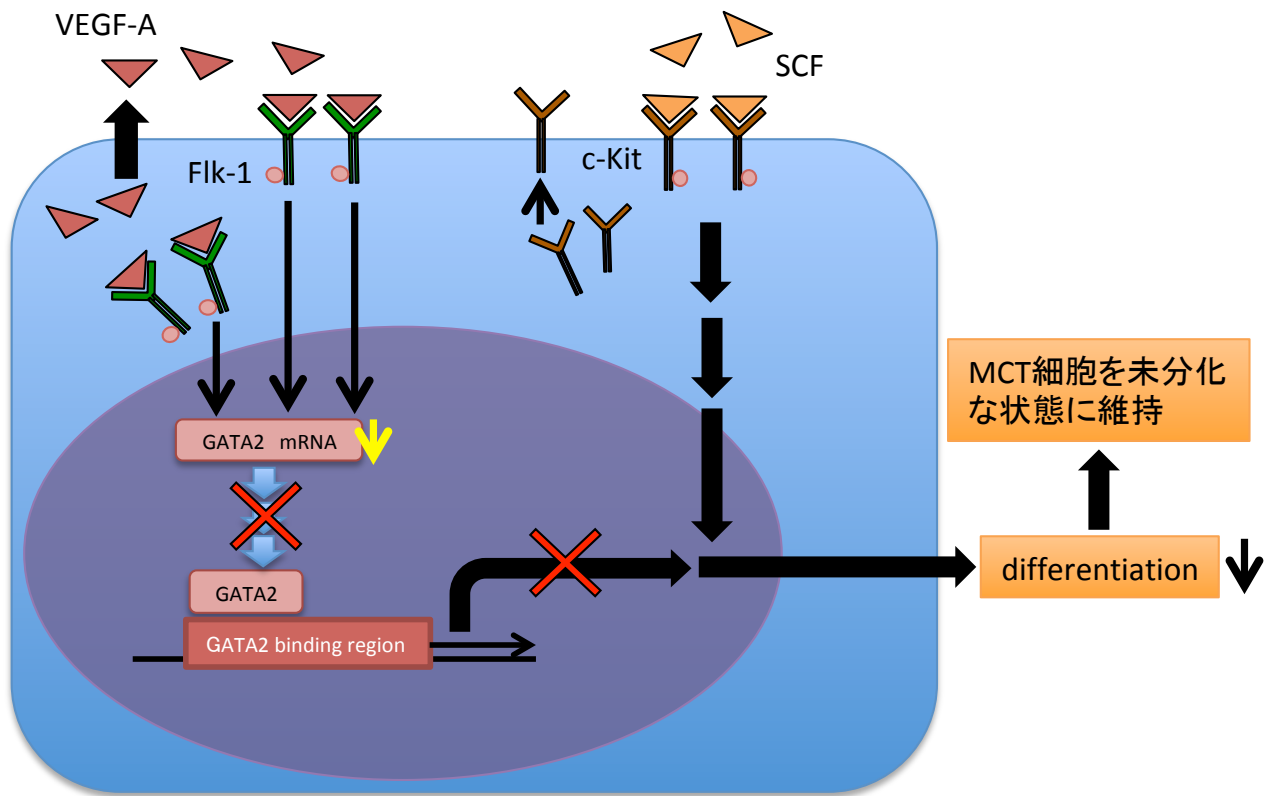


Figure 6 イヌの皮膚MCTにおけるVEGF-A/Flk-1の作用機構

Flk-1を発現するMCTにおいては、Flk-1シグナリングによってGATA2発現による分化を抑制することで、未分化な状態を維持していると考えられる。またVEGF-A、Flk-1を共発現するMCT細胞では、細胞内および細胞外でのオートクライン作用によって、より強く分化が抑制され、悪性度が高くなっていることが示唆される。そのため、この機構を抑制することが、イヌMCTの悪性化を制御するための新しい戦略につながる可能性が考えられる。

謝辞

本博士論文を執筆するにあたりまして、終始あたたかくご指導ご鞭撻を頂きました本学獣医比較動物医学研究室 横須賀 誠 教授、本学獣医解剖学研究室 添田 聡 准教授に心より感謝致します。

また副査としてご指導いただきました、本学獣医看護学応用部門高次機能学研究分野 神谷 新司 教授、本学獣医外科学研究室 原 康 教授、本学獣医病理学研究室 塚田 晃三 教授に心より感謝致します。

第2章および第3章で用いましたイヌの皮膚肥満細胞腫の検体を提供してくださりました、本学附属動物医療センター 安田 暁子 先生、久保 喜昭 先生、ならびに医療センタースタッフの皆様に心より感謝致します。

第5章において用いましたマウス骨髄由来肥満細胞の作製手順をご教授くださいました本学動物生体防御学教室 有村 裕 教授に深謝致します。

本研究に対してご協力頂きました獣医解剖学研究室 大塚 裕忠 講師、ならびに室員の皆さんに深く感謝の意を表します。

参考文献

Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi O and Kido H. (1998) Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clinical and Experimental Allergy*, 28, 1509-1517.

Abdel-Majid RM, Marshall JS. (2004) Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *Journal of Immunology*, 172, 1227-1236.

Abhimayu Jha. (2017) Tumor differentiation: diagnostic and therapeutic implications. *Journal of Pathology of Nepal*, 7, 1202-1210.

Agreste FR, Bombonato PP, Nogueira K, Santos AC, Barreto-Vianna ARC, de Lima EMM. (2015) VEGF System in Dog's Thymus - Temporal Expression. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 211-217.

Ahmed A, Dunk C, Kniss D, Wilkes M. (1977) Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Laboratory Investigation*, 76, 779-791.

Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ. (2000) Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *American Journal of Physiology*, 278, L193-201.

Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. (2009) Immunohistochemical

expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine cutaneous fibrosarcomas. *Journal of Comparative Pathology*, 141, 229-236.

Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. (2010) Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *The Canadian Veterinary Journal*, 51, 1109-1114.

Amagai Y, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. (2014) Production of stem cell factor in canine mast cell tumors. *Research in Veterinary Science*, 96, 124-126.

Andersson MK, Göransson M, Olofsson A, Andersson C, Åman P. (2010) Nuclear expression expression of FLT1 and its ligand PGF in FUS-DDIT3 carrying myxoid liposarcomas suggests the existence of an intracrine signaling loop. *BMC Cancer*, 10, 249.

Artuc M, Steckelings UM, Henz BM. (1999) Mast cell-fibroblast interactions: Human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *Journal of Investigative Dermatology*, 118, 319-395.

Asadi S, Theoharides TC. (2012) Corticotropin-releasing hormone and extracellular mitochondria augment IgE-stimulated human mast-cell vascular endothelial growth factor release, which is inhibited by luteolin. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 85.

Bahramsoltani M, De Spiegelaere W, Janczyk P, Hiebl B, Cornillie P, Plendl J. (2010) Quantitation of angiogenesis in vitro induced by VEGF-A and FGF2 in two different human endothelial cultures – an all-in-one assay. *Clinical and Hemorheology and Microcirculation*, 46, 189-202.

Bai X, Sadat S, Gehmert S, Alt E, Song YH. (2007) VEGF receptor Flk - 1 plays an important role in c-kit expression in adipose tissue derived stem cells. *FEBS Letters*, 581, 4681-4684.

Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. (2004) All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia Research*, 28, 243-248.

Berg BN, Harmison CR. (1957) Growth, disease, and aging in the rat. *The Journal of Gerontology*. 12, 370-377.

Blazquez C, Cook N, Micklem K, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F. (2006) Phosphorylated KDR can be located in the nucleus of neoplastic cells. *Cell Research*, 16, 93-98.

Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HE, Galli SJ. (1998) Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of Fcε receptor I expression. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 1135-1145.

Brogi E, Schattelman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. (1996) Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *The Journal of Clinical Investigation*, 97, 469-476.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *American Journal of Pathology*, 143, 1255-1262.

Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A. (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *American Journal of Pathology*, 159, 993-1008.

Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. (2006) Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 3604-13.

Cai J, Chen Z, Ruan Q, Han S, Liu L, Qi X, Boye SL, Hauswirth WW, Grant MB, Boulton ME. (2011) γ -Secretase and presenilin mediate cleavage and phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 42514-42523.

Cai J, Qi X, Ruan Q, Han S, Chen Z, Podlaski A, Grant MB, Boulton ME. (2012) Non-canonical VEGF receptor signaling regulates retinal neovascularization.

Investigative Ophthalmology and Visual Science, 53, 2993.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-443.

Cao J, Papadopoulou N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL, Theoharides TC. (2005) Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *Journal of Immunology*, 174, 7665-7675.

Caughey, GH. (2006) Tryptase genetics and anaphylaxis. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 117, 1411-1414.

Combs JW, Lagunoff D, Benditt EP. (1965) Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *Journal of Cell Biology*, 25, 577-592.

Cudmore MJ, Hewett PW, Ahmad S, Wang KQ, Cai M, Al-Ani B, Fujisawa T, Ma B, Sissaoui S, Ramma W, Miller MR, Newby DE, Gu Y, Barleon B, Weich H, Ahmed A. (2012) The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nature Communication*, 3, 972.

Da Costa RMG, Matos E, Rema A, Lopes C, Pires MA, Gärtner F. (2007) CD117 immunoexpression in canine mast cell tumors: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research*, 3, 19.

Da Silva L, Fonseca-Alves CE, Thompson JJ, Foster RA, Wood GA, Amorim RL, Coomber BL. (2017) Pilot assessment of vascular endothelial growth factor receptors and trafficking pathways in recurrent and metastatic canine subcutaneous mast cell tumors. *Veterinary Medicine and Science*, 3, 146-155.

Dayton ET, Pharr P, Ogawa M, Serafin WE, Austen KF, Levi-Schaffer F, Stevens RL. (1988) 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular constituency. *PNAS USA* 85, 569-572.

Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E. (1999) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *Journal of Pathology*, 188, 369-377.

de Souza Junior DA, Santana AC, da Silva EZ, Oliver C, Jamur MC. (2015) The Role of Mast Cell Specific Chymases and Trypsases in Tumor Angiogenesis. *BioMed Research International*, 2015, 142359.

Detoraki A, Staiano R I, Granata F, Giannattasio G, Prevete N, de Paulis A, Ribatti D, Genovese A, Triggiani M, Marone G. (2009) Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 1142-1149.

Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. (2000) Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 511-521.

Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Tateno M, Bohlen P, Moore MA, Rafii S. (2001) Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signalling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *PNAS USA*, 98, 10857-10862.

Dikov MM, Oyama T, Cheng P, Takahashi T, Takahashi K, Sepetavec T, Edwards B, Adachi Y, Nadaf S, Daniel T, Gabrilovich DI, Carbone DP. (2001) Vascular endothelial growth factor effects on nuclear factor-kappaB activation in hematopoietic progenitor cells. *Cancer Research*, 61, 2015-2021.

Domingues I, Rino J, Demmers J, Lanerolle P, Santos S. (2011) VEGFR2 Translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS ONE*, 6, 1-14.

Dougher M, Terman BI. (1999) Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, 18, 1619-1627.

Enerbäck L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinalmucosa. Effects of fixation. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 66, 289-302.

Enerbäck L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinalmucosa. Dye-binding and

metachromatic properties. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 66, 303-312.

Enerbäck L. (1986) The evolution of the concept of a specific mucosal mast cell; in Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA (eds): Mast Cell Differentiation and Heterogeneity. *New York, Raven Press*, 1-26

Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Caldwell RB. (1999) VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256, 192-197.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews*, 13, 18-32.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380, 439-442.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9, 669- 676.

Fox SB, Turley H, Cheale M, Blazquez C, Roberts H, James N, Cook N, Harris A, Gatter K. (2004) Phosphorylated KDR is expressed in the neoplastic and stromal elements of human renal tumours and shuttles from cell membrane to nucleus.

Journal of Pathology, 202, 313-320.

Fragoso R, Elias AP, Dias S. (2007) Autocrine VEGF loops, signaling pathways, and acute leukemia regulation. *Leukemia & Lymphoma*, 48, 481-488.

Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. (1998) Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11197-11204.

Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP. (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vivo*. *Blood*, 92, 4150-4166.

Gampel A, Moss L, Jones MC, Brunton V, Norman JC, Mellor H. (2006) VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood*, 108, 2624-2631.

García-Román J, Ibarra-Sánchez A, Lamas M, González Espinosa C. (2010) VEGF secretion during hypoxia depends on free radicals-induced Fyn kinase activity in mast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 401, 262-267.

Giles FJ. (2001) The vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *The Oncologist*, 6, 32-39.

Gentek R, Ghigo C, Hoeffel G, Bulle MJ, Msallam R, Gautier G, Launay P, Chen J, Ginhoux F, Bajenoff M. (2018) Hemogenic endothelial fate mapping reveals dual developmental origins of mast cells. *Immunity*. 48: 1160-1171.

Gerber H, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. (2002) VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 417, 954-958.

Gerber HP, Ferrara N. (2003) The role of VEGF in normal neoplastic hematopoiesis. *Journal of Molecular Medicine*, 81, 20-31.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Pezzella F, Sivridis E, Turley H, Harris AL, Gatter KC. (2008) Phosphorylated VEGFR2/KDR receptors are widely expressed in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and correlate with hypoxia inducible factor activation. *Hematological Oncology*, 26, 219-224.

Giles FJ. (2001) The vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *The Oncologist*, 6, 32-39.

Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H, Ramamurthy NS. (1989) Synovial. Procollagenase Activation by Human Mast Cell Tryptase Dependence upon Matrix Metalloproteinase 3 Activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 5, 1657-62.

Harigae, H., S. Takahashi, N. Suwabe, H. Ohtsu, L. Gu, Z. Yang, F. Y. Tsai,

Y. Kitamura, J. D. Engel, M. Yamamoto. (1998) Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells*, 3, 39-50.

Halsey CHC, Thamm DH, Weishaar KM, Burton JH, Charles JB, Gustafson DL, Avery AC, Ehrhart EJ. (2017) Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. *Veterinary Pathology*, 54, 387-394.

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. (2002) Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine*, 8, 841-849.

Heloterä H. and Alitalo K. (2007) The VEGF family, the inside story. *Cell*, 130, 591-592.

Huang Y, Chen X, Dikov MM, Novitskiy SV, Mosse CA, Yang L, Carbone DP. (2007) Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood*, 110, 624-631.

Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. (1986) Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *PNAS USA*, 83, 4464-4468.

Isozaki K, Tsujimura T, Nomura S, Morii E, Koshimizu U, Nishimune Y, Kitamura Y (1994) Cell type-specific deficiency of c-kit gene expression in mutant

mice of *mi/mi* genotype. *American Journal of Pathology*, 145, 827.

Jippo T, Mizuno H, Xu Z, Nomura S, Yamamoto M, Kitamura Y. (1996) Abundant expression of transcription factor GATA-2 in proliferating but not in differentiated mast cells in tissues of mice: demonstration by *in situ* hybridization. *Blood*, 87, 993-998.

Jippo T, Morii E, Ito A, Kitamura Y. (2003) Effect of anatomical distribution of mast cells on their defense function against bacterial infections: demonstration using partially mast cell-deficient *tg/tg* mice. *Journal of Experimental Medicine*, 197, 1417-1425.

Kato Y, Asano K, Mogi T, Kutara K, Teshima K, Edamura K, Tsumagari S, Hasegawa A, Tanaka S. (2007) Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factor in dogs with mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69, 77-80.

Kampen KR. (2012) The mechanisms that regulate the localisation and overexpression of VEGF receptor-2 are promising therapeutic targets in cancer biology. *Anticancer Drugs*, 23, 347-354.

Kendall RL, Thomas KA. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *PNAS USA*, 90, 10705-10709.

Kitamura Y. (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between

subpopulations. *Annual Reviews of Immunology*, 7, 59-76.

Kiupel M. (2017) Mast cell tumors. In: *Tumors in Domestic Animals, 5th Edit.*, DJ Meuten Eds., Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 176-202.

Kiupel M, Webster JD, Kaneene, JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. (2004) The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 41, 371-377.

Kohara Y, Soeta S, Izu Y, Amasaki H. (2015) Accumulation of type VI collagen in the primary osteon of the rat femur during postnatal development. *Journal of Anatomy*, 226, 478-488.

Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraha S. (2007) Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLOS Medicine*, 4, e186.

Levi-Schaffer F, Austen KF, Gravalles PM, Stevens RL. (1986) Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *PNAS USA*, 83, 6485-6488.

Li Y, Qi X, Liu B, Huang H. (2015) The STAT5-GATA2 pathway is critical in basophil and mast cell differentiation and maintenance. *Journal of Immunology*, 194, 4328-4338.

London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. (1999) Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology*, 27, 689-697.

Lundequist A, Pejler G. (2011) Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cellular and Molecular Life Science*, 68, 965-975

Masuda A, Hashimoto K, Yokoi T, Doi T, Kodama T, Kume H, Ohno K, Matsuguchi T. (2007) Essential role of GATA transcriptional factors in the activation of mast cells. *Journal of Immunology*, 178, 360-368.

McHale C, Mohammed Z, Gomez G. (2019) Human skin-derived mast cells spontaneously secrete several angiogenesis-related factors. *Frontiers in Immunology*, 10, 1445.

McMahon G. (2000) VEGF receptor signalling in tumor angiogenesis. *The Oncologist*, 5, 3-10.

Mittar S, Ulyatt C, Howell GJ, Bruns AF, Zachary I, Walker JH, Ponnambalam S. (2009) VEGFR1 receptor tyrosine kinase localization to the Golgi apparatus is calcium-dependent. *Experimental Cell Research*, 315, 877-889.

Morii E, Oboki K, Ishihara K, Jippo T, Hirano T, Kitamura Y. (2004) Roles of MITF for development of mast cells in mice: effects on both precursors and tissue environments. *Blood*, 104, 1656-61.

Mousavi SA, Skjeldal F, Fønhus MS, Haugen LH, Eskild W, Berg T, Bakke O. (2019) Receptor-mediated endocytosis of VEGF-A in rat liver sinusoidal endothelial cells. *BioMed Research International*, 2019, 5496197.

Newman SJ, Mrkonjich L, Walker KK, Rohrbach BW. (2007) Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. *Journal of Comparative Pathology*, 136, 231-239.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. (2006) VEGF receptor signalling ? in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 359-371.

Okayama Y, Saito H, Ra C. (2008) Targeting human mast cells expressing g-protein-coupled receptors in allergic diseases. *Allergology International*, 57, 197-203.

Pardanani A, Lasho T, Chen D, Kimlinger TK, Finke C, Zblewski D, Patnaik MM, Reichard KK, Rowinsky E, Hanson CA, Brooks C, Tefferi A. (2015) Aberrant expression of CD123 (interleukin-3 receptor- α) on neoplastic mast cells. *Leukemia*, 29, 1605-1608.

Pardanani A, Reichard KK, Zblewski D, Abdelrahman RA, Wassie EA, Morice Ii WG, Brooks C, Grogg KL, Hanson CA, Tefferi A, Chen D. (2016) CD123 immunostaining patterns in systemic mastocytosis: differential expression in disease subgroups and potential prognostic value. *Leukemia*, 30, 914-918.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. (1994) Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 25646-25654.

Patnaik AK, Ehler WJ and MacEwen EG (1984) Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*, 21, 469-474.

Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. (2007) Mast cell proteases. *Advances in Immunology*, 95, 167-255.

Pejler G, Rönnberg E, Waern I, Wernersson S. (2010) Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 115, 4981-4990.

Pisacane AM, Risio M (2005) VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry in human melanocytic naevi and cutaneous melanomas. *Melanoma Research*, 15, 39-43.

Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. (2000) Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 16986-16992.

Rebuzzi L, Willmann M, Sonneck K, Gleixner KV, Florian S, Kondo R, Mayerhofer M, Vales A, Gruze A, Pickl WF, Thalhammer JG, Valent P. (2006) Detection of

vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115, 320-333.

Reguera MJ, Rabanal RM, Puigdemont A, Ferrer L. (2000) Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *The American Journal of Dermatopathology*, 22, 49-54.

Ribatti D, Crivellato E, Candussio L, Nico B, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. (2001) Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clinical and Experimental Allergy*, 31, 602-608.

Riva F, Brizzola S, Stefanello D, Crema S, Turin L. (2005) A study of mutation in the c-kit Gene of 32 dogs with mastocytoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 385-388.

Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA. (1998) Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Experimental Cell Research*, 241, 161-170.

Rogers KS. (1996) Mast cell tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 26, 87-102.

Rosenbaum-Dekel Y, Fuchs A, Yakirevich E, Azriel A, Mazareb S, Resnick MB, Levi BZ. (2005) Nuclear localisation of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Communications*, 332, 271-278.

Rottem M, Goff JP, Albert JP, Metcalfe DD. (1993) The effects of stem cell factor on the ultrastructure of Fc epsilon RI+ cells developing in IL-3-dependent murine bone marrow-derived cell cultures. *Journal of Immunology*, 151, 4950-4963.

Ryan JJ, Huang H, McReynolds LJ, Shelburne C, Hu-Li J, Huff TF, Paul WE. (1997) Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Experimental Hematology*, 25, 357-62.

Santos SC, Dias S. (2004) Internal and external autocrine VEGF/KDR loops regulate survival of subsets of acute leukemia through distinct signalling pathways. *Blood*, 103, 3883-3889.

Santos SC, Miguel C, Domingues I, Calado A, Zhu Z, Wu Y, Dias S. (2007) VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing. *Experimental Cell Research*, 313, 1561-1574.

Santos AAF, Olivetra JT, Lopes CCC, Amorim IF, Vicente CM, Gärtner FR, Matos AJ. (2010) Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 268-275.

Scheid A, Wenger RH, Schäffer L, Camenisch I, Distler O, Ferenc A, Cristina H, Ryan HE, Johnson RS, Wagner KF, Stauffer UG, Bauer C, Gassmann M, Meuli M. (2002) Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate

hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *FASEB J.* 16(3), 411-413.

Schuh AC, Faloon P, Hu QL, Bhimani M, Choi K. (1999) In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *PNAS USA.* 96, 2159-2164.

Scott JE, Quintarelli G, Dellovo MC. (1964) The chemical and histochemical properties of Alcianblue. *Histochemie.* 4, 73-85.

Shelburne CP, McCoy ME, Piekorz R, Sexl V, Roh KH, Jacobs-Helber SM, Gillespie SR, Bailey DP, Mirmonsef P, Mann MN, Kashyap M, Wright HV, Chong HJ, Bouton LA, Barnstein B, Ramirez CD, Bunting KD, Sawyer S, Lantz CS, Ryan JJ. (2003) Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. *Blood,* 102, 1290-1297.

Shi H, Drummond CA, Fan X, Haller ST, Liu J, Malhotra D, Tian J. (2016) Hiding inside? Intracellular expression of non-glycosylated c-kit protein in cardiac progenitor cells. *Stem Cell Resezrch,* 16, 795-806.

Shibuya M. (2001) Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,* 33, 409-420.

Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Déléris G. (2003) Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Current Medical*

Chemistry, 3, 95-117.

Siemeister G, Martiny-Baron G, Marmé D. (1998) The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Review*, 17, 241-248.

Stewart M, Turley H, Cook N, Pezzella F, Pillai G, Ogilvie D, Cartlidge S, Paterson D, Copley C, Kendrew J, Barnes C, Harris AL, Gatter KC. (2003) The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology*, 43, 33-39.

Szukiewicz D, Gujski M, Maslinska D, Szewczyk G, Bachanek M, Maslinski S. (2005) Mast cell-derived VEGF and VEGF receptor type 1, 2, and 3 expression in human term trophoblast culture--influence of hypoxia. *Inflammation Research*, 54, S82-S83.

Takahashi H, Shibuya M (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109, 227-241.

Takano H, Nakazawa S, Okuno Y, Shirata N, Tsuchiya S, Kainoh T, Takamatsu S, Furuta K, Taketomi Y, Naito Y, Takematsu H, Kozutsumi Y, Tsujimoto G, Murakami M, Kudo I, Ichikawa A, Nakayama K, Sugimoto Y, Tanaka S. (2008) Establishment of the culture model system that reflects the process of terminal differentiation of connective tissue-type mast cells. *FEBS Letter*, 582, 1444-1450.

Thompson JJ, Morrison JA, Pearl DL, Boston SE, Wood GA, Foster RA, Coomber BL. (2016) Receptor tyrosine kinase expression profiles in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 53, 545-558

Thompson JJ, Yager JA, Best SJ, Pearl DL, Coomber BL, Torres RN, Kiupel M, Foster RA. (2011) Canine subcutaneous mast cell tumor : characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology*, 48, 156-168.

Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ. (1991) Induction of mast cell proliferation, maturation and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *PNAS USA*, 88, 6382-6386.

Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, 371, 221-226.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. (2000) Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research*, 60, 203-212.

Vincent L, Jin DK, Karajannis MA, Shido K, Hooper AT, Rashbaum WK, Pytowski B, Wu Y, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Niesvizky R, Rafii S. (2005) Fetal stromal-dependent paracrine and intracrine vascular endothelial growth factor-A/vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes proliferation and motility of human primary myeloma cells. *Cancer Research*, 65,

3185-3192.

Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, Lee HJ, Lee HH, Hung MC. (2010) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399, 498-504.

Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, Smith ED, Lancki DW, Gurish MF, Friend DS, Stevens RL, Anastasi J, Singh H. (2002) Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in specification of myeloid cell fates. *Immunity*, 17, 665-676.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 26988-26995.

Wen Y, Edelman J L, Kang T, Zeng N, Sachs G. (1997) Two functional forms of vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 mRNA are expressed in normal rat retina. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 2090-2097.

Yee NS, Langan H, Besmer. (1993) Mechanism of kit ligand, phorbol ester and calcium-induced down-regulation of c-kit receptors in mast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 14189-14201.

Yonemaru K, Sakai H, Murakami T, Yanai T, Masegi T. (2006) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, and Their

Receptors (Flt-1, Flk-1, and Flg-1) in Canine Vascular Tumors. *Veterinary Pathology*, 43, 971-980.

Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors, and other angiogenic factors in breast cancer. *Cancer Research*, 56, 2013-2016.

Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. (2002) Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins, beta gamma subunits, small GTPase CDC42, and partly by Rac-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 4003-4009.

Zhang Y, Pillai G, Gatter K, Blazquez C, Turley H, Pezzella F, Watt SM. (2005) Expression and cellular localization of vascular endothelial growth factor A and its receptors in acute and chronic leukemias: an immunohistochemical study. *Human Pathology*, 36, 797-805.

Zhao D, Pan J, Gilbert C, Drews-Elgar K, Azzam DJ, Picon-Ruiz M, Kim M, Ullmer W, El-Ashry D, Creighton CJ, Slingerland JM. (2015) VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signalling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene*, 34, 3107-3119.