

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591998

研究課題名（和文） 膜結合型増殖因子の分子機構：リンパ浮腫治療戦略の創成

研究課題名（英文） Molecular mechanism of transmembrane proteins : Construction of therapeutic strategy for lymph edema

研究代表者

中岡 啓喜 (Nakaoka Hiroki)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172266

研究成果の概要（和文）：

組織再生に関与する増殖因子のうち、血管・リンパ管新生に関わる増殖因子の作用を検討した。リンパ管内皮細胞の膜表面では、特異的蛋白質の shedding が誘導され、内皮細胞の遊走が促進された。本研究課題は、リンパ管新生に関わる分子機構の一つを解明した。この結果、今後リンパ浮腫治療の基盤を創出する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The present study demonstrated that endogenous or ectopic growth factors induce the ectodomain shedding of type I transmembrane proteins in cultured human dermal lymphatic endothelial cells. The ectodomain shedding enhanced the endothelial cell migration. Thus, these results indicate that the membrane-anchored proteins can promote lymphangiogenesis, and provide a novel therapeutic strategy for lymph edema.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学・リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

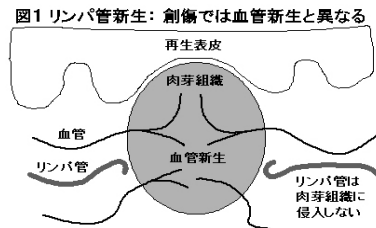
(1) 悪性腫瘍の外科的治療に起因するリンパ管欠損はリンパ浮腫を引き起こし、整容上大きな問題となる。平成19年4月の「がん対策基本法」により医療政策においてがん克服と quality of life の改善を目指すことは重要課

題とされ、治療に続発する合併症の新規治療を創出する取り組みは国民に寄与する。

(2) 近年、諸臓器の再生において器官の生着と維持を図るためには血管系の再生のみならず、血管系とともに循環系をになうリンパ系は機能的に極めて重要な役割を果たす。しかし、

その詳細は未だ明らかではない。リンパ浮腫はリンパ管の損傷および欠損に起因するため、リンパ管の制御機構の解明、再生を目指した治療戦略は重要な課題となる。

(3) 創傷治癒において既存血管から新生血管が誘導され、リンパ管も再生される。しかし、再生肉芽を病理組織学的に観察してもリンパ管を見出すことが必ずしも出来ない(図1)。



(4) リンパ管基礎研究を進める上で、リンパ管内皮細胞を用いた培養系の確立が不可欠であったが、我々はヒト皮膚からリンパ管及び血管内皮細胞を選択的に単離し、世界に先駆けて培養することに成功した(Hirakawa et al. Am J Pathol 2003)。背景にはリンパ管特異的マーカーが明らかになったこと、リンパ管内皮増殖因子が同定されたことが挙げられる。1990年代 Prox1, LYVE-1, VEGFR-3, podoplaninをはじめとするリンパ管特異的遺伝子群が相次いで報告され、またリンパ管特異的分子に対する抗体も作製され、病理組織学的にリンパ管を同定することが可能となった。他方、リンパ管内皮細胞の特異的増殖因子として VEGFR-3 のリガンド Vascular endothelial growth factor (VEGF) -C, -D が同定された。申請者らは、従来血管新生因子とされていた Vascular endothelial growth factor (VEGF) -A や Hepatocyte growth factor がリンパ管内皮細胞の増殖を促し、多彩な増殖因子がリンパ管内皮細胞に作用することを見出した (Hirakawa et al. J Exp Med, 2005; Kajiya, Hirakawa et al. EMBO J, 2005; Hirakawa et al. Am J Pathol, 2003)。しかし、皮膚創傷治癒においてリンパ管新生を誘

導し、リンパ浮腫を防ぐ決定的な増殖因子は同定されていないため、皮膚創傷治癒過程で特異的に発現する増殖因子のなかで、リンパ管に作用する因子を検討する必要性を示唆される。

(5) 皮膚創傷治癒過程では、欠損部に肉芽組織と表皮が再生するが、再生表皮と肉芽組織は密に連携し、表皮角化細胞から分泌される様々な液性因子により、血管内皮細胞をはじめとする間葉系細胞が誘導される。皮膚創傷治癒過程において、表皮が産生する代表的な増殖因子である epidermal growth factor (EGF) ファミリーは膜結合型増殖因子であり、この群には TGF- α 、Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、amphiregulin、epiregulin が含まれる。中でも HB-EGF、epiregulin は皮膚創傷治癒過程で特異的に誘導され、いずれも EGF receptor に結合する。EGF ファミリーは、表皮再生に重要な役割を果たすことが知られ、我々の作製した表皮特異的 HB-EGF ノックアウト・マウスでは創傷治癒過程が遅延する (Shirakata et al. J Cell Sci, 2005)。一方、血管内皮細胞をはじめとする間葉系細胞も EGF receptor を発現するが、リンパ管内皮細胞における EGF receptor の発現と EGF シグナルの重要性は世界的に報告がない。我々は準備実験で、ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞は HB-EGF 並びに EGF receptor を発現することを初めて見出した (図2)。つまり、皮膚疾患モデルにおける EGF シグナルが脈管系の増殖に重要な役割を持ち、皮膚創傷治癒過程のリンパ管新生も制御している可能性が示唆された。

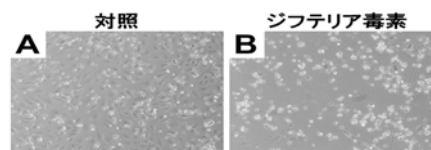


図2 リンパ管内皮細胞: 毒素による細胞死 HB-EGF (特異的受容体) の存在を示唆

2. 研究の目的

(1) 概要：膜結合型増殖因子Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)を始め、VEGF-Aなど内皮細胞増殖因子がリンパ管新生を誘導し、リンパ浮腫の新たな治療戦略を創成することを目的とする。近年、数々の分泌型細胞増殖因子のリンパ管新生作用が解明されたが、膜結合型増殖因子のリンパ管新生作用は不明である。悪性腫瘍術後のリンパ浮腫改善のためには、新たなリンパ管新生機構を解明する必要がある。本研究では、独自に作製した表皮特異的HB-EGFトランスジェニック・マウスに皮膚創傷およびリンパ浮腫を作成し、HB-EGFによるリンパ管新生作用を検討し、膜結合型増殖因子によるリンパ浮腫治療を目指す。

(2) 何をどこまで明らかにしようとするのか：表皮特異的HB-EGF トランスジェニック・マウス背部に創傷を作成し、治癒過程における血管・リンパ管新生の亢進、すなわちEGFシグナルが脈管形成に及ぼす効果を評価する。さらに、同マウスおよび対照群の尾にリンパ浮腫を誘導し、同マウスで強発現したHB-EGF がリンパ管新生の亢進とリンパ浮腫改善を誘導することを検討し、EGF シグナルによるリンパ浮腫治療の可能性を検討する。

(4) 本研究の特色・独創性および予想される結果と意義

①特色・独創性：当該研究室固有の遺伝子改変マウスに基づき、EGF, VEGFファミリーとリンパ管内皮細胞に関する研究業績を融合し、リンパ浮腫の新たな治療の創出を目指す研究は世界的に類が無く、斬新かつ独創的である。
②予想される結果：HB-EGF がリンパ管新生を誘導する新たな増殖因子として同定される。さらにマウス皮膚創傷治癒過程で、EGF シグナルが表皮に限らず、リンパ管、血管再生に重要な役割を果たすことが見出される。

③意義：新たなリンパ管の制御機構の解明に立脚し、リンパ浮腫治療を目指す本研究は医学的に重要かつ実現可能なものである。

3. 研究の方法

(1) 概要

- ①表皮特異的HB-EGF 強発現トランスジェニック・マウス (K5 Dox HB-EGF TG) の作製。
- ②K5 Dox HB-EGF TG 皮膚創傷を作成し、創傷治癒促進効果を評価する：対照群と比較し、血管・リンパ管新生の亢進を組織学的に検討する。さらに、HB-EGF に基づくEGF シグナル活性化を同定し、リンパ管新生への関わりを生化学的に評価する。
- ③K5 Dox HB-EGF TG 皮膚を用いたリンパ浮腫モデルを作成し、HB-EGF によるリンパ浮腫軽減効果を検討：肉眼的grade と組織学的変化に基づき評価する。
- ④K5 Dox HB-EGF TG 由来表皮角化細胞のectodomain shedding を評価する：初代培養を樹立し、HB-EGF の切断とEGF シグナルの活性化をWestern blot により検出する。

(2) 2010年度：表皮特異的HB-EGF誘導発現マウスの作製 (K5 Dox HB-EGF TG)

- ①TRE-HB-EGF TGの作製：表皮特異的HB-EGF 発現マウスは体外受精にてわずかに1系統のみ生まれたが、系統維持できなかった。これは胎生期の着床に問題があったため、我々は遺伝子発現誘導システムに基づき、表皮特異的にHB-EGFを強発現するトランスジェニック・マウスを考案した。遺伝子誘導はドキシサイクリン(Dox) を用い、pTRE-Tight vector (Clontech, Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System)を用いてテトラサイクリン・レスポンス・エレメント下に*HB-EGF* cDNAをコードするベクターを構築しトランスジェニック・マウスを作製した。
- ②K5-rtTA TGの作製：rtTAを発現するベクターを作製し、pTet-on-Advanced vector

(Clontech)をベースに、CMVプロモーターを、表皮特異的K5 promoterに置換し、トランスジェニック・マウスを作製した。

③表皮特異的HB-EGF誘導発現マウスの作製：TRE-HB-EGF TGとK5-rtTA TGを交配し、ダブルトランスジェニック・マウスであるK5 Dox HB-EGF TGを得る。当該マウスにDoxを投与することにより、表皮特異的にHB-EGFを誘導する。本研究ではDoxの至適濃で表皮特異的HB-EGF 強発現マウスの作製度を検討し、創傷形成に先立ちHB-EGF を皮膚特異的に発現し、Western blot で検出し測定評価する。

(3)2011年度：マウス創傷治癒、リンパ浮腫の評価

①背部皮膚全層創傷

生後8週齢のK5 Dox HB-EGF TG及び対照群、それぞれ7匹ずつ用いて、麻酔後、背部を除毛し、直径8mmの創傷を作成する。創傷面を経時的に観察し、創傷面積の測定、肉芽形成の評価を行う。

②尾部皮膚創傷<リンパ浮腫モデル>

K5 Dox HB-EGF TGと対照群マウス尾部皮膚を、全周性に真皮レベルで幅2mmにわたり切除する。皮膚欠損部にI型コラーゲンとシリコンを注入し、リンパ流の再疎通障害による末梢部リンパ浮腫を誘導後、経時的にリンパ浮腫のgradeを評価する。

③皮膚病変の組織学的検討

【H&E染色による検討】

創傷治癒過程におけるリンパ浮腫の形成に着目し、肉芽組織の浮腫と組織内への脈管侵入をK5 Dox HB-EGF TG、対照群で比較検討する。

【血管・リンパ管特異抗体による評価】

血管特異性の抗体MECA-32 (BD Biosciences)、リンパ管特異性の抗LYVE-1抗体(MBL)を用いて蛍光二重染色を行い、肉芽組織における血管・リンパ管新生をK5 Dox HB-EGF TGと対照群で比較検討する。IP-Lab softwareを用いて

脈管密度、脈管系及び脈管占有面積を画像解析測定し、有意差を検定する。

【増殖または細胞死マーカーによる検討】

標本作製に先立ちBrdUを腹腔内投与し増殖細胞を標識した後、抗BrdU抗体とMECA-32、または抗LYVE-1抗体で二重染色を行い、内皮細胞の増殖活性を見出す。一方、血管・リンパ管の内皮細胞アポトーシスをTUNNEL法により同定し、その抑制を見出す。

【リン酸化特異抗体によるEGF receptorの評価】

EGF receptor に対するリン酸化抗体pEGFR (Santa Cruz)を用いて、肉芽組織に再生した血管・リンパ管に発現するEGF receptorの活性化によりEGFシグナルのリンパ管内皮細胞での活性化を評価する。

(4)2012年度：Ectodomain shedding の評価
K5 Dox HB-EGF TG は、表皮角化細胞がHB-EGFを強発現するモデルである。従って、表皮角化細胞に発現したHB-EGF がリンパ管内皮細胞を活性化するためには、HB-EGF が表皮角化細胞膜表面から遊離しなければならない。多彩な刺激により、HB-EGF は膜型マトリックス分解酵素により切断され、細胞外領域が遊離することが知られている。そこで本研究課題では、K5 Dox HB-EGFTG の表皮角化細胞で、HB-EGF に対するshedding の亢進を示す。

①培養系におけるshedding の評価

K5 Dox HB-EGF TG 及び対照群新生仔より表皮角化細胞の初代培養を行う。PMA 刺激下、HB-EGFのshedding がK5 Dox HB-EGF TG で亢進していることを評価する。培養細胞にPMA 添加1時間後、蛋白を回収する。SDS-PAGE 後、HB-EGF に対するWestern blot をHB-HGF 細胞外領域に対する特異抗体でHB-EGF を検出し、shedding による切断片を検出する。

②皮膚創傷におけるshedding の評価

創傷作成後、皮膚から蛋白を抽出し、Westernblot を行う。K5 Dox HB-EGF TG にお

けるHB-EGFのshedding 亢進を評価する。

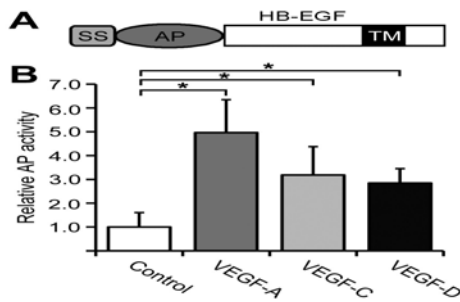


図3 アルカリフォスファターゼ融合蛋白の発現及びsheddingの評価

4. 研究成果

(1)アルカリフォスファターゼを用いたレポーター・システムの構築：Fusion proteinを図3Aのごとくデザインした。HB-EGFのN末にシグナルペプチド(SS)及びアルカリフォスファターゼ(AP)を融合し、アデノウイルス・ベクターを構築 ectodomain sheddingを効率良く誘導した。さらに、添加した VEGFの濃度も検討し、VEGF-Aが50 ng/mlでsheddingを誘導する一方、VEGF-C及びVEGF-Dでは500 ng/mlを要した。LYVE-1を用いた検討でも、同様の結果を得た(図3B)。

(2)変異型蛋白による sheddingの解除：細胞外領域のshedding responsible elementを欠失した蛋白を発現し、sheddingを評価した。この結果、変異型蛋白では VEGF-Aによるsheddingが解除された(図4)。LYVE-1を用いた検討でも、同様の結果を得た(図4)。この結果は、VEGF-Aによりリンパ管膜蛋白がectodomain sheddingを受けることを示唆するものであり、内皮細胞の増殖因子がリンパ管内皮細胞の膜表面を修飾することによることを示すものである。

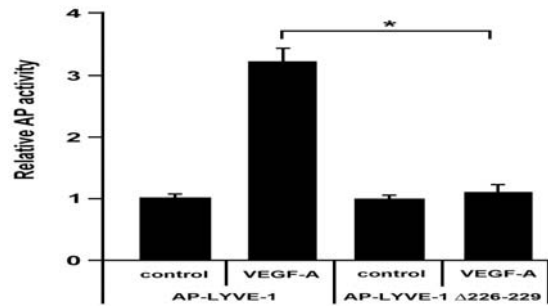


図4 変異型蛋白による sheddingの解除

(3)Ectodomain sheddingを介した細胞遊走：培養リンパ管内皮細胞に野生型または変異型蛋白を発現し、transwellを用いて細胞遊走を検討した。VEGF-Aによる刺激を加えると、野生型ではsheddingが誘導され、リンパ管内皮細胞の遊走が強調された。しかし、変異型では細胞遊走が解除された。LYVE-1を用いた検討でも、同様の結果を得た(図5)。この結果は、リンパ管内皮細胞の膜蛋白のsheddingが、細胞遊走を介してリンパ管新生を促進することを示すものである。

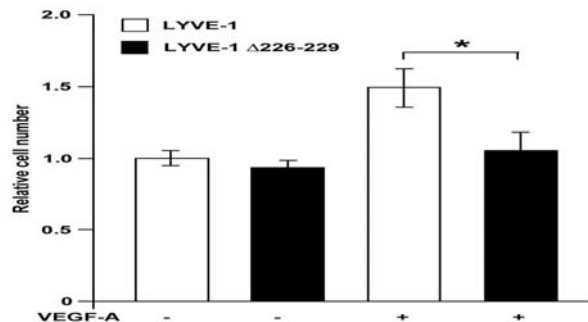


図5 VEGF-Aによる細胞遊走評価

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

- ① 中岡啓喜、顔面腫瘍(瘤)の分類 - 受診世代による分類とその特徴 -、形成外科、査読有、56巻、2013、365-376
- ② 中岡啓喜、基底細胞癌に関するクリニカル・クエッションを作成して、形成外科、査読有、55巻、2012、737-746
- ③ Sasaki N, Shinjo M, Hirakawa S, Nishinaka M, Tanaka Y, Mawatari K,

- Kitamori T, Sato K. A palmtop-sized microfluidic cell culture system driven by a miniaturized infusion pump. *Electrophoresis*. 2012; 33:1729-1735.
- ④ Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet. *B J Dermatol*. 2012; 39: 366-74.
- ⑤ 山下昌宏、中岡啓喜、森秀樹、松本健吾、見崎麻由、手術治療を要した毛細血管奇形症例の検討、日本形成外科学会誌、査読有、31巻、2011、7-13
- ⑥ Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res*. 2011; 71:7502-12.
- ⑦ Kerjaschki D, Bago-Horvath Z, Rudas M, Sexl V, Schneckleithner C, Wolbank S, Bartel G, Krieger S, Kalt R, Hantusch B, Keller T, Nagy-Bojarszky K, Huttary N, Raab I, Lackner K, Krautgasser K, Schachner H, Kaserer K, Rezar S, Madlener S, Vonach C, Davidovits A, Nosaka H, Hämmerle M, Viola K, Dolznig H, Schreiber M, Nader A, Mikulits W, Gnant M, Hirakawa S, Detmar M, Alitalo K, Nijman S, Offner F, Maier TJ, Steinhilber D, Krupitza G. Lipoxigenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. *J Clin Invest*. 2011; 121:2000-12.
- ⑧ 中岡啓喜、母斑症、形成外科、査読有、53巻、2010、765-774
- ⑨ 中岡啓喜、口唇の体表悪性腫瘍における治療戦略、PEPARS、査読有、46巻、2010、41-49
- ⑩ 平川聡史、リンパ管の発生・再生 基礎から臨床へ 皮膚疾患とリンパ管新生病態 解明を目指して、リンパ学、査読有、33巻、2010、48-49
- ⑪ Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K, PPAR γ mediates innate immunity by regulating the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human

keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2010; 60:179-86.

- ⑫ Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K. E2 polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem*. 2010; 39:30042-9.

[学会発表] (計1件)

- ① 平川聡史. 皮膚と循環: 血管・リンパ管から考える病態生理. シンポジウム: 階層的循環システム構築の機序とその破綻 (指定演題) 第90回日本生理学会大会. 平成25年3月28日. 東京.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 血管透過性亢進抑制作用の評価法
発明者: 山内 豊彦、平川聡史、山下 豊、戸倉新樹

権利者: 国立大学法人浜松医科大学・浜松ホトニクス株式会社

種類: 特許願

番号: 特願 2013-034570

出願年月日: 2013年2月25日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中岡 啓喜 (Nakaoka Hiroki)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 30172266

(2) 研究分担者

平川 聡史 (Hirakawa Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50419511