

令和元年5月17日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10953

研究課題名(和文) 機能的リンパ管及びリンパ節の再生誘導

研究課題名(英文) Investigation of the regeneration mechanism of lymphatics and lymph nodes

研究代表者

清水 一彦 (Shimizu, Kazuhiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90385394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は機能的リンパ管とリンパ節の再生機序を明らかにすることを目的として、リンパ節移植の形態学的解析、創傷モデルを用いたリンパ管マーカー陽性細胞の形態、機能解析、の2つのモデルを用いて研究を進めた。

については、リンパ節を移植後、経時的に観察を行った。その結果、リンパ節内部の構造が回復するまでには、移植後数ヶ月後を要した。については舌創傷治癒モデルを用いて解析を行った。創傷作製後1日目にリンパ管マーカーであるPDPNに陽性の細胞が多数出現し、PDPNが細胞内シグナル経路を活性化することでケモカイン等を産生し、大食細胞等の組織修復に関わる細胞を遊走させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は自然再生することはないリンパ節を移植することにより再生させ、さらにリンパ管再生誘導を目的としたリンパ管マーカー陽性細胞の性状を調査した。

リンパ節移植はリンパ浮腫の治療法として注目されており、その再生過程の経時的な変化を明らかにしたことの社会的意義は非常に大きい。また、リンパ管マーカー陽性細胞が組織修復に関わる事を明らかにした。この結果は今までに全く知られておらず、基礎医学的・生物学的な意義は極めて高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：The final aim of this study was investigate of the mechanisms of lymph node regeneration and functional lymphatic vessels regeneration. So we devised a lymph node transplantation model and wound healing model. First, the lymph nodes were transplanted in mouse inguinal region and we observed lymph node regeneration. As a result, several months were required to repair the internal structure of the transplanted lymph nodes. Second, we observed lymphatic marker-positive cells using a tongue wound healing model. A lot of PDPN (one of lymphatic marker)-positive cells appeared in wound area one day after injury. As a result of analysis PDPN-positive cells, it was suggested that these cells express chemokines via PDPN molecules to cause macrophages to migrate around wound area.

研究分野：組織学 分子組織学 顕微解剖学

キーワード：リンパ節 リンパ管 PDPN 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫、とりわけ創傷や外科的治療、腫瘍、感染症などによる二次性リンパ浮腫はリンパ管の機能不全により起こる。現在までの主なリンパ浮腫治療法としては弾性着衣による圧迫療法やマッサージ、リンパ管静脈吻合術などがある。しかし、完治に至る患者は少なく、機能的なリンパ管の回復が望まれる。リンパ管研究は近年まで、同じ微小循環系である血管に比べて大きく遅れを取ってきた。しかしリンパ管特異的マーカーが発見されて以降、微小循環研究のフロンティアとして急激に研究が進みつつある。ところがリンパ管再生に関してはリンパ管内皮細胞に注目した分子生物学的観点からの解析が多く、生体内における周囲の微小環境やリンパ節がリンパ管に果たす役割についての知見は未だ不十分である。さらに、リンパ管マーカーについてもその機能的な意義の全貌は未知のままである。リンパ浮腫の新たな治療法を開発するためにも生体内におけるリンパ管の再生メカニズムを知ることが極めて重要である。

我々は以前より「局所のリンパ管再生には間質細胞が積極的に関与するのではないか？」と言う仮説の基に、リンパ管マーカー陽性細胞が豊富なリンパ節移植法とリンパ節分割移植法を開発してリンパ管再生を試みてきた(科研費若手研究(B) 23792062)。その結果、リンパ管の再生誘導に一定の成果を得られたが、分割移植を行うと一部のリンパ節は脂肪化してしまう事も明らかとなった。また、移植リンパ節が長期的に機能を果たせるのかに関しては未知のままであった。さらに、リンパ節移植は外科的な侵襲を伴うため、創傷部に起こる微小環境の変化についても合わせて考える必要があり、本研究を企図するに至った。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は「リンパ節及びリンパ管再生機序の詳細な解明と効率的な再生誘導を行い、リンパ浮腫治療へ応用する」事であるが、この目的を達成するために、本研究では前回開発した「リンパ節移植法」を用いた移植リンパ節の再生に伴う形態的变化の解析と「舌創傷治療モデル」を用いたリンパ管マーカー陽性間質細胞の形態・機能解析を行い、リンパ管の再生機序と間質細胞の関連を詳細に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 移植リンパ節の形態学的解析

麻酔下にて C57BL/6 マウス左鼠径リンパ節を郭清した。郭清したリンパ節は周囲に若干の脂肪組織が残るようにして、その脂肪組織を同所皮下に 7-0 縫合糸を用いて移植した。移植後、鼠径部皮膚はステープラーを用いて閉じた。移植リンパ節は経時的に摘出し、長径の計測を行った。その後、4%パラフォルムアルデヒドで固定した後に凍結切片又はパラフィン切片を作製した。作製した切片は H&E 染色、多重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡又はオールインワン顕微鏡を用いて観察を行った。

(2) 移植リンパ節の遺伝子発現解析

移植リンパ節を経時的にサンプリングし、total RNA を抽出して逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として VEGFc 等のリンパ管新生に関わる因子について定量的 RT-PCR を行った。解析は delta-delta CT 法を用いた。

(3) 舌創傷モデルの作製

麻酔下にて C57BL/6 マウスの舌に長さ約 2mm、深さ約 1mm の切傷を作製した。麻酔より覚醒後に食餌することを確認し、SPF 環境下にて飼育を行った。その後、経時的に創傷部をサンプリングした。

(4) 舌創傷モデルの多重免疫染色

経時的にサンプリングした舌組織より凍結切片を作製した。切片は抗 PDPN 抗体と幹細胞マーカー、線維芽細胞マーカー、大食細胞マーカー、増殖細胞マーカー等を組み合わせて多重免疫染色を行った。染色後、共焦点レーザー顕微鏡又はオールインワン顕微鏡を用いて観察した。さらに一部の染色についてはオールインワン顕微鏡を用いた定量を行った。

(5) 舌創傷部位の遺伝子発現解析

経時的にサンプリングした舌組織より total RNA を抽出して逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、PDPN やその他の因子に対するプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。解析には delta-delta CT 法を用いた。

4. 研究成果

移植リンパ節の形態学的・機能的解析

移植リンパ節のサイズを計測すると、移植後 4 週間目までで極端に矮小化していることが分かった。しかし、移植後 7 週間目で大きさは回復した。免疫蛍光染色の結果、移植後 4 週間目までは、リンパ節のサイズは小さいものの、内部構造は比較的正常のリンパ節に近い構造を取っていた。移植後 7 週間目ではサイズは正常リンパ節とほぼ同等に回復していたが、リンパ洞が大きく拡張しており、さらに T 細胞・B 細胞の住み分けに乱れがあった。ところが移植後 6 ヶ月後のリンパ節を観察すると、サイズは正常のリンパ節との間に有意な差は見られなかった。また、内部構造を確認すると T 細胞・B 細胞の住み分けもあり、リンパ洞に関しても正常リンパ節と同様に見えた。

また、以前の研究で移植リンパ節は第 4 週間目にはリンパ管が開通していることが分かって

いる。そこで今回は、移植後 1, 2, 3, 4 週目の遺伝子発現を調査した。その結果、移植後 4 週目にリンパ管内皮細胞増殖因子である VEGFc の発現が優位に上がることが分かった。

以上の結果より、リンパ節を移植することにより、VEGFc の発現が上昇してリンパ管新生が起こるのに約 4 週間、さらに移植リンパ節が再生するのに数ヶ月の時間を要することがわかった。また、移植したリンパ節が中・長期的に見ても機能しうる可能性が示唆された。

舌創傷モデルにおける PDPN の発現

創傷作製後に経時的なサンプリングを行い、凍結切片を作製した。H&E 染色の結果、創傷部位は受傷後 5 日目に塞がることが分かった。また、抗 PDPN 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、受傷後 1 日目には PDPN 陽性細胞が創傷部位に現れた。PDPN 陽性細胞が占める面積は受傷後 3 日目にピークを迎え、傷が塞がる受傷後 5 日目にはほとんど消失していた。また、定量的 RT-PCR を行ったところ、PDPN の発現ピークは受傷後 1 日目である事が分かった。

創傷部に現れる PDPN 陽性細胞の正体

PDPN 陽性細胞の由来を知るために、GFP マウスより骨髄を移植した骨髄キメラマウスを用いて創傷部の PDPN 陽性細胞を観察した。その結果、創傷部に現れる PDPN 陽性細胞は GFP 陰性であり、これらの細胞が骨髄由来ではない事が示唆された。そこで増殖細胞マーカーを用いて PDPN と二重蛍光免疫染色を行ったところ、多くの PDPN 陽性細胞が増殖細胞マーカーに陽性であった。

さらに、PDPN 陽性細胞の正体を知るために種々の細胞マーカーで染色したところ、筋芽細胞マーカー等の幼若な細胞マーカーに陽性であった。また、PDPN はリンパ管内皮細胞マーカーであるが、PDPN 陽性細胞は VEGFR3 や LYVE-1 といった他のリンパ管マーカーとは交叉しなかった。以上の結果から、PDPN 陽性細胞はリンパ管内皮細胞が増殖しているのではなく、舌筋組織内に存在する様な筋芽細胞であり、この細胞はその場で増殖していることが示唆された。また、この細胞が幹細胞マーカー陽性である事から、組織再生に何らかの役割を果たしている可能性も推察される。

PDPN 陽性細胞の機能解析

PDPN 陽性細胞が創傷部位においてどのような役割をしているのかを調査するために、他の細胞マーカーと多重染色を行った。すると PDPN 陽性細胞の周囲に CD68 陽性の細胞が多数集積していることが観察された。そこで、PDPN 陽性細胞と CD68 陽性細胞の関係をj知るために種々のマーカー等で多重蛍光免疫染色を行ったところ、PDPN 陽性細胞は MCP-1 及び MMP9 を発現していることが分かった。定量的 RT-PCR を行ったところ、MCP-1 や MMP9 の発現は PDPN の発現等相関があり PDPN の発現が減少する受傷後 3 日目にはこれらの因子の発現も減少した。

PDPN 陽性細胞と血管・リンパ管新生解析

PDPN 陽性細胞が脈管新生にどのような役割を果たしているのかを知るために、血管新生因子 VEGF-a とリンパ管内皮細胞増殖因子 VEGF-c に対する抗体を用いた多重蛍光免疫染色を行った。その結果、極一部の PDPN 陽性細胞は VEGF-a を発現していたが、VEGF-c の発現は見られなかった。以上の結果から、PDPN 陽性細胞は血管・リンパ管新生には直接的には関与しておらず、他の細胞を積極的に周囲に呼び寄せる事で関与する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

森川俊一、清水一彦、江崎太一、リンパ管と血管における内皮糖鎖発現の企画解析 リンパ管内皮糖鎖の機能解明に向けて、炎症と免疫、査読無、vol. 24、No. 5、p385-390、2016 http://www.sentan.com/products/detail.php?product_id=55

清水一彦、森川俊一、江崎太一、特異抗体を用いたリンパ管イメージングとその問題点、細胞、査読無 vol. 47、No. 13、p625-627、2015 <https://www.fujisan.co.jp/product/982/b/1232638/>

〔学会発表〕(計 9 件)

清水一彦、近藤千里、佐藤伊桜里、江崎太一、DNFB 接触過敏反応におけるポドプラニンの役割、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019

清水一彦、江崎太一、炎症局所における podoplanin 陽性細胞の役割、第 43 回日本リンパ学会総会、2019

柴野彩花、高尾ともよ、清水一彦、江崎太一、マウス創傷治癒過程における間質細胞の役割、第 123 回日本解剖学会・全国学術集会、2018

清水一彦、有村裕、加藤幸成、江崎太一、マウス舌創傷部位に出現する podoplanin 陽性細胞の正体と機能、第 123 回日本解剖学会・全国学術集会、2018

Shimizu K, Ezaki T, Podoplanin positive cells can affect the recruitment of Inflammatory cells by expressing chemokines during wound healing in mice. 26th World Congress of Lymphology, Barcelona, Spain, 2017

清水一彦、荒川あかり、柴野彩花、江崎太一、マウス舌及び皮膚創傷部位に出現する podoplanin 陽性細胞の役割、第 122 回日本解剖学会・全国学術集会、2017

清水一彦、江崎太一、リンパ節移植によるリンパ節再生の形態学的解析、第 121 回日本解剖学会・全国学術集会、2016

Shimizu K, Arimura Y, Ezaki T: Podoplanin+ cells have roles of wound healing by expressing CCL2 and MMP9. The 120th Annual Meeting of Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Hyogo, 2015

Shimizu K, Ezaki T: Roles of podoplanin positive cells in wound healing of the mouse tongue. Experimental Biology 2015 (Symp), Boston, USA, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：森島 正恵

ローマ字氏名：Masae Morishima

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 00241068

研究分担者氏名：菊田 幸子

ローマ字氏名：Sachiko Kikuta

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 10367089

(2)研究協力者

研究協力者氏名：江崎 太一

ローマ字氏名：Taichi Ezaki

研究協力者氏名：有村 裕

ローマ字氏名：Yutaka Arimura

研究協力者氏名：加藤 幸成

ローマ字氏名：Yukinari Kato

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。