

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20009

研究課題名(和文)血管内皮増殖因子受容体の異常による先天性水頭症の発症機序

研究課題名(英文) Mechanism of congenital hydrocephalus due to abnormality of vascular endothelial growth factor receptor

研究代表者

音羽 泰則 (otowa, yasunori)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40647765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、VEGF-Aの受容体であるFlt1とFlk1のダブルヘテロ欠損(Flt1+/-; Flk1+/-)マウスが、先天性水頭症をきたし2ヶ月齢頃までに致死となることを見出した。ダブルヘテロマウスを解析し、排出経路として硬膜リンパ管と静脈洞が考えられた。Flk1+/-マウスでは、静脈洞周囲のリンパ管内皮細胞数の減少を認めしたが、排出機能に異常は認めなかった。Flt1+/-マウスでは脈絡叢の浮腫を認めた。Flt1+/-; Flk1+/-マウスが先天性水頭症を起こす機序として、脈絡叢での脳脊髄液の増加によるもので、ダブルヘテロとなることで、Flt1の欠損異常がより強く反映されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We discovered that double hetero-deficient (Flt1 +/-; Flk1 +/-) mice of Flt1 and Flk1, receptors of the vascular endothelial growth factor VEGF-A, become lethal for congenital hydrocephalus about 2 months of age. Flt1 +/-; Flk1 +/- mice were analyzed with 1 month old mouse and the dura lymphatic vessels were confirmed around the sinus vein and dural lymphatic vessels and intravenous sinuses was considered as an excretion route. In Flk1 +/- mice, the number of lymphatic endothelial cells around the sinus vein was decreased, but no abnormality was found in the excretory function. In Flt1 +/- mice, edema of the choroid plexus was observed. Flt1 +/-; Flk1 +/- mice caused congenital hydrocephalus due to an increase in cerebrospinal fluid due to endothelial cell proliferation in the choroid plexus, no abnormality was observed in the excretory function. It was thought that the deficiency abnormality of Flt1 is more strongly reflected.

研究分野：血管生物学分野

キーワード：Flt1 Flk1 先天性水頭症 硬膜リンパ管

### 1. 研究開始当初の背景

血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) ファミリーの1つに VEGF-A があり、2つの働きが異なるチロシンキナーゼ型受容体 Flt1/VEGFR1 および Flk1/VEGFR2 と結合する。マウスにおいて Flt1 をヘテロ欠損 (Flt1<sup>+/-</sup>) させると胎生期浮腫が生じる。これは過剰の VEGF-A が Flk1 に結合して、血管透過性が亢進するためであることがわかってきた。本研究では Flt1 と Flk1 を同時にヘテロ欠損 (Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup>) させることで、胎生期浮腫改善の可能性を考えた。しかし C57BL/6 系統において Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスで胎生期浮腫は軽減しておらず、Flt1<sup>+/-</sup> マウスや Flk1<sup>+/-</sup> マウスではみられない頭部の膨隆をきたし、先天性水頭症を呈し2ヶ月齢頃までに致死となることを見出した。これまで中枢神経系にはリンパ管が存在しないといわれてきたが、脳脊髄液の排出経路として硬膜内にリンパ管が存在することが最近報告され、脳脊髄液の排出との関連性などが指摘されていることから、Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスを解析することで、先天性水頭症のメカニズムの解明につながると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、硬膜内リンパ管の構造と機能に注目しながら Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスにおける脳脊髄液の制御異常を明らかにして、水頭症発症機序を解明することを目的とする。脳脊髄液の産生および排出経路を制御する分子機構を明らかにすることで、ヒトの水頭症に対する分子標的治療薬の開発に繋がる可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1) Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスを胎生期に解析し、水頭症の有無と発現程度を確認する。

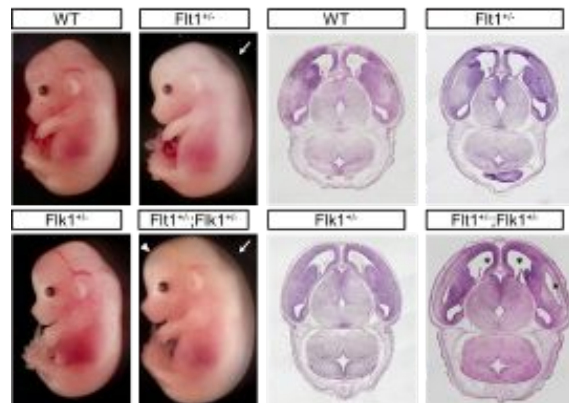
(2) 1ヵ月齢の野生型マウスを用いて、脳室にトレーサー(色素や蛍光標識タンパク)を注入し、脳脊髄液の排出経路を調べる。

(3) 各遺伝子型のヘテロマウスを用いて、胎生期に解析し、それぞれ形態異常や脳脊髄液の産生・排出に関わる異常の有無を確認する。

### 4. 研究成果

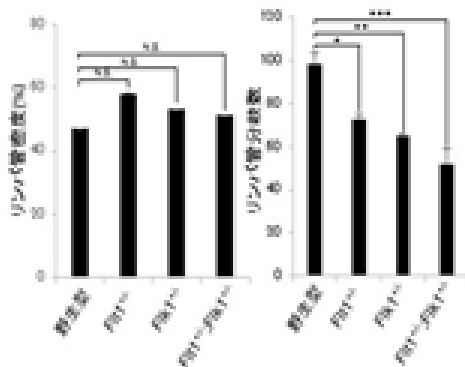
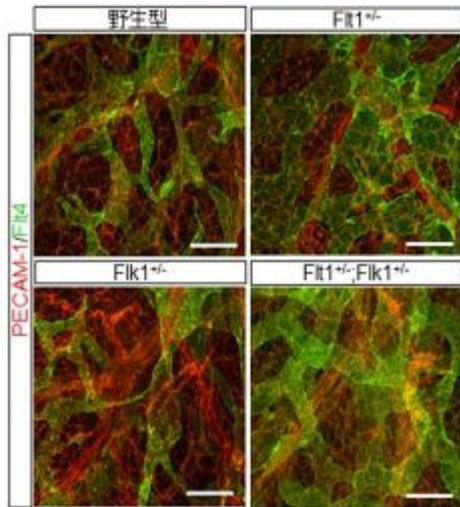
(1) Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウス脳室拡大をきたし、先天性水頭症を呈する。

胎生 14.5 日目の Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウス胎仔を解析した際に、頭部が膨隆しているものを見出した(矢頭)。マウス頭部の状態を調べるため、マウス胎仔の横断面標本を HE 染色して解析した。野生型と比べて、Flt1<sup>+/-</sup> マウスと Flk1<sup>+/-</sup> マウスには差異は認めなかったが、Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスは脳室が拡大していた(アスタリスク)。脳室の拡大は中脳水道などの脳脊髄液通路の閉塞が原因となるが、胎仔の矢状断標本を解析してもそのような異常は認めなかった。



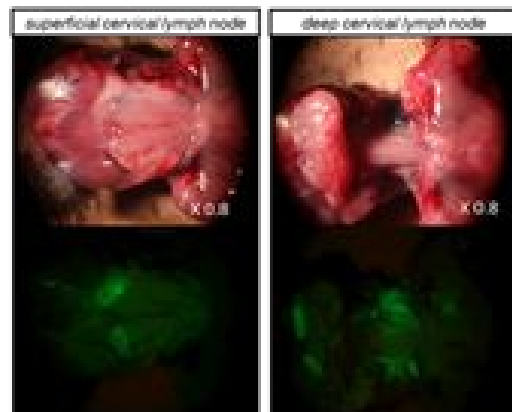
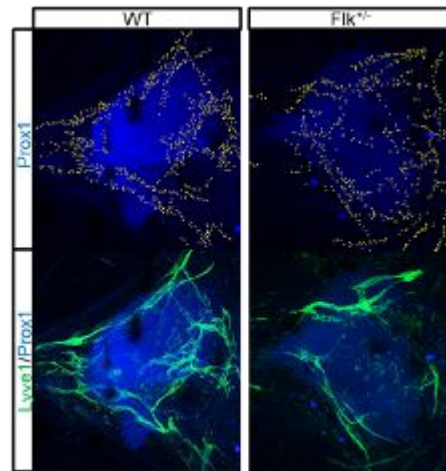
(2) Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスではリンパ管分岐数が減少する

マウスに胎生期浮腫が生じる主要原因として、心奇形が挙げられる。そこで、Flt1<sup>+/-</sup> マウスと Flk1<sup>+/-</sup> マウスを交配して得られた胎仔の HE 標本を作製し、心臓を解析したが、遺伝子型の違いによる形態の差異は見られなかった。リンパ管形成異常も胎生期浮腫の原因となるため、胎生 15.5 日目の背部皮膚を血管内皮細胞マーカーPECAM-1 とリンパ管内皮細胞マーカーFlt4 で免疫染色してフラットマウント標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。野生型マウスや Flk1<sup>+/-</sup> マウスと比べて、Flt1<sup>+/-</sup> マウスと Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスでリンパ管が拡張する傾向が認められたが、リンパ管密度には遺伝子間で有意差を認めなかった。一方でリンパ管の分岐数を解析したところ、Flt1<sup>+/-</sup> マウスと Flk1<sup>+/-</sup> マウスで減少しており、さらに両方の遺伝子変異をもつ Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup> マウスで最も減少していることがわかった。



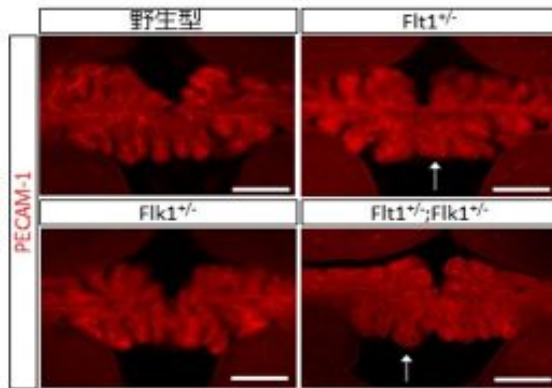
(3)硬膜内にはリンパ管が存在し、排出経路の一つとなる。

生後1ヵ月齢のマウスを解析し、頭蓋骨から硬膜を剥がし、リンパ管マーカーLive1とリンパ管内皮細胞マーカーProx1で免疫染色してフラットマウント標本作製し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。硬膜内のリンパ管は硬膜静脈洞に沿って存在することが分かった。Prox1陽性細胞を比較すると、Flk1<sup>+/-</sup>マウスで減少していることが分かった。排出機能としての役割を解析するために、脳室内にトレーサー(Dexstran)を注入し、その排出経路を確認した。デキストランは静脈洞や硬膜リンパ管で吸収され、一部は頸部リンパ節で吸着された。排出機能の異常の有無を調べるために各遺伝子型で解析を進めたが、Flk1<sup>+/-</sup>マウス、Flt1<sup>+/-</sup>マウス、Flt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup>マウスで形態異常に差は認めなかった。また、排出経路の一つとして傍脊髄腔経路も検索したが、脳脊髄液の排出はほとんどなく、形態異常も認められなかった。



(4) Flt1<sup>+/-</sup>マウスでは脈絡叢の浮腫を認める。

脳脊髄液の産生に関わる脈絡叢を調べるために、ホルマウント標本をPECAM-1で免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡で解析した。野生型マウスおよびFlk1<sup>+/-</sup>マウスでは脈絡叢の毛様体が入り組んだヒダ様の構造をなしているが、Flt1<sup>+/-</sup>マウスとFlt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup>マウスの脈絡叢では毛様体が浮腫状に肥厚してヒダ数が減少していることがわかった。また、表面積を解析したとこと、Flt1<sup>+/-</sup>マウスとFlt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup>マウスで表面積も低下していることが分かった。これらのことから、脳脊髄液の産生がFlt1<sup>+/-</sup>マウスとFlt1<sup>+/-</sup>;Flk1<sup>+/-</sup>マウスで増加していると考えられる。



まとめ：

我々は、血管内皮増殖因子 VEGF-A の受容体である Flt1 と Flk1 のダブルヘテロ欠損 (Flt1<sup>+/-</sup>; Flk1<sup>+/-</sup>) マウスが、先天性水頭症をきたし2ヶ月齢頃までに致死となることを見出した。水頭症の原因には脳脊髄液の産生増加、もしくは排出機能の低下が原因と考えられるため、それぞれで各遺伝子型での解析を行った。

脳脊髄液の産生に関する解析では、脈絡叢毛様体が浮腫状に肥厚して脳室が著明に拡大していることから、脳脊髄液の産生過多を原因とする水頭症であると考えられた。

排出機能に関しては、各遺伝子型でそれぞれ形態異常の有無を検索したが、明らかな異常は認められなかった。Flk1<sup>+/-</sup> マウスで硬膜リンパ管内皮細胞の減少が認められたにもかかわらず、Flk1<sup>+/-</sup> マウスでは頭部膨隆などの異常は認められなかったことから、硬膜リンパ管がその排出機能の一端を担うものの、これだけでは形態異常はきたさないものであると考えられる。

皮膚においては、Flt1<sup>+/-</sup> マウスや Flt1<sup>+/-</sup>; Flk1<sup>+/-</sup> マウスの胎仔皮膚においてリンパ管分岐数が減少していることも明らかになった。分岐数の減少は浮腫を示さない Flk1<sup>+/-</sup> マウスにもみられることから、直ちにリンパ管機能の低下に繋がっているとは考えにくい。しかしながら、Flt1<sup>+/-</sup>; Flk1<sup>+/-</sup> マウスで最もリンパ管分岐数が減少していることから、Flt1<sup>+/-</sup> マウス、Flk1<sup>+/-</sup> マウス単独の遺伝子異常より、ダブルヘテロマウスとなることで異常が顕著になり得ることが示唆されている。

これらのことから、Flt1<sup>+/-</sup>; Flk1<sup>+/-</sup> マウスが先天性水頭症を起こす機序として、脈絡叢での内皮細胞増殖による脳脊髄液の増加によるものと考えられた。排出機能に形態異常は認められなかったが、Flk1<sup>+/-</sup> マウスでの皮膚でのリンパ管分岐数の減少や、硬膜リンパ管の内皮細胞数の減少による影響より、ダブルヘテロ欠損 (Flt1<sup>+/-</sup>; Flk1<sup>+/-</sup>) マウス

となることで、Flt1 の欠損による異常がより強く反映されるのではないかと考えられた。

#### <引用文献>

1. Olsson et al, Nat Rev Mol Cell Biol. 7(5) :359-71, 2006
2. Shalaby et al., Nature. 376(6535):62-66, 1995
3. Fong et al., Nature. 376(6535):66-70, 1995
4. Hiratsuka et al., Proc Natl Acad Sci USA. 95(16):9349-9354, 1998
5. Ema et al, Blood. 107(1) :111-7, 2006
6. Sano et al, Biochem Biophys Res Commun. 420(2):422-7, 2012
7. Davis et al, Proc Natl Acad Sci USA. 104(49) :19422-7, 2007

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

音羽 泰則 (OTOWA YASUNORI)  
神戸大学・医学研究科・医学研究員  
研究者番号：4 0 6 4 7 7 6 5

##### (2)研究協力者

平島 正則 (HIRASHIMA MASANORI)  
神戸大学・医学研究科・准教授