

平成21年5月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791283

研究課題名（和文） 神経系組織浮腫の新しい治療法

研究課題名（英文） The New Treatment Method for The Edema of Neural Tissue

研究代表者

丸山 和一（KAZUICHI MARUYAMA）

京都府立医科大学・附属病院・専攻医

研究者番号：10433244

研究成果の概要：本研究は、現在までに特別な治療が確立されていない神経系組織浮腫への治療に対し、リンパ管を新生させるという新しいアプローチの開発を目的としていた。SEMA(semaphoring)3F がリンパ管を特異的に抑制することから、神経系組織である網膜内に多く存在する SEMA3F を用い、実際に SEMA3F が病的リンパ管を抑制できるかどうかを検討した。角膜縫合による炎症誘導モデルにおいて、recombinant SEMA3F を結膜下投与し、角膜内に発生するリンパ管を特異的に抑制できるかどうかを検討した結果、SEMA3F 投与群で有意に角膜リンパ管新生が抑制できた。また我々の研究で炎症下においてマクロファージがリンパ管を形成することを証明しているが、マクロファージにも SEMA3F の受容体である NRP2 が発現していることを確認することができた。さらに SEMA3F でマクロファージを刺激したところ、リンパ管関連マーカーである LYVE-1, Podoplanin の発現がウェスタンブロットによりタンパクレベルの発現がマクロファージ上で抑制されることを発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：脳神経・免疫学・細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞・脳出血後に起こる脳浮腫、糖尿病網

膜症・加齢黄斑変性症に伴って発生する黄斑部浮腫への治療に対する新しい治療の開発を試みた。

2. 研究の目的

リンパ管は、体内で大きく分けて2つの機能を持っていることで知られている。一つは細胞・組織から排出された老廃物を集め静脈系に戻す機能、もう一つは免疫反応を誘導するために必要なリンパ節への抗原提示細胞の輸送である。しかし、リンパ管については未知のことが多く同じ脈管系の動・静脈とは機能的、形態的に異なる部分が多い。そのひとつの例として、リンパ管の存在部位である。多くの組織は血管・リンパ管が発達しているのにもかかわらず、脳や網膜などの免疫寛容を持つ中枢神経系では動静脈系について発達認められるが、リンパ管の発達は認められていない。そのため脳梗塞や脳出血後などで起こる二次的な組織浮腫が起こると、リンパ管のような働きを持つ浮腫を軽減させる構造が存在しないため、一度浮腫が発生すると頭蓋内圧亢進により生命予後に強い影響が及ぶ。また糖尿病性網膜症・加齢黄斑変性症・網膜動静脈閉塞後に二次的に発生する黄斑部浮腫は視力予後に影響する。現在、これらの病態に対してはステロイドなどによる治療が施行されているが、未だ有効な治療法が見いだされていない。

リンパ管内皮には Vascular Endothelial Growth Factor-C(以下 VEGF-C, -D)の受容体である VEGFR3 と co-receptor であるニューロピリン2 (以下 NP-2) が存在している。NP-2 は VEGF-C, -D の刺激を受けリンパ管内皮増殖に関与している。NP-2 の発現がノックアウトされたマウスでは胎児期の毛細血管やリンパ管形成の発達が抑制されていることがわかっている (Yuan L, etc Development,

2002)。また NP-2 は axonal guidance factor family であるセマフォラン 3 F (以下 SEMA3F) という物質で特異的に抑制でき (Bielenberg DR, J. Clin Invest 2004)、この結果リンパ管形成が抑制されることがわかっている。SEMA3F は特に神経系に多く存在しているため、SEMA3F が何らかの形で神経系の無リンパ管環境を形成している可能性があると考えられる。我々は、網膜での SEMA3F の発現を RT-PCR 法で確認したところ、生後5日目より発現が認められ、その後成体でも確認できた。さらに我々は、新生児期において、多数のリンパ管内皮特異的マーカー (LYVE-1) を持つ細胞が網膜内に存在することを発見した。しかしこれらの細胞数は SEMA3F が認められる生後5日から7日目を境に減少し、11日目には網膜周辺部にのみ多く存在し、成人期には網膜赤道部にはわずかしか存在しないことが判明した。②本研究の目的は、SEMA3F がリンパ管を特異的に抑制することから、網膜内に多く存在する SEMA3F を特異的に抗 SEMA3F 抗体によって抑制し、リンパ管形成不全などで発生する組織浮腫除去への応用、特に脳梗塞や脳出血後の生命予後・病状回復に強く関連する脳浮腫の改善、視力予後に関する糖尿病網膜症・加齢黄斑変性症に起こる黄斑部浮腫へリンパ管を誘導し浮腫改善に応用できるかどうか、マウスモデルを用い検討する。我々の研究で炎症下においてマクロファージがリンパ管を形成することは証明されているが、現在までにマクロファージに NP2 が発現しているかどうかは知られていないため、マウス腹腔内・骨髄由来マクロファージの NP-2 発現を確認し(RNA, タンパクレベル) リンパ管新生に関与するメカニズムを解析する。

本研究は、現在までに特別な治療が確立されていない脳梗塞・脳出血後に起こる脳浮腫、

糖尿病網膜症・加齢黄斑変性症に伴って発生する黄斑部浮腫への治療に対する新しいアプローチである。また我々はこの研究においてリンパ管新生を促進することを考えると同時に SEMA3F の特徴を用い悪性腫瘍でのリンパ管新生抑制への応用も考えている。DR. Diane R. Bielenberg らは、SEMA3F を過剰発現させた癌細胞のリンパ節転移がコントロールよりも少なかったことを報告している (Bielenberg DR, J. Clin Invest 2004)。このことから悪性腫瘍またはその周囲環境に SEMA3F を強発現させることにより、将来的に眼局所に起こる悪性腫瘍 (melanoma) に対して SEMA3F 投与という治療の可能性があるかどうかとも検討する。

3. 研究の方法

平成 19 年度には、角膜炎症モデルを使用し、SEMA (semaphorin) 3F を投与し、角膜内に発生するリンパ管を特異的に抑制できるかどうかを確認した。我々の研究で炎症下においてマクロファージがリンパ管を形成することは証明されているが、現在までにマクロファージに NP (neuropilin) 2 が発現しているかどうかは知られていないため、マウス腹腔内・骨髄由来マクロファージを 0.3% thioglycollate 溶液腹腔投与または骨髄より採取し、NP2 発現をリアルタイム PCR により RNA レベルでウェスタンブロットによりタンパクレベルの発現を確認する。これらを確認することでリンパ管新生に関与するメカニズムを解析した。

4. 研究成果

角膜縫合による炎症誘導モデルにおいて、recombinant SEMA3F を結膜下投与し、角膜内に発生するリンパ管を特異的に抑制できるかどうかを検討した結果、SEMA3F 投与群で有

意に角膜リンパ管新生が抑制できた。また我々の研究で炎症下においてマクロファージがリンパ管を形成することを証明しているが、マクロファージにも SEMA3F の受容体である NRP2 が発現していることを確認することでできた。さらに SEMA3F でマクロファージを刺激したところ、リンパ管関連マーカーである LYVE-1, Podoplanin の発現がウェスタンブロットによりタンパクレベルの発現がマクロファージ上で抑制されることを発見した。平成 20 年度には我々は NRP2LacZ マウス角膜に縫合し炎症を誘導し、それに伴うリンパ管を新生させ NRP2 の発現を確認したところ、角膜リンパ管に NRP2 の発現が確認できた。このことから炎症におけるリンパ管新生も 3F を選択的に抑制することによりリンパ管の新生を促進させ、神経系組織浮腫の軽減に大変重要であることが予想された。

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 4 件)

① Maruyama K, Asai J, Ii M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. American Journal of Pathology 2007 170(4) 1178-91

② Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, Noda K, Maruyama K, She H, Matsubara A, Miyahara S, Nakao S, Yin Y, Benowitz L, Hafezi-Moghadam A, Miller JW. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2007 104(7) 2425-30

③ Futagami Y, Sugita S, Vega J, Ishida K, Takase H, Maruyama K, Aburatani H, Mochizuki M. Role of thrombospondin-1 in T cell response to ocular pigment epithelial cells. Journal of Immunology 2007 178(11) 6994-7005

④ Bachmann BO, Bock F, Wiegand SJ, Maruyama K, Dana MR, Kruse FE, Luetjen-Drecoll E, Cursiefen C. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. Arch Ophthalmol. 2008 126 71-77

[学会発表] (計 1 件)

Maruyama K, Bielenberg D, Shimizu A, Fukumoto A, Ohishi A, Klagsbrun M, D'Amore P, Kinoshita S. The Effect of SEMA3F on Lymphangiogenesis in the Cornea Association Research of Vision and Ophthalmology 2008/04/28 アメリカ合衆国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山和一 (KAZUICHI MARUYAMA)

京都府立医科大学・附属病院・専攻医

研究者番号：10433244