

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09156

研究課題名(和文)リンパ管可塑性による肝組織修復と制御機構の解明

研究課題名(英文)Lymphangiogenesis during liver repair after acute liver injury

研究代表者

伊藤 義也 (ITO, YOSHIYA)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：40203187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：急性肝障害後の肝組織修復過程においてリンパ管新生が果たす役割を調べた。肝虚血再灌流後の門脈周囲域に新生リンパ管がみられ、リンパ管内皮マーカーやリンパ管新生因子が増加した。リンパ管新生因子はマクロファージから産生された。リンパ管新生因子を投与するとリンパ管新生とともに肝修復が増強した。反対にリンパ管新生因子受容体阻害薬を投与すると、リンパ管新生と肝修復が抑制された。肝リンパ管新生は急性肝障害後の肝組織修復を促進す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

肝障害後の肝組織修復が障害されると肝不全に至り患者予後は不良となる。これまで肝リンパ管が肝組織修復に関与することは未解明であったが、本研究において、新生するリンパ管の役割とその分子制御機構が明らかになった。肝リンパ管新生を制御するメカニズムをさらに明らかにすることにより、各種の肝病態を改善する治療法の開発に可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury, we investigated hepatic lymphatic structure, growth, and function. Hepatic I/R injury enhanced lymphangiogenesis around the portal tract and this was associated with increased expression of pro-lymphangiogenic growth factors including VEGF-C and VEGF-D. Recombinant VEGF-D treatment facilitated liver repair in association with the expansion of lymphatic vessels and increased gene expression related to the reparative macrophage phenotype. Treatment with a VEGFR3 inhibitor suppressed liver repair, lymphangiogenesis, drainage function, and accumulation of VEGFR3-expressing reparative macrophages. VEGF-C and VEGF-D upregulated gene expression related to lymphangiogenic factors and the reparative macrophage phenotype in cultured macrophages. These results suggest that activation of VEGFR3 signaling promotes lymphangiogenesis and reparative macrophages, both of which play roles in liver repair.

研究分野：消化器

キーワード：肝修復 リンパ管

## 1. 研究開始当初の背景

急性肝障害後の炎症収束や組織修復過程が阻害されると組織修復や組織再生が十分に行われないことになる。その結果、肝障害や肝不全に至る場合には患者のQOLは低下する。私たちは、これまでマクロファージなどの免疫細胞が生理活性脂質を介して急性肝障害後の肝修復に寄与することを示してきたが、修復制御機構については十分理解されていない。

一方、リンパ管は間質液回収による組織恒常性維持、免疫細胞運搬通路として免疫調節あるいは脂肪吸収などの役割を果たす。炎症時には免疫細胞がリンパ管内に遊走し、局所での免疫炎症反応に関与する。またリンパ管は細胞外組織に貯留した組織液の除去や免疫細胞の動員などを目的として、構造や機能を変化させ、リンパ管を増殖新生することで、組織修復に関与することが見いだされてきた。従って、肝組織修復にも新生リンパ管形成が関与する可能性があるものと考えられる。しかしながら、肝修復におけるリンパ管の役割は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では肝虚血再灌流障害モデルを用いて肝修復におけるリンパ管新生の役割とその制御機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物には8週令の雌性C57BL/6マウスを用いた。麻酔下に肝臓の70%を支配する血管を45分間遮断し、その後遮断解除により再灌流させた。再灌流後6,24,48,72,96,120時間に血液を採取し、また肝臓を摘出した。

肝障害ならびに肝修復を評価するために血清ALT値と肝壊死面積を測定した。マクロファージ集積、マクロファージ表現形式について、免疫染色、フローサイトメトリー、PCRなどで解析した。またリコンビナントVEGF-C,VEGF-Dまたは選択的VEGFR3キナーゼ阻害薬を投与して肝リンパ管新生と肝修復に及ぼす効果について検討した。さらに培養骨髄マクロファージにVEGF-C,VEGF-Dを投与しその表現形式変化を解析した。リンパ管機能評価のために蛍光色素FITCデキストランを肝内に注入し門脈周囲リンパ節における蛍光取り込み強度を比較検討した。

## 4. 研究成果

### 肝リンパ管新生と肝虚血再灌流障害後の肝修復との関連性

肝虚血再灌流により肝障害は再灌流6時間後にピークとなりその後、漸減し120時間後には肝障害は消失し、ほぼ回復した。肝修復をPCNA発現細胞で解析すると48時間後から増加し、72時間後でピークとなり、120時間後まで高値が継続した。従って、肝修復ではALT値や肝壊死面積は減少し、PCNA発現が増加していることが分かった。また肝再生因子であるEGF,HGFも増加した。

リンパ管新生を組織学的に検討した。リンパ管内皮マーカーであるLYVE-1は肝修復に

おける肝臓でも特に門脈周囲に拡張した多数のリンパ管に発現し、既存のリンパ管が増殖したものと考えられた(図1)。またリンパ管密度ならびにリンパ面積は48時間以後に増加した(図2)。さらにリンパ管内皮マーカであるLYVE-1,VEGFR3,Prox-1も肝修復期で増加し、リンパ管内皮増殖因子 VEGF-C,VEGF-Dも同様に増加した。リンパ管新生因子 VEGF-C,VEGF-Dの産生細胞を解析すると集積マクロファージであることが分かった。

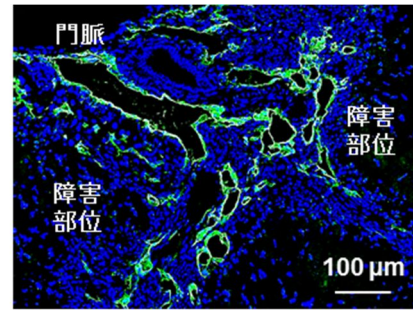


図1. 再灌流72時間後では門脈周囲領域に新生リンパ管が多数みられる

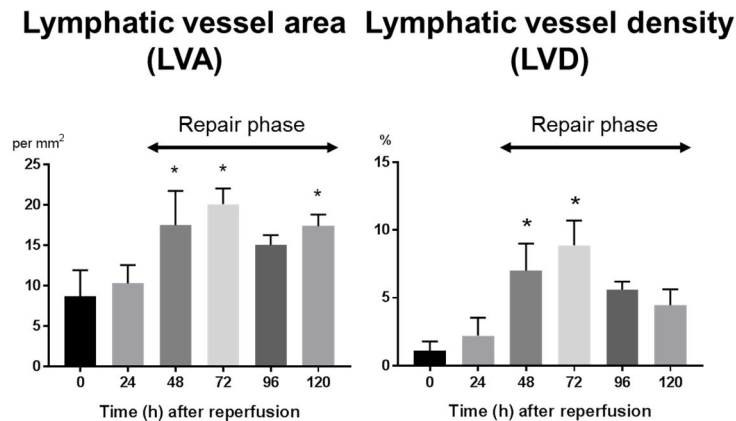


図2. 再灌流48-72時間後で肝リンパ管密度と肝リンパ管面積が増加した

#### リンパ管新生因子投与による肝修復促進効果

そこで、リンパ管新生因子 VEGF-C,VEGF-D が肝虚血再灌流障害後の肝リンパ管新生を造増強し肝組織修復を促進させるかどうかを検討した。リコンビナント VEGF-C または VEGF-D を投与すると、リコンビナント VEGF-D 投与により肝再灌流 72 時間後の ALT 値と肝壊死面積は減少し、PCNA 発現肝細胞が増加した。さらにリンパ管密度ならびにリンパ面積は増加しリンパ管内皮マーカやリンパ管新生因子発現が増加した。集積マクロファージの関与を解析すると、リンパ管新生因子 VEGF-D 投与によって炎症性マクロファージ関連遺伝子発現は減弱し、修復性マクロファージ関連遺伝子発現は増強した。

#### VEGFR3 阻害による肝修復にもたらす効果

ついで、肝リンパ管新生が VEGFR3 に依存しているかどうかを調べた。VEGFR3 阻害薬 MAZ51 を投与すると肝再灌流 72 時間後の ALT 値と肝壊死面積は増加し、PCNA 発現肝細胞は減少した。さらにリンパ管密度ならびにリンパ面積、リンパ管内皮マーカやリンパ管新生因子発現などが減少した(図3)。さらにリンパ管機能としてドレナージ機能を蛍光色素 FITC デキストランを肝内に注入して門脈リンパ節内の蛍光強度を調べると、VEGFR3 阻害薬処置マウスで低下し、対照と比較して肝リンパ管ドレナージ機能が抑制された。

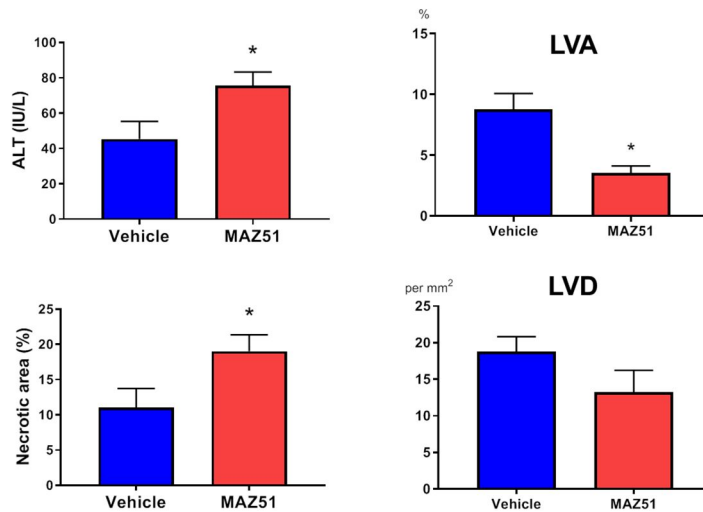


図3. VEGFR3阻害薬MAZ51は再灌流72時間後のALT値、肝壊死面積を増加させ、肝リンパ管面積(LVA)を減少させた

#### VEGFR3 阻害による肝マクロファージ極性にもたらす効果

VEGFR3 はリンパ管内皮だけでなく集積マクロファージにも発現したのでマクロファージの表現形式を解析すると VEGFR3 阻害薬処置マウスでは対照と比較して炎症性マクロファージが増加し、修復性マクロファージが減少した。さらに培養骨髄マクロファージに VEGF-C、VEGF-D を投与しマクロファージの表現形式を解析した。その結果、リンパ管新生因子投与によって炎症性マクロファージ関連遺伝子発現は減弱し、修復性マクロファージ関連遺伝子発現は増強した(図4)。

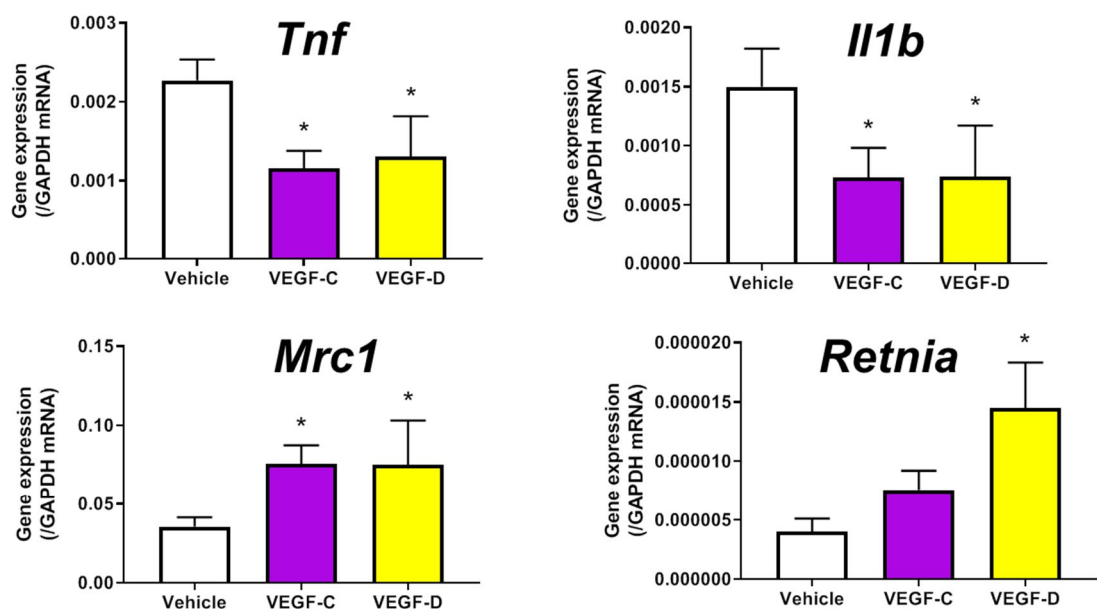


図4. リンパ管新生因子を培養骨髄マクロファージに投与すると炎症性マクロファージ関連遺伝子が減少し、修復性マクロファージ関連遺伝子が増加した

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamoto Shuji, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Goto Takuya, Kojo Ken, Kumamoto Yusuke, Watanabe Masahiko, Majima Masataka	4. 巻 23
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and accumulation of reparative macrophages contribute to liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angiogenesis	6. 最初と最後の頁 395 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10456-020-09718-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamoto Shuji, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Goto Takuya, Kojo Ken, Kumamoto Yusuke, Watanabe Masahiko, Narumiya Shuh, Majima Masataka	4. 巻 34
2. 論文標題 EP3 signaling in dendritic cells promotes liver repair by inducing IL 13 mediated macrophage differentiation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5610 ~ 5627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901955R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuru S, Ito Y, Matsuda H, Hosono K, Inoue T, Nakamoto S, Kurashige C, Mishima T, Tsujikawa K, Okamoto H, Majima M.	4. 巻 -
2. 論文標題 RAMP1 signaling in immune cells regulates inflammation-associated lymphangiogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0364-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Otaka F, Ito Y, Inoue T, Ohkubo H, Nishizawa N, Kojo K, Betto T, Yamane S, Narumiya S, Koizumi W, Majima M	4. 巻 381
2. 論文標題 Thromboxane A(2) receptor signaling in endothelial cells attenuates monocrotaline-induced liver injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicol Appl Pharmacol	6. 最初と最後の頁 114733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2019.114733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細野加奈子 伊藤義也、津留世里、天野英樹、馬嶋正隆
2. 発表標題 リンパ管新生を制御する神経ペプチドCGRPの役割
3. 学会等名 第44回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤義也、細野加奈子、天野英樹、馬嶋正隆
2. 発表標題 組織修復におけるリンパ管新生を制御するプロスタグランジンPGE2の機能的役割
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中本 修司、伊藤 義也、後藤 卓也、西澤 伸恭、古城 憲、隈元 雄介、馬嶋 正隆
2. 発表標題 樹状細胞のEP3シグナル伝達はマウスの虚血再灌流障害後の肝修復を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤義也、津留世里、細野加奈子、天野英樹、馬嶋正隆
2. 発表標題 リンパ管新生を制御する神経ペプチドCGRPの役割
3. 学会等名 日本リンパ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義也、井上智仁、大高史聖、美島利昭、大久保博世、馬嶋正隆
2. 発表標題 RAMP1 signaling in hepatic macrophages plays a critical role in immune-mediated hepatitis
3. 学会等名 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義也、大高史聖、大久保博世、馬嶋正隆
2. 発表標題 トロンボキサンA2受容体シグナルの肝類洞閉塞症候群における役割
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関