

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18934

研究課題名（和文）外科的侵襲によって生じる新たな先天性リンパ浮腫モデルの確立と病態の解析

研究課題名（英文）Developing a novel mouse model for congenital lymphedema by surgical procedure

研究代表者

加茂川 留理（Kamogawa, Ruri）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70749324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ浮腫に対する新規治療方法開発のためには、適切なマウスモデルの開発が必須である。本研究では、マウス胎仔に手術侵襲を加えることによって胎仔の全身性リンパ浮腫を誘発する新たなモデル開発が行われた。胎生13日目のマウスを手術によって子宮外へ脱出させて腹腔内へ留置することにより、約7割の頻度で全身性の浮腫が誘発されることが示された。Twist2ノックアウトマウスにおいて浮腫の程度が強く、またその病態メカニズムには胎盤血流の変化が関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫に対する現行の治療は不十分であり、特に先天性や原発性のリンパ浮腫は治療抵抗性であり、新たな治療方法の開発が求められている。そのためには適切な浮腫モデルの開発により病態を解明する必要がある。先天性リンパ浮腫のマウスモデルについては、過去に特定の遺伝子変異を伴うマウスの報告は散見されるものの、野生型マウスに浮腫を誘発するモデルの報告はほぼ存在しない。本研究では胎仔に外科的侵襲を加えることで高率に浮腫が誘発されることが示され、今後の病態解明に役立つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Development of proper animal models is necessary for improving the therapeutics for lymphedema. In this study, a novel mouse fetal model for congenital systemic lymphedema was developed. By taking out the embryos aged 13 days of gestation and leaving them within the maternal abdomen for a few days, systemic lymphedema was induced in about 70% of them. The severity of edema was pronounced in Twist2^{-/-} mice. Congestion of placenta seemed to be involved in the pathogenesis of this model.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 原発性リンパ浮腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ系は血管径と並ぶ二大循環システムの一つであり、生体内の水分調節、組織からの老廃物の排泄、免疫細胞の輸送などに重要な役割を果たす。その経路に何らかの通過障害をきたすと四肢などにリンパが鬱滞し浮腫をきたす「リンパ浮腫」となる。現在、リンパ浮腫の治療として圧迫などの理学療法、リンパ管-静脈吻合術、遊離リンパ組織移植術などの外科的治療が行われているが、治療効果にはばらつきがあり、根本的な解決には至っていない。特に、症状の進行した症例や重度の先天性リンパ浮腫症例に対しては治療効果が限定的で、詳細な病態の解明、新たな治療法の開発が強く望まれている。

リンパ浮腫に対する治療方法の開発にあたり障壁となっているのは、リンパ浮腫の病態、さらにはリンパ管の発生そのものについての生物学的理解が不十分であることが挙げられる。マウスのリンパ管内皮細胞は、胎生 9.75 日前後に主静脈の血管内皮細胞から分化し、静脈から離脱してリンパ嚢を形成することで全身のリンパ管が形成されると考えられている (Srinivasan et al. *Genes Dev* 2007)。その過程には血小板上に存在する C-type Lectin Receptor-2 (以下、CLEC-2) を介したシグナルが必須であることが報告されている。リンパ浮腫のマウスモデルとして、尾の結紮による浮腫モデルや、鼠径部でリンパ管を結紮したりリンパ節を摘出したりするげっ歯類のモデルが報告されているが、マウスのリンパ管修復能は強く、時間と共に数週間うちに徐々に浮腫は軽減されていく。ヒトの臨床で経験するような脂肪組織の増殖と硬化、慢性炎症を伴うような続発性浮腫の適切なモデル開発には至っていない。また、胎生期にリンパ浮腫を発症する遺伝子改変マウスの複数の報告があり、リンパ管と静脈の分離不全が先天性リンパ浮腫の原因となることが示唆されているが (Suzuki-Inoue et al *J Biol Chem* 2010, Schacht et al *EMBO J* 2003, Uhrin et al *Blood* 2010)、出生後しばらく経ってから発症するヒトの原発性リンパ浮腫とは病状が乖離しており、臨床応用のヒントとなるモデル開発には至っていない。

申請者は胎仔の皮膚再生が可能なメカニズムを探る研究の一環として、胎仔の皮膚創傷部位で特異的に高発現する遺伝子群を選定したが(未発表)、その上位に Twist2 遺伝子が含まれていた。Twist2 は創傷部位の真皮浅層に高発現することが ISH 等で確認され皮膚再生に関与することが示唆されていた。そこで Twist2 ノックアウトマウスを入手して胎仔手術を行い、創部治癒状況を確認しようとしたところ、意外にも全身にリンパ浮腫を来している胎仔が複数観察された。胎仔手術を行っていない(子宮を切り開いていない)胎仔には浮腫が誘発されず、また野生型の littermates では浮腫が少なかったことから、Twist2 ノックアウトマウスに外科的侵襲が加わると浮腫が生じるのではないかと考えられた。外傷を契機にリンパ浮腫をきたす動物モデルの報告は過去に存在せず、偶発的に得られた本モデルを解析することによりリンパ浮腫発症に関連する重要な知見が得られる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の通り偶然発見された、マウス胎仔に外科的侵襲を加えることによりリンパ浮腫が誘発されるという仮説を検証し、新たな先天性リンパ浮腫モデルを開発することを目的として開始された。

3. 研究の方法

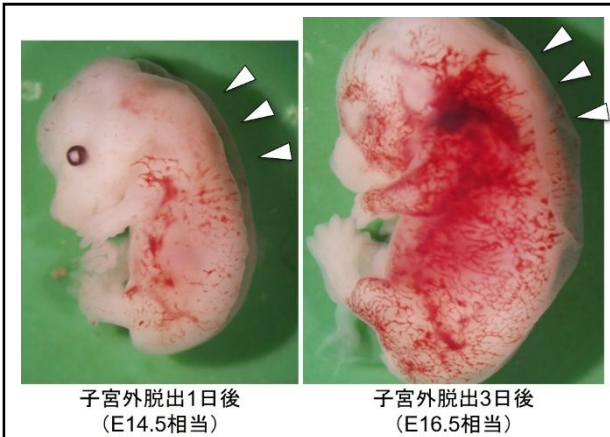
(1) Twist2 マウスへ外科的侵襲を加えることによって浮腫が誘発されるかどうかの検証

Twist2 マウスを用いて胎仔手術を行い、浮腫が誘発されるかどうかを検証する。妊娠 13.5 日目の母体マウスにイソフルレンによる全身麻酔を施し、仰臥位として腹部を消毒し、開腹する。清潔操作で子宮を体外へ引き出し、血管束と反対側の子宮壁を切開し、羊膜に包まれた胎仔を子宮外へ脱出させる。子宮外へ脱出させた胎仔の一部に手術操作を加え、皮膚に切開創を作成した後、羊膜を修復する。また一部の胎仔には手術操作を加えないこととする。子宮外へ脱出させた胎仔を母体の腹腔内へ還納し、腹膜および腹部筋層・皮膚を縫合閉鎖して手術操作を終了する。

1 日後、3 日後に胎仔を観察し、肉眼的に浮腫が観察されるかどうか、組織学的にリンパ管の拡張や blood-filled lymphatic vessels が観察されるかどうかについて検討を行った。

組織学的観察は、背部皮膚のホルマウント染色標本により行った。まず摘出した胎仔組織を 4% PFA で固定し(4、overnight)、顕微鏡視下に深筋膜上で背部皮膚を切り出す。血管、リンパ管、神経線維等に対する一次抗体を 0.5% PBST (Triton X-100 in PBS) で希釈し、浸透させながら反応させる(4、overnight)、0.5% PBST で 5 回洗浄し、対応する二次抗体および DAPI を 0.5% PBST で希釈し、浸透させながら反応させる(4、3 時間~overnight)、0.5% PBST で 3 回洗浄し、スライドガラス上へ載せる。組織の水分をキムワイプで除去し、ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen) で包埋する。暗所で 1 晩静置後に共焦点顕微鏡 (FV3000、Olympus) で観察する。

使用した一次抗体は、CD31 (Hamster monoclonal [2H8]、Abcam)、Neurofilament (Mouse monoclonal [2H3]、DSHB)、F4/80 (Rat monoclonal [Cl:A3-1]、AbD serotec)、LYVE1 (Rabbit polyclonal、RELIA Tech GmbH)、SMA (Mouse monoclonal [1A4]、SIGMA)、Prox1 (Rabbit polyclonal、COVANCE) である。



子宮外脱出1日後
(E14.5相当) 子宮外脱出3日後
(E16.5相当)

図1. Twist2 胎仔浮腫の誘発。
背部の浮腫およびリンパ管内へ血液が流入している様子が肉眼的に観察される。

(2)野生型マウスにおいて胎仔を子宮外へ脱出させることによって浮腫が誘発されるかどうかの検証

子宮外へ脱出させる操作そのものが浮腫を誘発させるかどうかの検証のために、野生型の C57Bl/6J マウス、ICR マウスの両者を用いて、同様に胎仔手術を行う。妊娠13日目の母体マウスにイソフルレンで全身麻酔をかけ、開腹して清潔操作で子宮を腹腔外へ脱出させる。双角となっている子宮のうち、一方に対しては血管束と反対側の子宮壁を切開し、羊膜に包まれた胎仔を子宮外へ脱出させる。もう一方に対しては子宮の切開を行わない。その後、子宮および胎仔を腹腔内へ還納させる。1日後に胎仔組織を観察し、肉眼的に浮腫が存在するかどうか、組織学的にリンパ管の格調や blood-filled lymphatic vessels が確認されるかどうかについて検証する。

4. 研究成果

(1)Twist2 マウスへ外科的侵襲を加えることによって浮腫が誘発されるかどうかの検証

Twist2 ノックアウトマウスに外科的侵襲を加え、1日後および3日後に胎仔組織を回収したところ、いずれも約70%の割合の胎仔において、図1に示すような全身性の浮腫が観察された。背部皮膚は浮腫状で透明な皮下組織の厚みが増している様子が観察され、また特徴的な網目状のリンパ管が赤血球で赤く染まっている様子が認められる。

背部皮膚を深筋膜上で切り出し、ホルマウント免疫染色を行いリンパ管を観察したところ、正常と比較して浮腫をきたした胎仔組織においてはリンパ管の直径が100 μm以上となって数珠状に拡張し、またTer119陽性の赤血球が多数リンパ管内に貯留している、いわゆる blood-filled lymphatic vessels の所見が認められた(図2)。

同様の所見は、特に Twist2^{-/-}の個体で顕著であったが、意外なことに野生型マウスにおいても、程度は軽いものの浮腫をきたす胎仔が観察されることが分かった。そのことから、胎仔へ外科的侵襲を加えることそれ自体が浮腫の原因となっている可能性が考えられた。

(2)野生型マウスにおいて胎仔を子宮外へ脱出させることによって浮腫が誘発されるかどうかの検証

野生型においても外科的侵襲を加えることによってリンパ浮腫が誘発されるかどうかを検証するために C57Bl/6J マウス、ICR マウスを用いて、妊娠13.5日目の母体マウスに胎仔手術を施して実験を行った。

すると、ICR マウスを用いた場合には子宮を切開する外科的侵襲の有無によらず浮腫をきたす胎仔は観察されなかったのに対し、C57Bl/6J マウスでは意外にも子宮壁を切開して脱出させた胎仔の約67%に浮腫が観察された。ただし、Twist2 ノックアウトマウスで観察された浮腫の程度よりはいずれも軽症であった。また、その胎盤を観察すると、浮腫を来したマウスの胎盤はいずれもうっ血色を呈し、血腫を伴っているものも散見された(図3)。

さらに、組織学的解析を行ったところ、C57Bl/6J で浮腫をきたしたマウスの組織においては、Twist2 ノックアウトマウスと同様にリンパ管の数珠状の拡張を認めた(図4)。血管については拡張などの変化は認めなかった。

以上から、手術によって胎仔を子宮外へ脱出させ、そのまま腹腔内へ還納させておくことによって胎仔の浮腫が誘発されることが

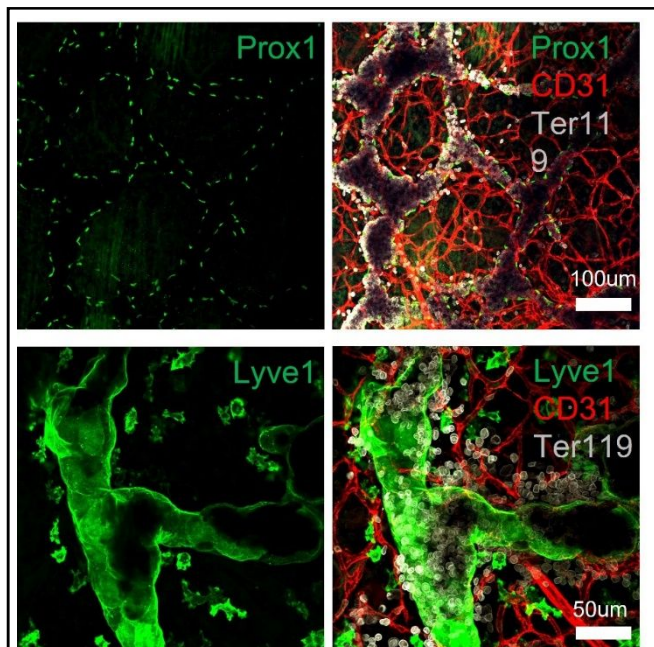


図2. Twist2 胎仔皮膚のホルマウント染色。
背部皮膚をホルマウント染色し、リンパ管・血管の観察を行った。リンパ管内へ血球が流入する blood-filled lymphatic vessels が観察される。

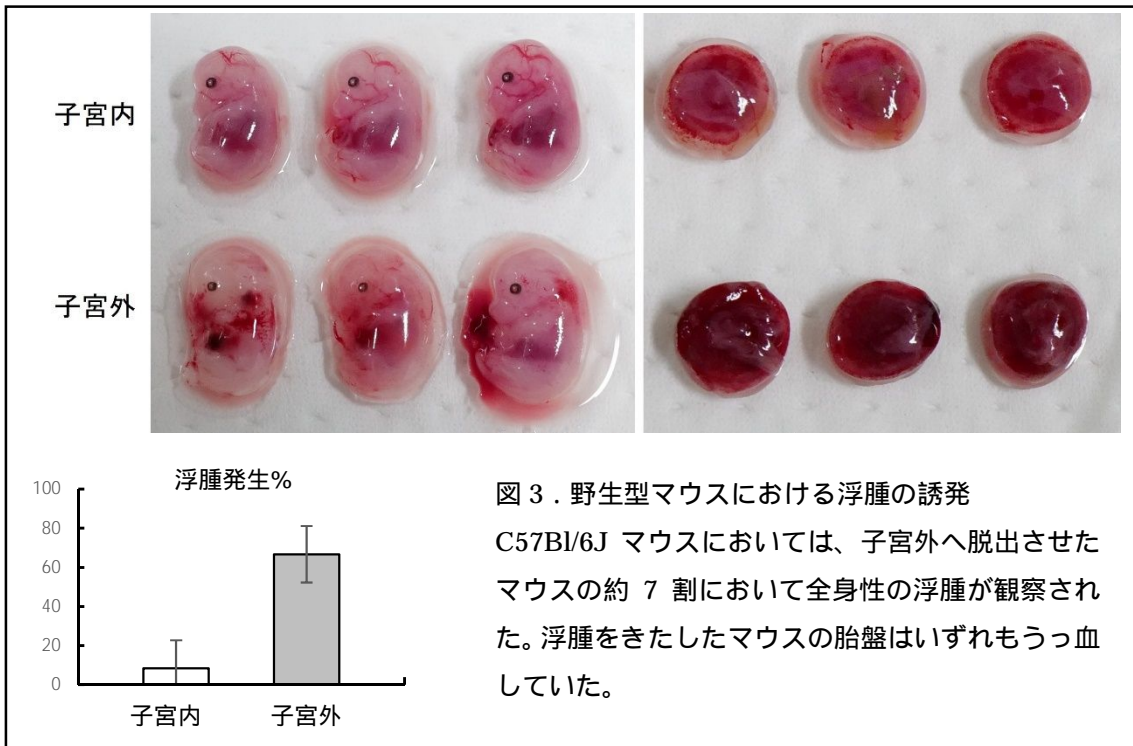


図3. 野生型マウスにおける浮腫の誘発
C57Bl/6J マウスにおいては、子宮外へ脱出させたマウスの約 7 割において全身性の浮腫が観察された。浮腫をきたしたマウスの胎盤はいずれもうっ血していた。

分かった。そのメカニズムの詳細については現時点では不明な点が多いが、浮腫をきたした胎仔の胎盤が例外なくうっ血色をていしていたことから、胎盤の血流不全が胎仔の血行やリンパ動態に変化を及ぼすことによって浮腫が誘発された可能性が高いと考えられた。ただし、その胎仔組織を観察したところでは、リンパ管のびまん性の拡張が認められるものの、血管の変化は乏しく、単に胎仔が静脈性の浮腫をきたした状態とは考えにくく、リンパ管と静脈の不分離など、胎生期特有の現象が病態に関与している可能性が高いと考えられる。

また、C57Bl/6J では子宮外へ脱出させた胎仔に浮腫が誘発された一方で、ICR マウスでは浮腫をきたした胎仔が観察されないという、マウス種ごとの違いがあることが分かった。そのメカニズムについては、ICR は産仔数が多く、体格が大型であることが関連すると考えている。つまり、ICR においては腹腔内の容積に余裕があり、また子宮が比較的大型で隣接する胎盤同士の空間的配置に無理が生じにくいために血流やリンパ動態に変化が起らず浮腫が誘発されなかった可能性がある。今後、処置方法の変更等で検証が可能だと思われる。

本研究では、胎仔に外科的侵襲を加えることによって全身性の浮腫を誘発するという新たなモデルが開発されたが、そのメカニズムについては不明な点が多く残されており今後の検証が必要だと考えられた。

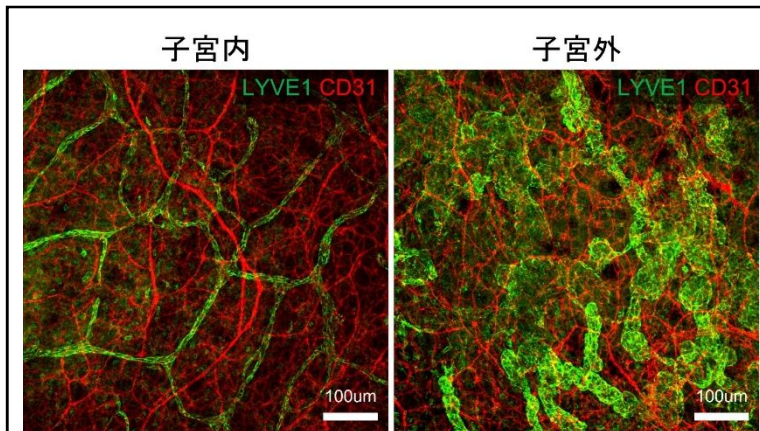


図4. 野生型マウスにおける皮膚ホールマウント染色
浮腫をきたした組織(右)は対照(左)と比較してリンパ管が数珠状に拡張していることが分かる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------