

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16912

研究課題名（和文）リンパ管腫症モデルマウスによる発症メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名（英文）Analysis of a mouse model of generalized lymphatic anomaly

研究代表者

野澤 明史（Nozawa, Akifumi）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：20772106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ管腫症は原因不明の全身臓器にリンパ管組織が増殖する、極めて稀な難治性疾患である。近年、病変部位のリンパ管内皮細胞において、NRAS Q61R変異が検出された。しかし、リンパ管腫症の病態を再現したモデルは報告されておらず、発症メカニズムは全く解明されていない。本研究では、リンパ管内皮細胞にNRAS Q61R変異を発現したトランスジェニックマウスを作製した。作製したマウスにおいて、リンパ管腫症に特徴的な所見である異常に拡張・増殖したリンパ管が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作製したリンパ管腫症モデルマウスを解析することにより、リンパ管腫症の病態解明に繋がり、リンパ管腫症の病変を特異的に抑制する治療薬の開発にも繋げられることが可能となる。また将来的には、リンパ管腫症の難治症例の治癒率やQOL向上、医療費削減などの社会貢献に繋げることができる。

研究成果の概要（英文）：Generalized lymphatic anomaly previously known as diffuse systemic lymphangiomatosis is a rare multisystem congenital disease arising from the lymphatic system, and it is characterized by abnormal proliferation of the lymphatic channels in osseous and extrasosseous tissues. We expressed an active form of NRAS (p.Q61R) in murine lymphatics (iLECNras mice). We found that iLECNras mice developed dilated lymphatic vessels, which is a hallmark of generalized lymphatic anomaly.

研究分野：小児科

キーワード：リンパ管疾患

1. 研究開始当初の背景

リンパ管腫症 (generalized lymphatic anomaly, GLA) は、中枢神経系を除く全身臓器にリンパ管組織が増殖する原因不明の希少性難治性疾患である。小児、若年者に多く発症し症状や予後は様々であるが、胸部に病変を認める場合は予後不良である。最近の研究では、リンパ管腫症の発症に PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路が重要であることが解明され、実際に病変部位においてこれらの経路を恒常的に活性化する PIK3CA 遺伝子や NRAS 遺伝子の低頻度の体細胞変異 (モザイク変異) が検出されている (Angiogenesis. 2018, J Exp Med. 2019)。また、これらの経路をターゲットとした mTOR 阻害薬であるシロリムスは、非臨床試験、国内外の臨床試験の報告から、リンパ管腫症患者に対する有効性が示唆されている (Ozeki M. Orphanet J Rare Dis. 2019)。しかし、リンパ管腫症の病態を再現したモデルは報告されておらず、発症メカニズムは全く解明されていない。

我々は、リンパ管内皮細胞に NRAS 遺伝子変異をモザイク状に発現したマウスモデルを作製し、リンパ管腫症の病態機序解明に結び付ける研究を考案した。

2. 研究の目的

これまでにリンパ管腫症のマウスモデルは報告されておらず、溶骨性変化や多臓器での発生、乳糜胸水・腹水などのリンパ漏などリンパ管腫症における多彩な臨床症状を引き起こす発症メカニズムはよく分かっていない。しかし最近、低頻度の NRAS 遺伝子変異 (Q61R) が病変部位に検出された。この変異により、NRAS が恒常的に活性化することが知られている。低頻度の遺伝子変異によるリンパ管腫症の病態への役割を明らかにするために、リンパ管腫症で見られる NRAS 遺伝子変異 (Q61R) をリンパ管内皮細胞に低頻度に生じるリンパ管腫症モデルマウスを作製する。

このため、場所 (臓器・組織) と時間特異的に遺伝子改変が可能な CreERT2-LoxP システムを用いる。LoxP-Stop-LoxP (LSL) カセットと NRAS 遺伝子変異 (Q61R) GFP が導入されたマウスは、Cre の組み換えにより、Cre 発現細胞特異的に NRAS 遺伝子変異を誘導することができ、かつ、GFP により NRAS 遺伝子変異をもつ細胞を追跡できる。このトランスジェニックマウス (LSL-NRAS Q61R-GFP) を樹立して、リンパ管内皮細胞に特異的に Cre を発現するマウス (Prox1-CreERT2 マウス) を掛け合わせる。このマウスにタモキシフェンを投与すると Cre は核へと移行し、NRAS 遺伝子変異を誘導する。タモキシフェンによる Cre の核への移行は確率論的に起こるため、タモキシフェンの投与量を調節することにより NRAS 遺伝子変異の誘導率を調整できることがこのマウスの重要な特性である。すなわち、低濃度のタモキシフェンを投与した場合には少数だけリンパ管内皮細胞に NRAS 遺伝子変異をもつ細胞を発現させることができ、リンパ管腫症で見られる病態を観察できる。

作製したモデルマウスを用いて、リンパ管内皮細胞の NRAS 変異時に起きる変化を組織学的、機能的、細胞生物学的、分子生物学的に解析し、リンパ管腫症の病態解明を行う。タモキシフェン投与後に経時的に病変組織解析・免疫染色を行う。さらに、これらの組織学的な変化が機能的なレベルにおいても影響を及ぼすかを調べるために、胸水や腹水量を評価する。次に、リンパ管内皮細胞の細胞生物学的、および分子生物学的な解析を行う。PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路に関係する遺伝子発現や蛋白発現をリアルタイム PCR やウエスタンブロットで解析する。最後に、PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路における阻害剤を投与し、その効果について検討することにより、新規治療薬を探索する。

同時に、NRAS 遺伝子変異をヒトリンパ管内皮細胞に導入することにより、細胞株のモデルを作製し、リンパ管腫症におけるリンパ管新生関連遺伝子、PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路に関係する遺伝子の発現の変化について細胞株を利用して詳細な検討を行い、リンパ管腫症の病態解明を行う。

3. 研究の方法

(1) リンパ管腫症モデルマウス

(リンパ管内皮細胞に NRAS 遺伝子変異をモザイク状に発現したマウスモデル) の作製

マウスのリンパ管内皮細胞に低頻度の NRAS Q61R 変異を導入し、リンパ管腫症の病態をマウスモデルで再現する。まずこの変異を発現するトランスジェニックマウスの作製を行う。CAG プロモーター下に LoxP STOP LoxP (LSL) を介して NRASQ61RcDNA と、この変異をもつ細胞を追跡できる GFPcDNA を配置した遺伝子断片を生殖細胞に導入したマウスを作製する。これにより、Cre 存在化では NRASQ61R が発現するマウスが得られる。

NRAS 変異マウスの作製に成功した後、リンパ管内皮細胞特異的に NRASQ61R を発現させるために、リンパ管内皮細胞特異的に CreERT2 (タモキシフェン依存的に活性化する Cre) を発現するマウス (Prox1-CreERT2 マウス) と交配し、低濃度のタモキシフェンを投与することにより、NRAS Q61R 変異をリンパ管内皮細胞に低頻度に生じるリンパ管腫症モデルマウスを作製する。タモキシフェン投与時期およびリンパ管内皮細胞特異的に NRASQ61R が発現することを確認する。

(2) リンパ管腫症モデルマウスの解析によるリンパ管腫症の病態の解明と治療への応用

病変部の組織学的解析

(1) で得られたリンパ管腫症モデルマウスにおいて、病変組織をリンパ管内皮細胞マーカーである、LYVE-1、Prox1、D2-40、CD31 などを用いた免疫化学染色法で調べ、リンパ管腫症の病態について検討する。

病変部の機能的解析

(1) で得られたリンパ管腫症モデルマウスにおいて、病変の大きさ、胸水や腹水量などを評価し、リンパ管腫症の病態について検討する。

病変部のリンパ管内皮細胞の細胞生物学的、および分子生物学的な解析

(1) で得られたリンパ管腫症モデルマウスの病変組織において、リンパ管内皮細胞の、PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路に関係する遺伝子発現や蛋白発現 (AKT, p-AKT, ERK, p-ERK, mTOR, RAS, MAPK など) をリアルタイム PCR やウエスタンブロットで解析し、NRAS 変異のない正常マウスと比較することで、リンパ管腫症の病態について検討する。

PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路を標的とした阻害剤の効果の検討

(1) で得られたリンパ管腫症モデルマウスに PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路を標的とした阻害剤 (PIK3CA 阻害剤、MEK 阻害剤、mTOR 阻害剤など) を投与し、病変部に対する効果を、組織学的、機能的、細胞生物学的、分子生物学的に解析する。

(3) リンパ管腫症モデル細胞株の作製と遺伝子発現解析による病態解明

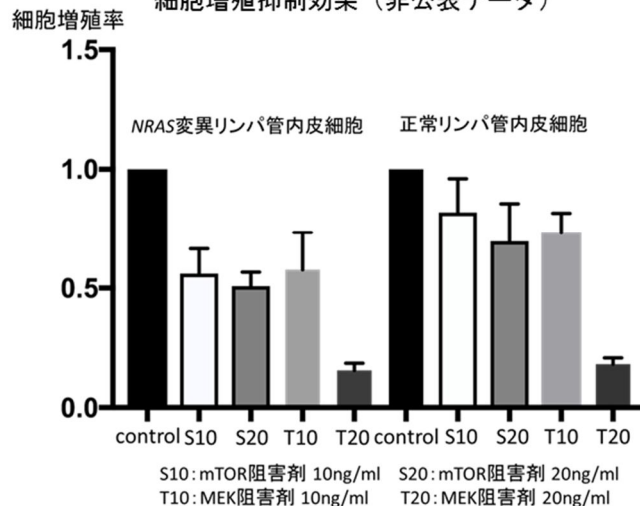
NRAS (Q61R) cDNA をプラスミドに挿入する。その後、そのプラスミドを、Nucleofector を用いて、ヒトリンパ管内皮細胞株 (HULEC) に遺伝子導入して、リンパ管腫症モデル細胞株を作製する。細胞から RNA を抽出し、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR3、Prox1 などのリンパ管新生関連遺伝子、PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路に関係する遺伝子の発現の変化についての検索を行う。

4. 研究成果

(1) リンパ管腫症モデル細胞株の作製と解析

リンパ管内皮細胞に NRAS Q61R 変異を導入し、細胞の性質を調べる in vitro 研究を行った。細胞増殖能や、tube 形成能などは、大きく変わらなかったが、NRAS 変異により活性化する PI3K/Akt/mTOR 経路や RAS/MAPK 経路を標的とした mTOR 阻害剤や、MEK 阻害剤による細胞増殖抑制効果が、正常のリンパ管内皮細胞に比べてより大きく、治療標的になる可能性が示された。

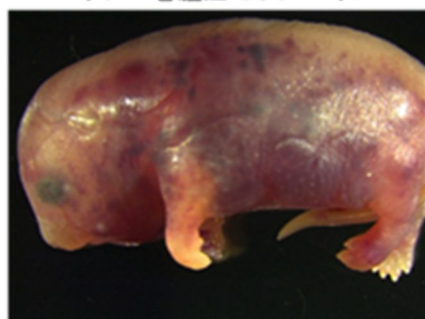
NRAS変異導入リンパ管内皮細胞に対するmTOR阻害薬、MEK阻害薬の細胞増殖抑制効果 (非公表データ)



(2) 胎生期からリンパ管内皮細胞に NRAS Q61R を発現させたマウスの解析

Cre 存在化で NRAS Q61R が発現するマウス (LSL-NrasQ61R^{+/+}) とリンパ管内皮細胞特異的に CreERT2 (タモキシフェン (TM) 依存的に活性化する Cre) を発現するマウス (Prox1-Cre-ERT2^{+/+}) を交配させ、妊娠マウスに胎生 11.5 日から TM200mg/kg を腹腔内に 2 日間連続投与した。胎生 18.5 日に胎児を観察したところ、著明な皮下浮腫が見られた。そのマウスの背部皮膚において、リンパ管に対する抗体 (LYVE-1 抗体) を用いた whole mount 染色を行い蛍光顕微鏡下で観察したところ、コントロールと比較して、リンパ管腫症に特徴的な所見である異常に拡張・増殖したリンパ管が見られた。今後は、このリンパ管腫症モデルマウスの全身のリンパ管の詳細な解析や、RAS/MAPK 経路を標的とした阻害薬の効果の検討などを行い、論文化を予定している。

リンパ管腫症モデルマウス

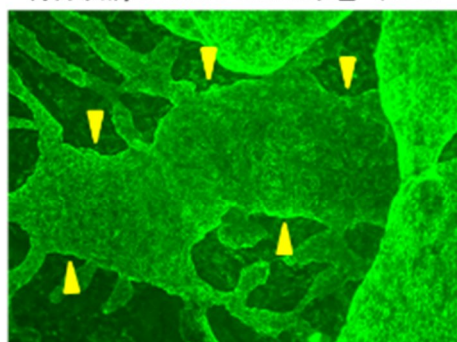


コントロール

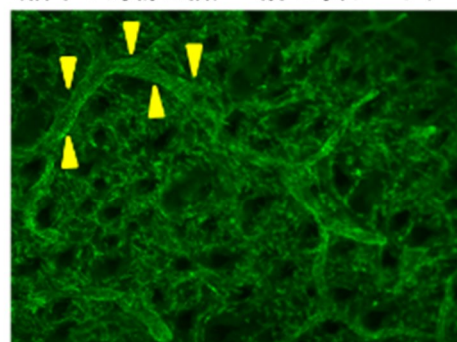


出生後のリンパ管腫症モデルマウスで
確認された著明な皮下浮腫（非公表データ）

背部皮膚のwhole mount染色（LYVE-1）（倍率：対物10倍）（非公表データ）



リンパ管腫症モデルマウスで確認された
異常に拡張・増殖したリンパ管（矢印）



コントロールで見られる
正常なリンパ管（矢印）

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|