

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791702

研究課題名(和文) 血管成熟・リンパ管新生の新しい治療法

研究課題名(英文) The new methods for suppression of blood vessel maturation and lymphangiogenesis

研究代表者

丸山 和一 (MARUYAMA KAZUICHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10433224

研究成果の概要(和文)： podoplaninFcキメラ蛋白を使用し、マウス角膜縫合モデルを用い、リンパ管新生反応が抑制できるかどうかを検討した。その結果、角膜縫合モデルでpodoplaninFcキメラ蛋白を使用することでリンパ管の誘導抑制が認められ。また血管成熟の反応では、マウス角膜縫合モデルや胎生期血管新生(生理的)モデルを用い、Fcキメラ蛋白を結膜下または腹腔内投与を行い、コントロール群と比較すると有意に血管成熟を抑制することに成功した。特に炎症期の血管には、血管周皮細胞の誘導は抑制されており、また血管自体もかなり狭細化していたことが判明した。また網膜血管では血管誘導方向も抑制されており、血管構築の異常が認められていた。In vitroの実験においても、血管内皮と血管周皮細胞をを共培養し、migrationを確認した結果、血管周皮が血管内皮側へ誘導することを抑制出来た。この結果は血管周皮細胞誘導に関連するサイトカインであるPDGF(platelet derived growth factor)-BBと同様の結果を得ることが出来たためpodoplaninはPDGF-BBと強いaffinityがある可能性があると考えた。この結果、podoplaninをコントロールすることでリンパ管新生だけでなく血管成熟も抑制することが出来た。

研究成果の概要(英文)： Podoplanin Fc protein could suppress corneal hem-and lymphangiogenesis. Also, it could suppress vessel maturation in cornea. Podoplanin Fc protein injection into peritoneal cavity suppressed the retinal vessel maturation during post-natal stage.

In migration assay, podoplanin Fc protein and PDGF-BB neutralizing antibody could suppress pericyte migration toward to blood vessel endothelium.

In conclusion, to control podoplanin function could suppress blood vessel maturation and lymphangiogenesis

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：細胞・組織、癌、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は、近年内皮特異的マーカーが発見されるまで、可視化することが出来ず、電子顕微鏡による構造上特徴の観察において血管と区別されていた。現在は、lymphatic hyalonic acid receptor-1 (LYVE-1), podoplanin, Prox-1, VEGFR3 などの内皮特異的抗体を用いることにより血管と判別することが出来る。元来リンパ管は静脈から分岐すると考えられていたが、成人期、特に炎症状態におけるリンパ管新生についてのメカニズムは解明されていなかった。しかし、我々はリンパ管内皮の特徴をもつ前駆細胞を発見し、その前駆細胞がマクロファージであることを証明し、なおかつ炎症性マクロファージによって炎症期のリンパ管が誘導されることを角膜を使用した実験により証明した (Maruyama K, J. Clni Invest 2005)。角膜には元来血管・リンパ管が存在せず、炎症惹起により無血管・リンパ管組織である角膜にそれらは新生することがわかっている。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。特に眼科領域に限定しないが、臓器・組織移植後の拒絶反応や悪性腫瘍の所属リンパ節への転移は大きな問題である。ま

た血管に関連しても、臓器・組織移植後の拒絶反応や悪性腫瘍の多臓器への転移や播種は生命予後に関わる問題である。現在、拒絶反応抑制にはステロイドや免疫抑制剤や悪性腫瘍の多臓器転移には抗ガン剤などが使用されているが、副作用などの大きな問題がある。

2. 研究の目的

未だ解決出来ない血管・リンパ管新生による臓器・組織移植後の拒絶反応や悪性腫瘍の多臓器・組織への転移を抑制出来る可能性のある新しい治療法の開発を目的とした

3. 研究の方法

角膜を用いた血管・リンパ管新生の誘導を用い、薬剤（中和抗体など）を結膜下や腹腔内に投与し、血管・リンパ管新生の誘導を抑制出来るかどうかを免疫染色を用い検討した。また血管内皮細胞と周皮細胞を共培養し、その細胞の migration assay を行い中和抗体などの薬剤で抑制出来るかどうかを検討した。

4. 研究成果

平成21年度にはpodoplanin中和抗体を使用し、マウス角膜移植モデルを用い、ノーマル

リスク（術前に血管侵入が存在しない）とハイリスク（術前に血管侵入が存在する）モデルにおいて、拒絶反応が抑制できるかどうかを検討した。その結果、角膜縫合モデルで podoplanin 中和抗体を使用することでリンパ管の誘導抑制が認められ、拒絶モデルにおいても（ノーモラルリスクモデル）中和抗体を使用した群では拒絶反応を有意に抑制した。平成22年度には podoplaninFc キメラ蛋白を使用し、マウス角膜縫合モデルを用い、リンパ管新生反応が抑制できるかどうかを検討した。その結果、角膜縫合モデルで podoplaninFc キメラ蛋白を使用することでリンパ管の誘導抑制が認められ。また血管成熟の反応では、マウス角膜縫合モデルや胎生期血管新生（生理的）モデルを用い、Fc キメラ蛋白を結膜下または腹腔内投与を行い、コントロール群と比較すると有意に血管成熟を抑制することに成功した。特に炎症期の血管にては、血管周皮細胞の誘導は抑制されており、また血管自体もかなり狭細化していたことが判明した。また網膜血管では血管誘導方向も抑制されており、血管構築の異常が認められていた。In vitro の実験においても、血管内皮と血管周皮細胞をを共培養し、migration を確認した結果、血管周皮が血管内皮側へ誘導することを抑制出来た。この結果は血管周皮細胞誘導に関連するサイトカインである PDGF (platelet derived growth factor)-BB と同様の結果を得ることが出来たため podoplanin は PDGF-BB と強い affinity がある可能性があると考えた。この結果、podoplanin をコントロールすることでリンパ管新生だけでなく血管成熟も抑制することが出来た。

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7件）

① Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Maruyama K, Kinoshita S, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis: British Journal of Ophthalmology 94 (3) 336-340, 2009

② Sugita S, Horie S, Nakamura O, Maruyama K, Takase H, Usui Y, Takeuchi M, Ishidoh K, Koike M, Uchiyama Y, Peters C, Yamamoto Y, Mochizuki M. Acquisition of T regulatory function in cathepsin L-inhibited T cells by eye-derived CTLA-2alpha during inflammatory conditions Journal of Immunology, 183 (8) 5013-5022, 2009

③ Koizumi H, Maruyama K, Kinoshita S, Blue light and near-infrared fundus autofluorescence in acute Vogt-Koyanagi-Harada disease, British Journal of Ophthalmology, 2009

④ Fukumoto A, Maruyama K, Walsh T, Kajiya K, Hamuro J, D'Amore PA, Kinoshita S, Intracellular Thiol Redox Status

Regulates Lymphatic Vessel Growth in the Cornea and Dictates Corneal Limbal Graft Survival. Investigative Vision and Ophthalmology, 2009

⑤ Nakao S, Maruyama K, Zandi S, Melhorn MI, Taher M, Noda K, Nusayr E, Doetschman T, Hafezi-Moghadam A., Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains. FASEB Journal, 2010, 24, 504-513

⑥ Regenfuss B, Onderka J, Bock F, Hos D, Maruyama K, Cursiefen C. Genetic heterogeneity of lymphangiogenesis in different mouse strains. American Journal of Pathology 2010 177 501-510

⑦ Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Maruyama K, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A. Lymphoid neogenesis in the giant papillae of patients with chronic allergic conjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 177, 1310-1312, 2010

[学会発表] (計 2 件)

① 丸山和一、Dontcho Kerjaschki、Patricia D'Amore、木下茂 Podoplanin 中和抗体による角膜リンパ管新生と角膜移植後拒絶反応の抑制 日本眼科学会総会 東京 2009

② Kazuichi Maruyama, Podoplanin regulates corneal epithelial cell proliferation and morphology, ARVO 2010 Ft. Lauderdale

[その他]
ホームページ等
<http://www.opth.kpu-m.ac.jp/introduction/maruyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 和一 (MARUYAMA KAZUICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：10433224

(2) 研究分担者 無し

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 無し

()

研究者番号：