

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：22590187

研究課題名（和文） 血球および骨髄由来細胞によるリンパ管形成制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of blood cell- and bone marrow-derived cell-induced separation of the blood and lymphatic vasculature

研究代表者

市瀬 多恵子（ICHISE TAEKO）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00396863

研究成果の概要（和文）：

PLC γ 2 遺伝子欠損マウスでは血管とリンパ管の分離異常が認められるが、その分離を制御する細胞の実体と機能の詳細は明らかでない。本研究では、Cre/loxP 組換えによって PLC γ 2 の発現を制御できる遺伝子改変マウスと複数の Cre ドライバーマウスシステムを利用した、組織特異的 PLC γ 2 の発現誘導によるレスキュー実験を進めた。その結果、正常な血管・リンパ管形成に寄与する細胞の種類を絞りこむことに成功し、巨核球あるいは血小板が中心的な役割を果たすことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We have previously demonstrated that PLC γ 2 plays an essential role in initiating and maintaining the separation of the blood and lymphatic vasculature. To further investigate the PLC γ 2-mediated mechanism by which lymphatic vessels are separated from blood vessels, we generated genetically engineered mice expressing PLC γ 2 in cell type-specific, Cre/loxP-dependent manners. Using the mice, we obtained results suggesting that megakaryocytes might play a central role in the vascular separation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
H23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
H24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：リンパ管; PLC-gamma2; VEGFR-3; Cre/loxP; マウス

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は、胎生期静脈の一部より転写因

子 Prox-1 の制御下で分化し、VEGFR-2 および 3 のリガンド、VEGF-C に依存した出芽および遠心性の伸長によって、血管系とは独立

して末梢組織へと発生していく。さらに、VEGF-CやTie-2のリガンド、Ang-2などに依存した、末梢組織でのリンパ管網の構築が進行して形成が完了する (Adams and Alitalo, 2007)。その一方で、2003年に、非受容体型チロシンキナーゼ Syk あるいはアダプター分子 SLP-76 を発現する骨髄由来細胞が、血管とリンパ管の分離状態維持に必須であることが示され (Abtahian et al. 2003)、既知のシステムとは異なる、遊走性細胞による脈管系の形成および維持機構の存在が明らかになった。

しかし、この形態形成機構が、どのような細胞レベル、分子レベルの機序によって成立しているのかという点について、多くの矛盾や未解決の問題が存在している。国外の研究動向をまとめると、

(1) 血管・リンパ管形成に関連する研究の成果として、骨髄細胞から、血球のみならず、内皮前駆細胞、壁細胞などが分化し、血管・リンパ管形成に寄与するとする、様々な報告が存在し、コンセンサスの形成や体系的理解が進んでいない。研究者による実験系、検出系の違いや技術的限界がその原因となっている。

(2) SLP-76、Syk は血小板で発現し、血小板の機能にも寄与しているため、血小板機能不全による出血と、二次的影響としての血管・リンパ管形成異常の可能性を支持する研究グループが存在する一方で、血小板による骨髄由来細胞のリクルートの重要性に着目する研究グループも存在する。

(3) circulating endothelial progenitor (CEP) 細胞の一部で Syk および SLP-76 が発現していること、SLP-76 遺伝子欠損マウスでは、末梢血中の Lyve-1 および VEGFR-3 陽性の "CEP" 細胞が認められないとする実験結果を根拠に、CEP 依存性の血管・リンパ管の連絡あるいは分離の制御機構の存在を示唆する報告があるが (Sebzda et al. 2006)、その細胞と発症との関係については直接的な証拠がなく、"CEP" 細胞の定義や性質についても、検討の余地がある。

2. 研究の目的

本研究では、血管・リンパ管分離異常が認められる PLC γ 2 欠損マウスを主たる研究対象とし、血管・リンパ管の適正な形成制御機構を明らかにすることを目的とする。血球や骨髄由来細胞が血管・リンパ管の接続やその分離に寄与する点に着目し、その制御に寄与する細胞の種類の特定を行い、当該細胞でのシグナル伝達、および接続の発生機序の解明を試みる。

特に、骨髄由来細胞が 1) 内皮前駆細胞あるいは内皮細胞として、接続部位での内皮として寄与している 2) 血小板として、液性因子の放出や細胞接着、止血を介して寄与している 3) マクロファージとして、それ自身が内皮細胞様の挙動をとる、あるいは内皮の細胞死誘導や増殖促進作用によって寄与している、の3点の可能性を追求する。

3. 研究の方法

リンパ管内皮細胞を特異的に標識する Vegfr3-GFP ノックイン・アリルを利用した、Plcg2 遺伝子変異マウスの異常なリンパ管網の可視化、および骨髄細胞に由来する血管・リンパ管内皮細胞の存在、挙動に関する検討を行なった。

Cre/loxP 組換えによって PLC γ 2 の発現を制御できる遺伝子改変マウスを作成した。さらに、作成したマウス系統と複数の Cre ドライバーマウス系統を利用した、組織特異的 PLC γ 2 の発現誘導によるレスキュー実験を行なった。

細胞の性質を損なわずに不死化を進めることができることが期待される、変異型 SV40T 抗原を発現する遺伝子導入マウスを用いた培養方法を用いて不死化巨核球を準備し、血管・リンパ管分離の in vitro 再構成実験系を構築して分子機構を解析することを試みた。

4. 研究成果

蛍光実体顕微鏡および画像処理ソフトウェアを利用した Vegfr3-GFP ノックインマウス観察の予備実験を進め、胎仔および成体のリンパ管の立体的把握が可能であることを確認した。また、骨髄由来細胞からのリンパ管内皮細胞への分化が血管・リンパ管の分離過程に関与する可能性は、皆無だとは断定できないものの極めて低いという知見を得た。

Cre/loxP 組換えによって PLC γ 2 の発現を制御できる遺伝子改変マウスと複数の Cre ドライバーマウス系統を利用した組織特異的 PLC γ 2 の発現誘導によって、正常な血管・リンパ管形成に寄与する細胞の種類を絞りこむことに成功し、巨核球あるいは血小板が中心的なレギュレーターであることを強く示唆する結果を得た。しかし、本研究で使用した巨核球特異的として知られる Cre ドライバーマウスにおいて、巨核球以外の細胞での組換えが起こっていることも同時に見出したため、分離制御における巨核球および血小板の機能を、別の実験系によって明らかにする

必要が生じた。

条件的不死化細胞の単離のための使用を予定していた遺伝子導入マウスの巨核球では変異型 SV40T 抗原の発現が認められないことが分かったため、変異型 SV40T 抗原を Cre/loxP 遺伝子組換えでコンディショナルに発現する遺伝子ユニットを構築し、Rosa26 遺伝子座に当該遺伝子ユニットをノックインで導入した ES 細胞株を単離した。生殖系列キメラマウスを経由してヘテロ型マウスを作成し、さらに Plcg2 遺伝子変異マウスや Cre ドライバーマウスとの交配を開始して、Plcg2 遺伝子欠損および野生型の不活化巨核球を単離するためのマウスの作出を進めた。

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 5 件)

①

Ichise, T., Yoshida, N., Ichise, H.
Ras/MAPK Signaling Modulates VEGFR-3 Expression through Ets-Mediated p300 Recruitment and Histone Acetylation on the Vegfr3 Gene in Lymphatic Endothelial Cells.
PLoS One. 7:e51639, 2012
10.1371/journal.pone.0051639

②

Osada, M., Inoue, O., Ding, G., Shirai, T., Ichise, H., Hirayama, K., Takano, K., Yatomi, Y., Hirashima, M., Fujii, H., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y.
Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells.
The Journal of biological chemistry. 287:22241-22252, 2012
10.1074/jbc.M111.329987

③

Funato, Y., Terabayashi, T., Sakamoto, R., Okuzaki, D., Ichise, H., Nojima, H., Yoshida, N., Miki, H.
Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive Dishevelled protein.
Current biology. 20:1945-1952, 2010
10.1016/j.cub.2010.09.065

④

Hayashi, T., Funato, Y., Terabayashi, T., Morinaka, A., Sakamoto, R., Ichise, H., Fukuda, H., Yoshida, N., Miki, H.
Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88).
The Journal of biological chemistry. 285:18586-18593, 2010
10.1074/jbc.M110.106468

⑤

市瀬 広武
リンパ管新生における Ras の役割
リンパ学 33 2010, 102-106 (査読無)
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ed6lymph&ye=2010&vo=33&issue=2>

[学会発表] (計 3 件)

①

Hirotake Ichise
“A Modulatory Role of Ras in VEGFR-3 Signalling during Normal and Pathological Lymphangiogenesis”
第 3 2 回 日本炎症・再生医学会シンポジウム “Tumor Microenvironment and Inflammation”
2011 年 6 月 2 日
国立京都国際会館 (京都)
(招待講演)

②

市瀬 広武
「リンパ管新生における Ras の役割」
第 34 回日本リンパ学会総会
2010 年 6 月 26 日
東京大学山上会館 (東京)
(招待講演)

③

Hirotake Ichise
“Role of Ras in lymphangiogenesis”
Gordon Research Conference 2010,
“Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease”
June 15, 2010
Lucca (Barga), Italy
(招待講演)

[図書] (計 1 件)

①

市瀬 広武 (光嶋 勲 編著)
永井書店
「よくわかるリンパ浮腫のすべて」(分担執

筆)

2011年、213 ページ中 6 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市瀬 多恵子 (ICHISE TAEKO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：00396863

(2) 研究分担者

市瀬 広武 (ICHISE HIROTAKE)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：10313090

(3) 連携研究者

該当なし