

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24年5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791057

研究課題名（和文）創傷治癒および腫瘍免疫における、リンパ流の関与

研究課題名（英文）Role of lymphatic flow in wound healing and tumor immunity

研究代表者

菅谷 誠 (SUGAYA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90334408

研究成果の概要（和文）：リンパ流に障害のあるマウスでは野生型と比べて創傷治癒が遅延しており、肥満細胞の増加、組織球の減少、IL-10 の発現の増加、basic FGF の発現の減少を認めた。正常マウスの尾に人工的に作成したリンパ浮腫でも、同様の所見を認めた。また腫瘍免疫に関しては、リンパ流に障害があるマウスではリンパ節への腫瘍の転移を認めず、リンパ節でのTNF- α や IFN- γ の産生が低下していた。一方、皮膚局所での腫瘍形成は促進しており、リンパ節での抗腫瘍免疫が成立しないためと考えた。

研究成果の概要（英文）：Wound healing was significantly delayed in the transgenic (TG) mice with severe lymphatic dysfunction when compared to wild-type (WT) mice. In wounded skin of TG mice, mast cell numbers were increased, whereas macrophage numbers were decreased. Moreover, increased IL-10 mRNA levels and decreased levels of basic fibroblast growth factor were detected in wounded skin of TG mice compared to WT mice. Similar results were obtained using a different lymphedema model, in which circumferential full thickness skin excision was performed on the tails of WT mice to remove the superficial lymphatics. With regards to tumor immunity, TG mice that had been subcutaneously injected with B16 melanoma cells did not show metastasis in the draining lymph node (LN). Expression levels of TNF- α and IFN- γ were significantly lower in the draining LN of TG mice compared to WT mice. By contrast, larger tumor formation was observed in the injected site in TG mice, suggesting that sufficient immune response against tumor cells was not established in the draining LN of TG mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：免疫、リンパ、創傷治癒、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 創傷治癒は人体が外界からの脅威を防御する上で、生体にとってきわめて重要なプロセスである。また腫瘍免疫は、日本人の死亡原因の第一位である癌に対する人体の防御機構として極めて重要である。リンパのうっ滞、すなわちリンパ流の障害が、創傷治癒過程や腫瘍免疫にどのように影響を与えるのか、これまでマウスを用いた研究はほとんどなされていない。

(2) カポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子導入マウスは、カポジ肉腫ウイルス遺伝子の一つである v-cyclin を、リンパ管内皮細胞のマーカである VEGF 受容体 3 のプロモータを用いてリンパ管特異的に発現させている。研究代表者はこのマウスの解析を行い、リンパ流の障害によって、リンパ浮腫や胸水の貯留を来すことを世界に先駆けて報告した (Sugaya M, et al.: *Blood* 2005)。

2. 研究の目的

創傷治癒および腫瘍免疫におけるリンパ流の役割を明らかにする。そのため、リンパ流に障害のあるマウスモデルを用いて創傷治癒および腫瘍免疫の解析を行う。このような解析は、リンパうっ滞が生体にもたらす様々な不利益を理解し、リンパ浮腫のコントロールの重要性を認識する上で極めて重要である。あるいは、リンパ流の障害の影響を知ることにより、正常な創傷治癒、腫瘍免疫のメカニズムをより正確に理解し、治療に役立てることができる。

3. 研究の方法

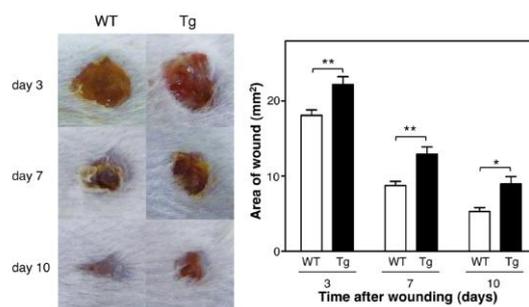
(1) カポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子

導入マウス（リンパ流に障害のあるマウス）をヘテロで繁殖し、同腹の野生型マウスを対照として創傷治癒の実験に用いる。皮膚に 6mm 径の創を作成し、創面積、上皮間距離をパラメータとして創傷治癒過程を評価する。また炎症細胞の浸潤を検討し、創傷治癒に関与するサイトカイン、細胞成長因子の発現を解析する。

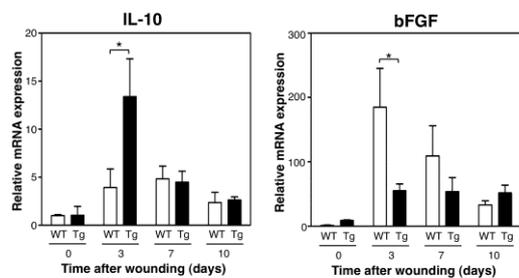
(2) カポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子導入マウスと C57BL/6J マウスを交配し、リンパ流に障害のある F1 と野生型の F1 を作成する。B16 メラノーマ細胞、EL4 リンパ腫細胞を F1 に注射し、腫瘍の肉眼的大きさや組織学的所見を解析する。また、所属リンパ節への腫瘍細胞の流入を定量化し、所属リンパ節の細胞毒性 T リンパ球の細胞傷害効果を評価して、腫瘍免疫の成立を確認する。

4. 研究成果

(1) マウス背部に作成した創傷治癒に対する肉眼的評価を行い、リンパ流に障害があるマウスのほうが創傷治癒が遅れることを見出した（図 1）。これは臨床における経験に合致する所見である。また創部におけるサイトカインの発現を解析したところ、リンパ流に障害があるマウスにおいて IL-10 の発現が



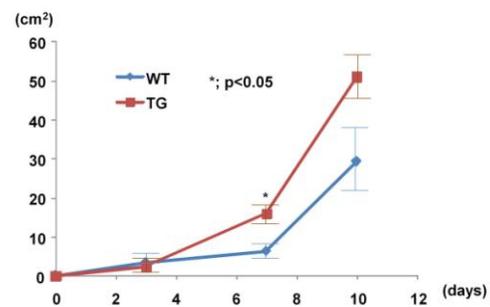
(図 1) リンパ流障害があるマウスにおける創傷治癒



(図2) 創部におけるサイトカインの発現

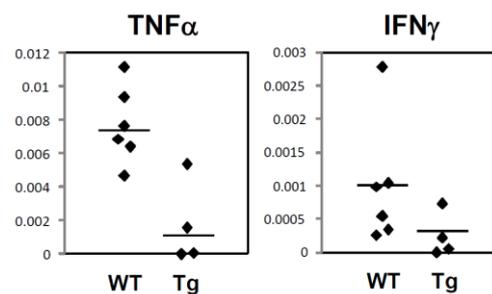
亢進し、basic FGF の発現が低下していることを見出した(図2)。IL-10 ノックアウトマウスでは創傷治癒が促進することが報告されており、リンパ流の障害に伴って亢進したIL-10 が創傷治癒の遅れに関与している可能性が示された。そこでIL-10 ノックアウトマウスとリンパ流に障害のあるマウスを交配し、背部に作成した創傷の治癒を検討したところ、IL-10 ノックアウトの背景では、リンパ流の障害の有無で創傷治癒に差がなかった。また、正常マウスの尾に人工的にリンパ浮腫を作成し、そこに創傷を作成したところ、リンパ流に障害のあるマウスと同様の所見を認めた。さらに、創部において肥満細胞がIL-10 を発現しすることを免疫染色で示した。以上より、リンパ流に障害があると肥満細胞が増加し、肥満細胞が産生するIL-10 によって組織球の遊走が阻害され、創傷治癒が遅延するという流れが判明した。これはリンパ浮腫に伴う下腿潰瘍の新たな治療法に結び付くと考えられる。

(2) マウス腹部にB16メラノーマ細胞を注射し、皮膚における腫瘍形成を調べたところ、リンパ流に障害があるマウスのほうが野生型マウスと比べて、大きな腫瘍を形成した(図3)。腫瘍負荷したマウスのリンパ節を確認したところ、リンパ流に障害があるマウスではリンパ節への腫瘍の転移を認めなかった。また、所属リンパ節でのTNF- α やIFN- γ の産生も、野生型マウスと比べて著しく低



(図3) 皮膚における腫瘍形成

下していた(図4)。従って、リンパ流の障害によって腫瘍細胞がリンパ節へ流入しないことにより、リンパ節での抗腫瘍免疫が成立せず、皮膚での腫瘍形成が促進すると思われる。これは腫瘍免疫におけるリンパ流の役割を示唆する重要な知見と考えた。



(図4) 所属リンパ節におけるサイトカインの発現

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14件)

① Sugaya M, Kuwano Y, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kadono T, Okochi H, Blauvelt A, Tamaki K, Sato S. Lymphatic dysfunction impairs antigen-specific immunization, but augments tissue swelling following contact with allergen. *J Invest Dermatol*, 査読有、132(3 Pt 1): 667-676、2012、DOI: 10.1038/jid.2011.349

② Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Kamata M, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T cell lymphoma *Clin Cancer Res*, 査読有、17(24): 7529-7538、2011、DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1192

③Miyagaki T, Sugaya M, Okochi H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Blauvelt A, Tamaki K, Sato S. Blocking MAPK signaling downregulates CCL21 in lymphatic endothelial cells and impairs contact hypersensitivity responses. *J Invest Dermatol*, 査読有、131(9): 1927-1935、2011(co-first author)、DOI: 10.1038/jid.2011.135

④Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. CCL11-CCR3 interactions promote survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. *Cancer Res*, 査読有、71(6): 2056-2065、2011、DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3764

⑤Sugaya M, Reed S, Rose PP, de la Motte S, Rago CM, Kurtz SE, Moses AV, Fruh K, Blauvelt A. Kaposi's sarcoma and human dermal microvascular endothelial cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus express CCL21. *J Dermatol Sci*, 査読有、61(2): 139-142、2011、DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.11.017

⑥Miyagaki T, Sugaya M, Fujita H, Ohmatsu H, Kakinuma T, Kadono T, Tamaki K, Sato S. Eotaxins and CCR3 interaction regulates Th2 environment of cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol*, 査読有、130(9): 2304-2311、2010、DOI: 10.1038/jid.2010.128

[学会発表] (計4件)

①Kimura T, Hamazaki T, Sugaya M, Sato S, Okochi H. Effect of cilostazol on lymphatic endothelial cells in vitro and lymph flow in vivo. 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2011年12月9日-11日、京都国際会議場

②Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Suga H, Kai H, Kamata M, Tada Y, Sato S. Association of the numbers of CD163⁺ macrophages in lesional skin and serum levels of soluble CD163 with disease progression of cutaneous T cell lymphoma. The 71st Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 2011年5月4日-7日、アメリ

カ合衆国フェニックス

③Sugaya M, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Sato S. Differential patterns of CXCR3, CCR3, and CCR10 expression in mycosis fungoides, Sézary syndrome, and CD30+ lymphoproliferative disorders. First World Congress of Cutaneous Lymphomas. 2010年9月22日-25日、アメリカ合衆国シカゴ

④Miyagaki T, Sugaya M, Kadono T, Murakami T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. Eotaxin-CCR3 interaction increases survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation pathway (oral presentation in Cutaneous T Cell Lymphoma Symposium). The 70th annual meeting of Society for Investigative Dermatology. 2010年5月8日-10日、アメリカ合衆国アトランタ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 誠 (SUGAYA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90334408