

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792062

研究課題名(和文)リンパ管再生機序の解明と再生誘導への応用

研究課題名(英文)The mechanism of lymphatic regeneration and its therapeutic application

## 研究代表者

清水 一彦(Shimizu, Kazuhiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90385394

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)：本研究において、まずリンパ節移植法を開発した。移植リンパ節には、移植後4週間にリンパ管が開通する事が分かった。しかし、移植リンパ節は移植後4週間目には矮小化し、移植後7週間目までに正常リンパ節と同じ大きさまで回復した。移植リンパ節の微細構造を観察すると、移植後7週目のリンパ節はリンパ洞の拡張が観察されたものの、再生リンパ管は安定していた。さらにRT-PCRの結果、移植リンパ節はリンパ管内皮増殖因子の発現が認められた。以上の結果より、リンパ節を移植することで機能的なリンパ管が再生できることが示唆された。本法はリンパ浮腫をはじめとした様々なリンパ管病態治療戦略として期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed a lymph node transplantation method in order to examine the regeneration mechanisms of lymphatic vessels in mice. After 4 weeks of lymph node transplantation, the lymphatic vessels regenerated for the transplanted lymph nodes. However, the size of the transplanted lymph nodes was small at 4 weeks, and returned to the normal level 7 weeks after transplantation. In addition, the regenerated lymphatic vessels of the transplanted lymph nodes were stable after transplantation. Moreover, RT-PCR analyses revealed that the transplanted lymph nodes expressed lymphatic endothelial growth factors. These results suggest that the functional lymphatic vessels can be induced by transplanting lymph nodes. This method would provide a novel therapeutic strategy for various lymphatic disorders, such as lymphedema.

研究分野：組織学 分子組織学 顕微解剖学

キーワード：リンパ節移植 リンパ管再生

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫はリンパ管の機能不全により起こる。現在までの主な治療法として弾性着衣による圧迫療法やリンパ管静脈吻合術などがあるが完治する患者は少なく、機能的なリンパ管の回復が望まれる。リンパ管研究は、近年まで特異的マーカーが発見されていなかったこともあり、同じ微小循環系である血管と比べ、大きく遅れをとってきた。特にリンパ管再生に関しては、分子生物学的観点からの解析は多いが、リンパ浮腫の新たな治療法を開発する為にも、生体内におけるリンパ管の発生・再生のメカニズムを知ることが極めて重要である。

我々は以前より正常・異常を問わず、リンパ管を含む局所の微小循環系の形態的・機能的な検索を行ってきた。しかし、リンパ浮腫治療を直接目指したリンパ管再生機序を解明するための実験モデルはほとんど報告されていなかったため、本研究を企画するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究ではリンパ管の新生を *in vivo* で調査するために、リンパ節移植モデルの開発を行い、機能的なリンパ管の再生誘導を行うことでリンパ浮腫治療への応用を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)リンパ節移植法の開発

リンパ節移植によるリンパ管新生を見るために、マウス及びラットの左鼠径リンパ節を郭清した後に、同所移植を行った。また、ラットにおいてはリンパ節の分割移植法を試みた。ラットのリンパ節分割移植では移植後3日目に VEGFc を移植部位に注射した。

### (2) Dye injection 法による移植リンパ節の機能解析

リンパ節を移植後、左足大腿部皮下に Dye を注射し、移植したリンパ節までのリンパ流路を経時的に調査した。Dye は EM Blue または Berlin Blue を用いた。

### (3) 移植リンパ節の形態学的解析

マウス移植リンパ節を移植後4週、7週に回収し、長径の計測を行った。また、その後凍結切片またはパラフィン切片を作製し、HE染色を行い光学顕微鏡で観察した。また、一部の切片は多重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

ラット分割移植モデルでは樹脂包埋した後に準超薄切片を作製して光学顕微鏡で観察した。さらに一部は超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

### (4) 移植リンパ節の発現因子の解析

移植リンパ節を移植後1週から4週まで経時的に total RNA を抽出し、RT-PCR 法によりリンパ管新生因子の発現を調査した。

### (5) Foxc2 K0 マウスを用いたリンパ節移植

## 実験

Foxc2 遺伝子欠損 (Foxc2 K0) マウスはリンパ管形成不全モデルである。そこでこのマウスにおいて正常マウスと Foxc2 K0 マウスのリンパ節虹彩色を行った。その後、Dye injection 法により機能的リンパ管再生の有無を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 移植リンパ節の生着

移植リンパ節が生着したことを確認するために、FITC ラベルされたトマトレクチンを移植マウスの尾静脈に注入し、移植リンパ節の血流の有無を確認した。その結果、移植後3日目には血管が開通していることが分かった (図1)。

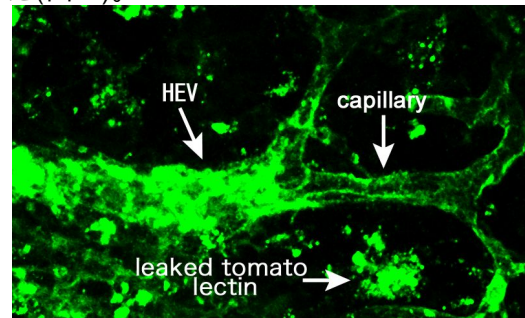


図1: トマトレクチン灌流法による移植リンパ節の血管。血管内腔 (HEV: 高内皮細静脈及び capillary) に FITC 標識されたトマトレクチンが付着しているため、移植リンパ節に血流がある事が分かる。また、血流は開始されているものの、間質にトマトレクチンが漏れ出しているため血管の壁が不完全の可能性がある。

### (2) マウスにおける移植リンパ節のリンパ管新生とリンパ節の再生

移植リンパ節にリンパ管が開通したかど

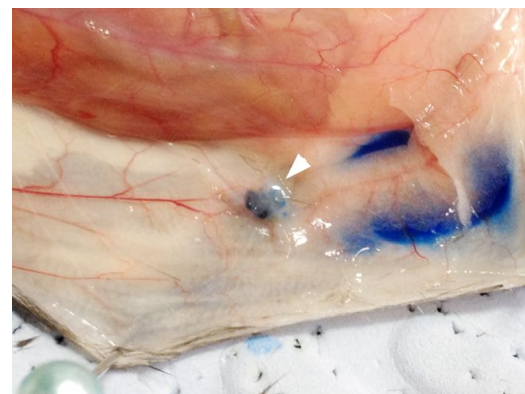


図2: Dye injection 法による移植リンパ節へのリンパ流の確認。大腿部に注射した EM Blue が移植リンパ節に流入していることが分かる (白矢頭)。

うかを調べるために、経時的に Dye を左足皮下に注射して調査した。その結果、移植後4

週目になりリンパ管が開通していることが確認できた(図2)。

移植リンパ節を摘出して見たところ、移植後4週目の移植リンパ節が矮小化していた。そこで、経時的に観察したところ、移植後7週目にはほぼ同じ大きさのリンパ節までに回復していた(図3, 図4)。



図3: 移植リンパ節の外観。コントロールと比べて移植後4週間目のリンパ節は矮小化しているが、移植後7週間目にはコントロールとほぼ同じ大きさに回復している。Cont.: コントロール、4wk: 4週間目の移植リンパ節、7wk: 7週間目の移植リンパ節。

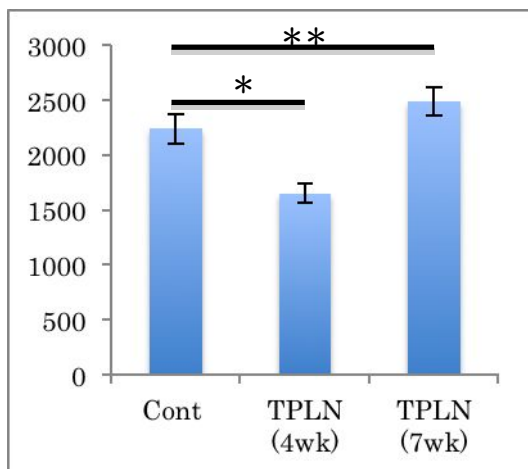


図4: 移植リンパ節の長径。コントロールと比較して、4週間目の移植リンパ節は有意に矮小化しているが、7週目にはコントロールと差がなくなっている。Cont: コントロール、TPLN: 移植リンパ節。\*:  $P=0.0009$ , \*\*:  $P=0.09$ 。

### (3) 移植リンパ節の微細構造

移植後4週間目、7週間目のリンパ節より凍結切片を作製してHE染色および免疫染色を行った。HE染色の結果、移植後4週間目のリンパ節は門部の結合組織が目立ち、皮質側が退縮しているように見えた。また、7週間目の移植リンパ節は大きさこそ回復しているものの、リンパ洞が拡張していた(図5)。

また、移植リンパ節内における細胞の分布を知るために、リンパ管およびリンパ節間質細胞である podoplanin と B 細胞マーカーで

ある B220, T 細胞マーカーである Thy1.2 の抗体を用いて多重免疫染色を行った(図6)。その結果、4週目の移植リンパ節では、B 細胞、T 細胞の住み分けは比較的正常のものに近かったが、podoplanin 陽性の間質細胞がリンパ節全領域に広がっているように見えた。7週間目の移植リンパ節では B 細胞、T 細胞の住み分けが若干乱れており、さらに、podoplanin 陽性のリンパ洞が拡張していた。

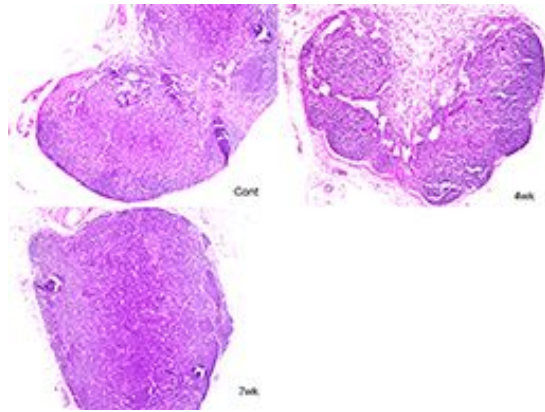


図5: 移植リンパ節のHE染色。移植後4週間目では全体的に矮小化している。移植後7週間目では明瞭なリンパ小節がほとんど見られない。

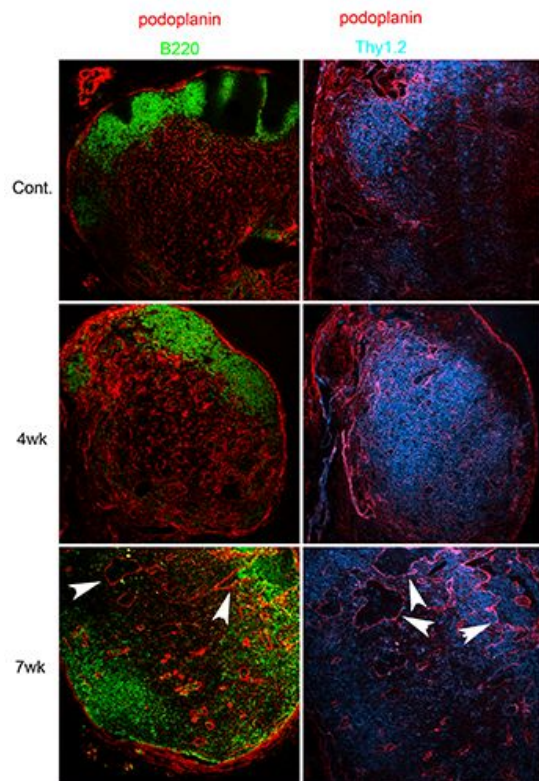


図6: 移植リンパ節の多重免疫染色。移植後4週目には podoplanin 陽性の間質細胞(赤色)が全体に広がっているのが分かる。また、移植後7週目ではリンパ洞の拡張が観察される(矢頭)。

#### (4) RT-PCR による発現因子の確認

移植後 1 週目から 4 週目までのリンパ節より total RNA を抽出して RT-PCR によりリンパ管新生因子の発現を調査した。その結果、移植後 1 週目には VEGF<sub>c</sub> 及び VEGF<sub>d</sub> の発現が見られた。また、これらの因子は正常リンパ節でも発現が見られ、リンパ節が恒常的にリンパ管新生因子を分泌している可能性が考えられた。

#### (5) ラットリンパ節分割移植におけるリンパ管新生

ラットにおいては、右鼠径リンパ節を 4 分割した後に同所移植した。また、移植後 3 日後にリンパ管内皮細胞増殖因子 (VEGF<sub>c</sub>) 3.0 $\mu$ g を移植部位皮下に注射した。その結果、VEGF<sub>c</sub> を注射しなかった群のリンパ節へのリンパ管再生は約 20%と低かったのに対し、VEGF<sub>c</sub> を注射した群は約 46%であった。また、VEGF<sub>c</sub> を注射した群はリンパ管の過形成が観察された。分割移植した移植リンパ節から準超薄切片を作製して観察したところ、HEV などのリンパ節特有の構造が確認できたが、組織の一部が脂肪化していた (図 7)。

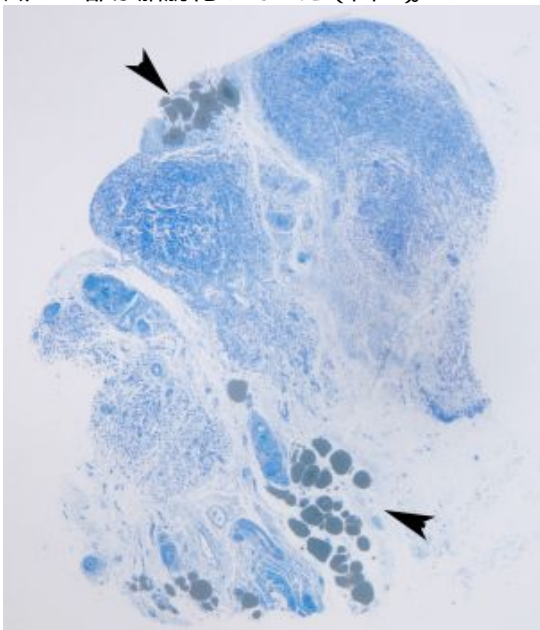


図 7: ラットにおける移植後 4 週間目の分割移植リンパ節。一部で脂肪化 (矢頭) が見られる。

#### (6) FoxC2 遺伝子欠損マウスを用いたリンパ節移植の試み

FoxC2 遺伝子欠損マウスはリンパ浮腫モデルマウスであるが、このマウスを用いたリンパ管新生研究は少ない。そこで FoxC2 遺伝子欠損マウスに正常マウスのリンパ節を、また、正常マウスに FoxC2 遺伝子欠損マウスのリンパ節を交叉移植した。その結果、どちらも正常のものと変わらず、約 4 週間でリンパ節の開通が確認できた。

以上の結果から、本法で開発したリンパ節移

植法により、リンパ節が発現しているリンパ管新生因子により移植リンパ節にリンパ管が再生してくることが示唆された。また、本法を用いることで再生したリンパ節は一度矮小化するものの 7 週目で正常リンパ節と同等の大きさまで再生した。これは本来リンパ節内にいたリンパ球が移植後にリンパ節外に遊走してしまうが、4 週以降はリンパ管が再生するためリンパ球の十分な流入が起こり、大きさが復帰すると考えられる。リンパ節は自然再生しない臓器であるが、この結果はリンパ節を移植することで機能的なリンパ管だけでなく機能的なリンパ節が再生出来ることを示している。

本研究で、リンパ節移植により機能的なリンパ管の再生を誘導できることを示した。本法はリンパ浮腫をはじめとした種々のリンパ病態への新たな治療戦略の 1 つとして期待できる。

#### 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 4 件)

(1) 清水一彦、江崎太一: 間質に存在する podoplanin 陽性細胞とは何か? *リンパ学* 36, 119-122, 2013, 査読無

(2) Kazuhiko Shimizu, Taichi Ezaki: Possible roles of podoplanin positive cells in Lymphatic vessel regeneration during the wound healing in the mouse tongue. *Progress in Lymphology* 23, 338-342, 2012, 査読無

(3) Taichi Ezaki, Kazuhiko Shimizu, Shunichi Morikawa, Shuji Kitahara Junzo Desaki: The relationship between mesothelial cells and lymphatic endothelial cells in an adjuvant-induced lymphangioma. *Progress in Lymphology* 23, 91-95, 2012, 査読無

(4) 森島正恵、清水一彦、久米努、江崎太一: Foxc2 欠損マウス胎仔におけるリンパ管の形態形成 *リンパ学* 35, 11-13, 2012, 査読無

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Kazuhiko Shimizu, Yutaka Arimura, Taichi Ezaki: Roles of podoplanin positive cells in wound healing of the mouse tongue. *Experimental Biology* 2015, Oral presentation, Boston, USA, 2015

(2) Kazuhiko Shimizu, Taichi Ezaki: Podoplanin positive stromal cells guide

CD68 positive cells by forming an extravascular pathway in wound healing of the mouse tongue. 5th International Meeting on Angiogenesis, Poster session, Amsterdam, Netherlands, 2014

(3) 清水一彦、江崎太一： マウス脾臓の podoplanin陽性細胞とリンパ管 第119回日本解剖学会総会全国学術集会シンポジウム 自治医科大学（栃木県・下野市） 2014

(4) Kazuhiko Shimizu, Taichi Ezaki: A possible role of the podoplanin positive cells as an extravascular pathway during wound healing in the mouse tongue. 17th International Vascular Biology Meeting, Poster session, Wiesbaden, Germany, 2012

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

清水 一彦 (KAZUHIKO SHIMIZU)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90385394