

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5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390179

研究課題名(和文) B細胞特異的VEGF過剰発現マウスの解析から帰納される神経免疫システムの発生構築

研究課題名(英文) Immunomodulatory effects of B cell derived VEGF-A in mice

研究代表者

橋口 照人(HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70250917

研究成果の概要(和文)：

B細胞VEGF-Aは炎症性リンパ節リモデリング反応の中心的役割を果たし、特にリンパ節に特化した脈管機能/構造をもつHEVsの形成を直接に制御している可能性、更にVEGF-Aにドライブされるリンパ節リモデリングは円滑な獲得免疫反応のプロセスに加えて炎症収束の機転までも包含する機能的構造適応である可能性を示した。更に今回の知見はVEGF-Aの血管新生作用の組織多様性を明確に示すものであり、HEVsの分化誘導に関してリンパ節においてVEGF-Aと共役するHEVsへの分化誘導因子が存在するのか、あるいはHEV-stem cell(仮称)へのVEGF-Aの作用としてHEVsが誘導されたのかなど今後の検討課題であると考えます。

研究成果の概要(英文)：

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is a prominent growth factor for both angiogenesis and lymphangiogenesis. Recent studies have shown the importance of VEGF-A in enhancing the growth of lymphatic endothelial cells in lymph nodes (LNs) and the migration of dendritic cells into LNs. VEGF-A is produced in inflamed tissues and/or in draining LNs, where B cells are a possible source of this growth factor. To study the effect of B cell-derived VEGF-A, we created transgenic mice (CD19Cre/hVEGF-Afl) that express human VEGF-A specifically in B cells. We found that the human VEGF-A produced by B cells not only induced lymphangiogenesis in LNs, but also induced the expansion of LNs and the development of high endothelial venules. Contrary to our expectation, we observed a significant decrease in the Ag-specific Ab production postimmunization with OVA and in the proinflammatory cytokine production postinoculation with LPS in these mice. Our findings suggest immunomodulatory effects of VEGF-A: B cell-derived VEGF-A promotes both lymphangiogenesis and angiogenesis within LNs, but then suppresses certain aspects of the ensuing immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経 免疫 VEGF リンパ節 B細胞

1. 研究開始当初の背景

【背景-1】-POEMS 症候群と VEGF-

我々は POEMS 症候群の血中において VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A 以下 VEGF-A)が著明に上昇していることを報告 (Lancet, 1996) して以来、本症候群の病態における VEGF の関与について一連の研究を重ねてきた。本症候群は神経障害と共に、plasma cell dyscrasia が主徴の一つであり、敗血症、菌血症の転機をとる可能性の高いことより、その臨床経過は VEGF と免疫機能、B 細胞-形質細胞との病態連関を強く疑わせる。そこで我々は平成 15 年 (基盤研究 C) より B 細胞特異的 VEGF 過剰発現マウスの作成に着手し表現型を解析してきた。

【背景-2】VEGF-A の獲得免疫環境構築への関与 (国外からの報告)

一方、免疫学の分野においてリンパ節の獲得免疫の始動におけるリンパ節内リンパ管新生に B 細胞の発現する VEGF-A が重要であるとする論文が報告された (Angeli et al. Immunity, 2006)。この報告は獲得免疫におけるリンパ節リモデリングの機序を説明する論文として重要である。炎症に伴ってリンパ管新生が誘導されるということは 70 年以上も昔から観察されていることであるが、そのリンパ管新生の起こる分子メカニズムの研究は最近の 10 年間にようやく明らかにされてきたばかりである。そして「炎症性リンパ管新生が獲得免疫の方向性をどのように修飾しているのか」は免疫学における次の課題として残されていた。

2. 研究の目的

POEMS 症候群の血中における VEGF-A の著明な上昇 (Lancet, 1996) は、その病態との関連より B 細胞の形質変化における神経-免疫環境の変化と VEGF との関連を強く疑わせる。そこで、B 細胞特異的 VEGF-A 過剰発現マウスの解析によって得られた免疫・鉄代謝システムの組織・形態学的変化と免疫抑制の方向への機能的変化を POEMS 症候群の病態の類似表現型の一つと捉え、本研究によりその分子メカニズムの各々を明らかにする。また、B 細胞産生 VEGF による Bone marrow stromal 細胞を含めた骨髄幹細胞の形質変化を検討する。POEMS 症候群の病態より着想された B 細胞-VEGF 軸の研究を骨髄環境-免疫・炎症制御-炎症性鉄代謝のリモデリングへと応用展開し、これらの結果から神経免疫病態を構築する新たなネットワークの提唱と候補分子の発見を目的とする。

3. 研究の方法

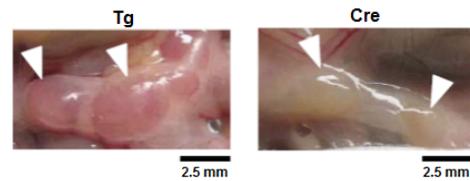
CD19 プロモーターによる Cre/LoxP recombination system を用いた B 細胞特異

的 VEGF-A トランスジェニックマウス (以下 B-VEGF tg) を作成して VEGF-A によるリンパ節腫脹の構造解析およびマウス個体の LPS への反応性について検討した。

4. 研究成果

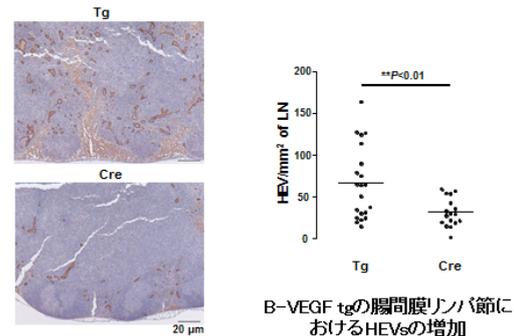
1) B-VEGF tg のリンパ節においてはリンパ管新生と高内皮小静脈の形成が促されるとともに、リンパ節へのマスト細胞の遊走が観察され、VEGF-A のリンパ節組織における特異的作用が確認された。

Increase in the vascularization of lymph node is observed in Tg mice



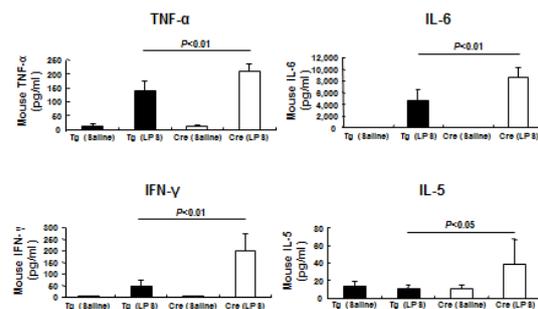
Lymph node is reddish

B-VEGF tgにおける腸間膜リンパ節の腫大



2) LPS の腹腔内投与による炎症性サイトカインの発現プロファイルは B-VEGF tg が LPS tolerance を獲得していることを示すものであった。

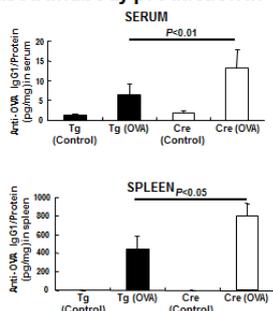
Cytokines release in Tg mice



B-VEGF tgにおけるLPS tolerance

3) B-VEGF tg は ovalbumin (OVA) 感作に対する OVA 特異的 IgG1 の産生を有意に抑制していた。

Decreased antibody production in Tg mice



B-VEGF tg におけるOVA特異的IgG1産生の低下

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 12 件)

1. Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y. Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):511-514. 査読有
2. Kodama Y, Okamoto Y, Hashiguchi T, Shinkoda Y, Nishikawa T, Tanabe T, Kawano Y. Vascular endothelial growth factor corrected for platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children. *Int J Hematol*. 2012;95(5):494-499. 査読有
3. Maenosono R, Oketani N, Ishida S, Iriki Y, Ichiki H, Okui H, Ninomiya Y, Hamasaki S, Namino F, Matsushita M, Tei C, Hashiguchi T. Effectiveness of esophagus detection by three-dimensional electroanatomical mapping to avoid esophageal injury during ablation of atrial fibrillation. *J Cardiol*. 2012;60(2):119-125. 査読有
4. Tada K, Kawahara K, Matsushita S, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. MK615, a Prunus mume Steb. Et Zucc ('Ume') extract, attenuates the growth of A375 melanoma cells by inhibiting the ERK1/2-Id-1 pathway. *Phytother Res*.

2012;26(6):833-838. 査読有

5. Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, Saishoji A, Kure T, Ohno K, Toyokura E, Imanaka D, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Hashiguchi T, Tsubouchi H. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep*. 2011;26(5):1227-1233. 査読有

6. Shirasawa M, Arimura N, Otsuka H, Sonoda S, Hashiguchi T, Sakamoto T. Intravitreal VEGF-A in eyes with massive vitreous hemorrhage. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(12):1805-1810. 査読有

7. Yoshinaga N, Arimura N, Otsuka H, Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T. NSAIDs inhibit neovascularization of choroid through HO-1-dependent pathway. *Lab Invest*. 2011;91(9):1277-1290. 査読有

8. Araki Y, Nonaka D, Tajima A, Maruyama M, Nitto T, Ishikawa H, Yoshitake H, Yoshida E, Kuronaka N, Asada K, Yanagida M, Nojima M, Yoshida K, Takamori K, Hashiguchi T, Maruyama I, Lee LJ, Tanaka K. Quantitative peptidomic analysis by a newly developed one-step direct transfer technology without depletion of major blood proteins: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in pregnancy-induced hypertension. *Proteomics*. 2011;11(13):2727-2737. 査読有

9. Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanochara H, Hashiguchi T, Zenmyo M, Yamamoto T, Ijiri K, Kawano Y, Komiya S. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(1):10-15. 査読有

10. Otsuka H, Arimura N, Sonoda S, Nakamura M, Hashiguchi T, Maruyama I, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Sakamoto T. Stromal cell-derived factor-1 is essential for photoreceptor cell protection in retinal detachment. *Am J Pathol*. 2010; 177(5):2268-2277. 査読有

11. Matsushita S, Tada KI, Kawahara KI, Kawai K, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. Advanced malignant melanoma responds to Prunus mume Sieb. Et Zucc (Ume) extract: Case report and in vitro study. *Exp Ther Med*. 2010;1(4):569-574. 査読有

12. Mera K, Kawahara K, Tada K, Kawai K, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. ER signaling is activated to protect human HaCaT keratinocytes from ER stress induced by environmental doses of UVB. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(2):350-354. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 竹之内和則、永里 朋香、清水 利明、丸山 征郎、橋口 照人:内臓平滑筋 human VEGF-A 発現マウスにおける膵インスリン陽性細胞の構築変化 第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月29日~12月2日 京都

2. 橋口照人、伊藤隆史、SHRESTHA B、三浦直樹、丸山征郎:免疫 B 細胞発現 VEGF-A によるリンパ節リモデリングと免疫環境の機能的制御 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012年6月7日~9日 東京

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

1. 名称: N結合型糖鎖を利用した消化器癌の検査方法

発明者: 橋口 照人 夏越祥次 内門泰斗 新地洋之 前村公成 又木雄弘 森脇紀親 関島 勝 島岡 秀行 阿部 碧

権利者: 鹿児島大学 他

種類: 特許

番号: 特願 2012-509688

出願年月日: 2010/4/6

国内外の別: 国内

2. 名称: 消化器癌診断用マーカー、および消化器癌の検査方法

発明者: 橋口 照人 夏越祥次 内門泰斗 新地洋之 前村公成 又木雄弘 森脇紀親 関島 勝 島岡秀行 阿部 碧 福島雅夫 五十嵐幸太 阿部皓基 相原大和

権利者: 鹿児島大学 他

種類: 特許

番号: 特願 2011-222353

出願年月日: 2011/10/6

国内外の別: 国内

3. 名称: がん転移マーカーおよびそれを用いた診断

発明者: 橋口 照人 夏越祥次 佐々木 健 奥村 浩 内門泰斗 竹之内和則 清水利

昭 田中憲次 李 良子 野中大輔

権利者: 鹿児島大学 他

種類: 特許

番号: 特願 2012-168064

出願年月日: 2012/7/30

国内外の別: 国内

4. 名称: 消化器癌診断用マーカー、および消化器癌の検査方法

発明者: 橋口 照人 夏越祥次 内門泰斗 新地洋之 前村公成 又木雄弘 森脇紀親 関島 勝 島岡秀行 阿部 碧 福島雅夫 五十嵐幸太 阿部皓基 相原大和

権利者: 鹿児島大学 他

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/076017

出願年月日: 2011/10/6

国内外の別: 国際

5. 名称: N結合型糖鎖を利用した消化器癌の検査方法

発明者: 橋口 照人 夏越祥次 内門泰斗 新地洋之 前村公成 又木雄弘 森脇紀親 関島 勝 島岡 秀行 阿部 碧

権利者: 鹿児島大学 他

種類: 特許

番号: 13/639,724

出願年月日: 2010/4/6

国内外の別: アメリカ

○取得状況(計1件)

名称: 糖尿病性腎症患者の病態把握方法

発明者: 橋口照人 谷口尚太郎 丸山征郎 小野智子 古崎文雄

権利者: 鹿児島大学 他

種類: 特許

番号: 特許第 4871173 号

取得年月日: 2011/11/25

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 70250917

(2) 研究分担者

川原 幸一 (KAWAHARA KOICHI)

大阪工業大学・工学部・特任教授

研究者番号: 10381170

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号: 20082282

伊藤 隆史 (ITO TAKASHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任講師
研究者番号: 20381171

大山 陽子 (OYAMA YOKO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
特任助教
研究者番号: 20583470

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIAKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
助教
研究者番号: 50468055

(3) 連携研究者

竹之内 和則 (TAKENOUCHI KAZUNORI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員
研究者番号: 30646758