

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08241

研究課題名(和文)炎症時のリンパ管新生を増強する細胞特異的のトロンボキサン受容体シグナルの解析

研究課題名(英文) Role of TP signaling in enhancement of LPS-induced lymphangiogenesis in a mouse peritonitis model

研究代表者

細野 加奈子 (Hosono, Kanako)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80532556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：強力な血小板凝集作用、血管・気管支平滑筋収縮作用をもつトロンボキサン(TX)はCOXおよびその下流のTX合成酵素(TXAS)の作用で生成されるが、LPS腹膜炎モデルを用いた検討により、骨髄由来のマクロファージおよびTリンパ球がTX-TP受容体シグナルを介してそれら細胞の動員およびVEGF-Cの発現誘導を介して炎症性リンパ管新生を増強させることを見出した。Tリンパ球のTP受容体が獲得性免疫を制御する報告はあるが、炎症性リンパ管新生への関与はいままで報告がなく、この検討により新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Lymphatic vessels in diaphragm are essential for draining the inflammatory fluid during peritonitis. In this study, we evaluated role of thromboxane A2 receptor (TP) signaling in enhancement of lymphangiogenesis in peritonitis. Peritonitis was induced by injections of LPS (25 µg/mouse) into peritoneal cavities in male C57BL/6 mice. We evaluated lymphatic microvessel density in whole-mounted diaphragm tissues. A week after LPS application, expressions of COX-2, thromboxane synthase (TXS) and VEGF-C/D in diaphragm were up-regulated with increment of lymphangiogenesis, and lymphangiogenesis and the expressions of VEGF-C/D were suppressed in TP KO mice. CD3 positive cells and CD11b positive cells expressing VEGF-C/D were accumulated in diaphragm in a TP-dependent manner. These results indicated that lymphangiogenesis in diaphragm is up-regulated by TX-TP signaling via induction of VEGF-C/D, suggesting TP signaling as a potential therapeutic target.

研究分野：薬理学一般

キーワード：リンパ管新生 TP受容体 慢性炎症 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は血管から漏出した間質液や組織の老廃物をリンパ液として吸収し、集合リンパ管を介して血管系へと還流・再循環させ組織液の恒常性を維持しているだけでなく、炎症や悪性腫瘍の転移など病的状態にも関与している重要な器官である。さらにリンパ管は、末梢臓器とリンパ節、そしてリンパ節同士をつなぐ脈管であり、体内に侵入してきた細菌などの非自己物質を免疫系により認識・排除する免疫系ネットワークを司る重要な器官でもある。我々はこれまでに炎症や腫瘍増殖時にプロスタグランジン(PG)E₂がリンパ管新生を増強することを報告してきた。最近になり、驚いたことに強力な血小板凝集作用や細動脈収縮作用が知られるトロンボキサン(TX)がリンパ管新生を増強する可能性を見出した。一方、がん性腹膜炎などをはじめとする慢性的な腹膜炎では重度の腹水を認める。多くの炎症細胞を含む腹腔の間質液は主に横隔膜のリンパ管を介し中枢へドレナージされるが、特に横隔膜筋層部の腹膜側リンパ管は腹水を排出するための中心的ルートであり、腹腔から悪性腫瘍が転移するルートとしても重要である。以上の背景をふまえ、腹膜炎時のリンパ管新生を増強する TX-TP 受容体シグナリングの役割を解明するという発想に至った。

2. 研究の目的

リンパ管は、過剰な細胞外液のドレナージという働きだけでなく、免疫系にも大きな働きを持つことが示されている。さらに悪性腫瘍のリンパ行性転移やリンパ浮腫などの病態の解明のためにリンパ管システム形成の分子基盤を解明することは重要である。興味深いことに、腹膜炎や創傷治癒、慢性気道炎症など、様々な病的炎症において血管新生とともにリンパ管新生の誘導が観察されており、炎症反応の制御がリンパ管新生の制御につながるが大いに期待できる。しかし、リンパ管システムと炎症性脂質メディエーターとの相互作用に力点を入れた研究は極めて少ない。

我々のグループではこれまでに、脂質メディエーターががんや慢性増殖性炎症時の血管新生を増強するだけでなく、リンパ管新生も増強することを報告してきた。腫瘍周囲のストローマ組織で多数確認されるリンパ管新生が COX-2 阻害薬により抑制されること、創傷部位に動員されたマクロファージが COX-2 依存性に VEGF-C を産生しリンパ管新生を増強していること、さらには炎症性肉芽組織に動員されたマクロファージや fibroblast が内因性 PGE₂ 依存性に VEGF-C/D を誘導してリンパ管新生増強作用を発揮していることを報告している。一方で、PG と同じく COX-2 の働きによりアラキドン酸から合成される TX は、TP 受容体を介して強力な血小板凝集作用や細動脈収縮作用を引き

起こすことが知られているが、重要なことに最近の検討から TX がリンパ管新生を増強する可能性を見いだした。TX の合成酵素は血小板のみならず、胸腺細胞や活性化された単球やマクロファージにも存在することが報告されており、こうした炎症時に関わる細胞から産生される TX によって血管新生だけでなくリンパ管新生にも関与する可能性が十分に考えられる。そこで、TP 受容体ノックアウトマウスを用いてリンパ管新生が抑制し得るかどうか検討するとともに、リンパ管新生に関わる炎症細胞の集積が TX-TP 受容体シグナリングの途絶・遮断により変化し得るかどうか、また TP-flox マウスと Cre トランスジェニックマウスとの交配により細胞特異的に TX-TP 受容体シグナリングを途絶・遮断し、リンパ管新生誘導因子の発現およびリンパ管新生を抑制し得るかどうか検討することとした。

3. 研究の方法

(1) LPS 誘発腹膜炎モデル

雄性 C57BL/6 マウスおよび TP 受容体ノックアウトマウスに腹膜炎を惹起するため大腸菌由来の Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma, E coli, 0111-B4) を 1 mg/kg の用量で図 1 に示すスケジュールに従い反復的に腹腔内投与して腹膜炎モデルマウスを作成し、腹腔間質液を中枢へドレナージする横隔膜リンパ管のリンパ管新生を評価した。コントロールには LPS に代わり PBS を腹腔内投与した。

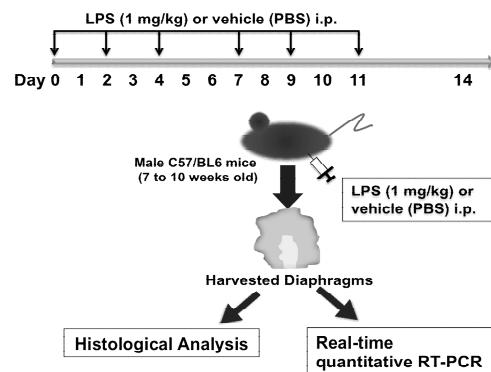


図 1

イソフルラン麻酔下、横隔膜組織を摘出しリンパ管新生を経時的空間的に評価した。リンパ管内皮マーカー (VEGFR-3, LYVE-1, podoplanin) および既存のリンパ管新生因子 (VEGF-C, VEGF-D 等) の発現について whole mount 免疫染色により免疫組織化学的に検索するとともに、上記マーカー mRNA を real time PCR 等で経時的に調べた。また、横隔膜や腹水に集積する細胞を免疫組織化学的解析、real time PCR 等を行い、リンパ管新生に関与している細胞群を評価した。VEGF-C/VEGF-D との 2 重染色を行い、リンパ管新生の司令塔細胞を特定するとともにそれら細胞の誘導に関与するケモカインおよびその受容体の解析も併せて行った。

(2) Cre-loxP システムによる細胞特異的 TP 受容体ノックアウトマウスの作成

リンパ管新生に關与する細胞種の同定を行うため、細胞特異的に TP 受容体を欠損したマウスの作成を試みた。

マクロファージ・好中球特異的 TP 受容体欠損マウスの作成

TP 受容体<flox/flox>マウスと LysM-Cre トランスジェニックマウス(マクロファージ・好中球特異的に Cre を発現)を交配させ、LysM-Cre・TP 受容体<flox/+>を得る。次に LysM-Cre・TP 受容体<flox/+>と TP 受容体<flox/flox>を交配させ、TP 受容体<flox/+>、TP 受容体<flox/flox>、LysM-Cre・TP 受容体<flox/+>、LysM-Cre・TP 受容体<flox/flox>マウスを作成した。

T 細胞特異的 TP 受容体欠損マウスの作成
TP 受容体<flox/flox>マウスと Lck-Cre トランスジェニックマウス(T 細胞特異的に Cre を発現)を交配させ、Lck-Cre・TP 受容体<flox/+>を得る。次に Lck-Cre・TP 受容体<flox/+>と TP 受容体<flox/flox>を交配させ、TP 受容体<flox/+>、TP 受容体<flox/flox>、Lck-Cre・TP 受容体<flox/+>、Lck-Cre・TP 受容体<flox/flox>マウスを作成した。

4. 研究成果

(1) LPS を野生型マウスに腹腔内に隔日投与して作成した腹膜炎モデルでは、経時的に横隔膜のリンパ管が拡張し、さらには既存のリンパ管同士をはしご状につなぐ新生リンパ管を認めるとともにリンパ管新生関連因子の発現量上昇を確認した。腹腔の間質液は横隔膜のリンパ管を介して中枢へドレナージされていることが知られており、実際、このモデルで腹腔内にインディアンインクを投与し横隔膜切片を作成すると、リンパ管内にインクがドレナージされている様子が観察できた。さらに、マウスの腹腔内に FITC デキストランを投与後マウスの胸腔内を観察すると、腹腔内に投与した FITC デキストランが横隔膜リンパ管内にドレナージされ胸腔内リンパ節へと流れ込んでいる様子が確認された。そこで、胸腔内リンパ節を採取しリンパ節の蛍光強度を測定したところ、腹膜炎を起こした群で蛍光強度が有意に上昇し、逆に腹腔内洗浄液の蛍光強度の低下が認められたことから、LPS 反復投与によって増強された横隔膜のリンパ管新生によりドレナージ効果が促進されていることが推察された。

このとき、腹膜炎を起こした横隔膜では、COX2 遺伝子発現量が有意に増加しており、さらにトロンボキサン合成酵素 (TXS) も経時的な増加が認められたことから TX 産生の上昇が考えられた。そこで TX 合成酵素阻害薬 (OKY-046) や TX 受容体拮抗薬 (S-1452) を経口投与し、LPS 腹膜炎モデル作成 7 日目の横隔膜リンパ管を評価したところ、リンパ管新生が有意に抑制されており、さらに TX

の受容体である TPKO マウスで同様に評価したところ、野生型マウスに比べ TPKO マウスでも確かにリンパ管新生が有意に抑制されていた。また、FITC デキストラン腹腔内投与 5 分後の腹腔内洗浄液の蛍光強度を測定してドレナージ効果を評価したところ、野生型マウスではリンパ管を介したドレナージ作用が増強する一方で、TPKO マウスでは vehicle 投与群と同程度の蛍光強度で維持されており、LPS 反復投与によって促進したリンパ管新生によるドレナージ効果が TPKO マウスでは減弱することが判明した。

免疫組織化学的検討から腹膜炎を惹起させた横隔膜ではリンパ管周囲に顕著な CD3/4 陽性 T 細胞や CD11b 陽性マクロファージの集積を顕著に認め、これらの細胞は VEGF-C/D を共発現していた。TPKO ではその集積が有意に抑制されることが確認された。マクロファージ、T 細胞いずれも TP 受容体発現は認められるが、T 細胞での TP 受容体発現はより高発現であった。これらの結果から、TP シグナリングが途絶・遮断されたことによって VEGF-C/D を産生するマクロファージや T 細胞の集積が抑制され、その結果リンパ管新生が抑制された可能性が示唆された。

そこでさらにマクロファージと T 細胞の機能的な働きを確かめるため、chondronate lysosome によるマクロファージ除去あるいは anti-CD3 抗体による T 細胞活性化阻害をそれぞれ行ったところ、いずれにおいてもリンパ管新生が有意に抑制されることが確認されたことから、TP 発現マクロファージだけでなく T 細胞もまたリンパ管新生増強に關与していることが明らかとなった。加えて、骨髓移植により作成したキメラマウスに LPS を投与すると、TPKO マウスの骨髓を移植したマウスではリンパ管新生は有意に減少しており、骨髓由来の TP 発現細胞が LPS で惹起したリンパ管新生を増強していることが明らかとなったことから、骨髓由来の TP 受容体発現マクロファージと T 細胞がリンパ管新生増強に關与している可能性が示唆された。一方、WT マウスから採取したマクロファージおよび T 細胞を TP アゴニスト (U46619) で刺激すると VEGF-C の発現誘導が認められたが、TPKO マウスから採取したマクロファージおよび T 細胞ではいずれも VEGF-C 発現は抑制された。重要なことに、リンパ管内皮細胞に直接 TP アゴニストで刺激しても全く増殖活性を示さないことから、TX によるリンパ管新生のメカニズムの一つとしてマクロファージと T リンパ球が TP 受容体を介して VEGF-C を誘導しリンパ管新生を増強させていることが明らかとなった。T リンパ球の TP 受容体が獲得性免疫を制御する報告はあるが、炎症性リンパ管新生への關与はいままで報告がなく、この検討により新たな知見を得ることができた。

(2) リンパ管新生に關与する TP 受容体発現細胞種の同定を行うため、Cre トランスジェニックマウスを用いた Cre-loxP システムによる細胞特異的 TP 受容体ノックアウトマウスの作成を試みた。予備検討の結果を受け、Cre トランスジェニックマウスはマクロファージ・好中球を標的とした LysM-Cre トランスジェニックマウスと T 細胞を標的とした Lck-Cre トランスジェニックマウスを準備した。マクロファージ・好中球特異的 TP 受容体欠損マウスは若干の問題は生じたものの繁殖に成功したことから、マクロファージ・好中球特異的 TP 受容体欠損マウスを用いて腹膜炎モデルを作成した。その結果、マクロファージ・好中球特異的 TP 受容体欠損マウスでリンパ管新生が有意に抑制されることを確認した。一方、T 細胞特異的 TP 受容体欠損マウスに関しては実験に供することが出来得るだけの雄性マウスの個体数確保が思うように進まず、検討には及んでいない。引き続き繁殖環境の改善等を試み、継続して検討を進める予定である。

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 2 件)

Hosono K, Isonaka R, Kawakami T, Narumiya S, Majima M. Signaling of prostaglandin E receptors, EP3 and EP4 facilitates wound healing and lymphangiogenesis with enhanced recruitment of M2 macrophages in mice. *PLoS One*. 11(10):e0162532, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0162532. 査読有
Matsuda H, Hosono K, Tsuru S, Kurashige C, Sekiguchi K, Akira S, Uematsu S, Okamoto H, Majima M. Roles of mPGES-1, an inducible prostaglandin E synthase, in enhancement of LPS-induced lymphangiogenesis in a mouse peritonitis model. *Life Sci*. 142:1-7. 2015. doi: 10.1016/j.lfs. 2015. 10. 008. 査読有

[学会発表](計 8 件)

細野加奈子、松田弘美、馬嶋正隆; 病態時のリンパ管新生を制御する脂質メディエーターの役割. 第 41 回日本リンパ学会総会. 2017.

馬嶋正隆、天野英樹、細野加奈子; リンパ管・リンパ組織の可塑性を制御する生理活性脂質の役割. 第 40 回日本リンパ学会総会. 2016.

松田弘美、細野加奈子、馬嶋正隆; エンドトキシン誘発腹膜炎マウスの横隔膜リンパ管新生を増強するトロンボキサン受容体シグナリングの役割. 第 40 回日本リンパ学会総会. 2016.

Majima M, Hosono K, Amano H, Fujita T. Roles of Prostaglandins in regulation of plasticity of lymphatics and lymph nodes.

第 89 回日本薬理学会年会. 2016.

Matsuda H, Hosono K, Tsuru S, Narumiya S, Majima M. Role of TP signaling in enhancement of LPS-induced lymphangiogenesis in a mouse peritonitis model. 第 89 回日本薬理学会年会. 2016.

Hosono K, Isonaka R, Kawakami T, Narumiya S, Majima M. Signaling of prostaglandin E receptors, EP3 and EP4 facilitates wound healing and lymphangiogenesis with enhanced recruitment of CD11b⁺ macrophages in mice. 第 89 回日本薬理学会年会. 2016.

松田 弘美, 細野加奈子, 馬嶋 正隆; エンドトキシン誘発性腹膜炎マウスの横隔膜リンパ管新生における TP シグナリングの役割. 第 39 回日本リンパ学会総会. 2015.

Matsuda H, Hosono K, Tsuru S, Narumiya S, Majima M. Role of TP signaling in enhancement of lymphangiogenesis in diaphragms during endotoxin induced peritonitis in mice. 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators. 2015.

[図書](計 5 件)

馬嶋正隆、天野英樹、細野加奈子. 炎症とリンパ管新生. *実験医学*, 用土社. 2017, 35: 416-422.

馬嶋正隆、天野英樹、細野加奈子、伊藤義也. 生理活性脂質と脈管新生. *生体の科学*, 医学書院 2017, 68: 304-308.

馬嶋正隆、天野英樹、細野加奈子. プロスタノイドによるリンパ管新生とがんリンパ節転移の制御. *炎症と免疫*, 先端医学社, 2016, 24:27-36.

馬嶋正隆、天野英樹、細野加奈子. 病態時のリンパ管新生、リンパ組織の可塑性を制御するプロスタノイドの役割. *細胞*, ニューサイエンス社. 2015, 47: 20-23.

馬嶋正隆、細野加奈子. プロスタグランジンによるリンパ管新生とリンパ組織可塑性の制御. *医学のあゆみ*, 医歯薬出版株式会社. 2015, 254:1109-1114.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

北里大学医学部薬理学 大学院医療系研究科分子薬理学

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 加奈子 (HOSONO KANAKO)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 80532556