

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19408

研究課題名(和文) M-CSF誘発性リンパ管新生刺激因子VEGF-C,Dの細胞内シグナル解析

研究課題名(英文) Intracellular analysis of M-CSF induced lymphangiogenesis stimulating factor VEGF-C,-D production

研究代表者

小林 誠 (Kobayashi, Makoto)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10644809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：当初の目的であったMCSF添加による骨格筋細胞株からのVEGF-C,-D産生が有意にみられなかったため実験計画を変更した。我々の検討からMCSF投与により横隔膜からも有意なVEGF-C,-D産生がみられていたため、横隔膜のリンパ管に着目して実験を行った。胸水貯留には胸膜の血管、リンパ管が関与している。そこで悪性胸膜炎モデル、炎症性胸膜炎モデルを作成しリンパ管の解析をおこなった。両者ではリンパ管の径の拡大がみられ、悪性胸膜炎ではリンパ管密度の増加がみられた。癌や炎症により横隔膜からのVEGF-C,-D産生の増加がこれらの変化をもたらすと考えた。

研究成果の概要(英文)：The experimental plan was changed because the VEGF-C, -D production from the skeletal muscle cell line by the addition of MCSF which was the initial objective was not significantly observed. In our previous study, significant VEGF-C, -D production was also seen from the diaphragm by MCSF administration, experiments were conducted focusing on the lymphatic vessels of the diaphragm. The pleural blood vessels and lymphatic vessels are involved in pleural effusion. Therefore, we prepared a malignant pleurisy model and an inflammatory pleurisy model and analyzed lymphatic vessels. In both models, expansion of lymphatic vessel diameter was observed. And only in malignant pleurisy model, lymphatic vessel density was increased. We concluded that the increase in VEGF-C, -D production from the diaphragm by cancer and inflammation will bring about these changes.

研究分野：リンパ管新生

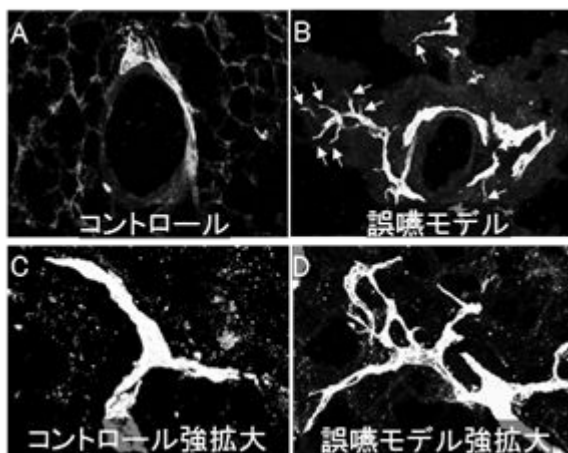
キーワード：リンパ管新生 VEGF-C VEGF-D 横隔膜 MCSF

1. 研究開始当初の背景

血管新生は主に vascular endothelial growth factor (VEGF: 血管上皮成長因子)-A により、リンパ管新生は VEGF-C、VEGF-D により促進されることが明らかとなっている。リンパ管は LECs (lymphatic endothelial cells: リンパ管内皮細胞) より形成され、vascularendothelial growth factor receptor-3 (VEGFR3: 血管上皮成長因子受容体 3) が特異的に発現している。

リンパ管新生に必要な LECs の遊走や萌芽は、VEGFR3 のリガンドである VEGF-C や VEGF-D が結合すると起こる (Alitalo; nature medicine.2011,17 (11)1371-80)。リンパ管はさまざまな抗原や、活性化された抗原提示細胞をリンパ節へ運び、リンパ節からの免疫応答細胞を血中に放出する。慢性炎症性疾患にリンパ管機能不全による免疫機能不全が関与すると報告されている。クローン病では、リンパ管周囲で肉芽腫の形成や脂肪沈着がおこり、それがリンパ管からの炎症細胞輸送を阻害している可能性がある (von der Weid et al; Curr. Opin. Gastroenterol.2011,27,335 - 341)。

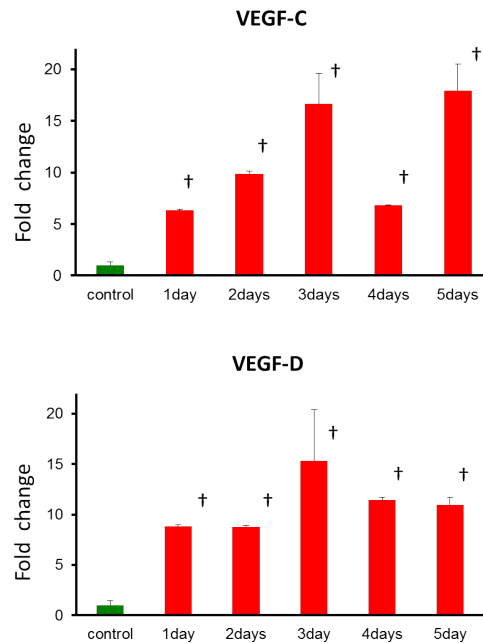
我々が作成した通常型誤嚥性肺炎マウスモデルでは気道及び肺に異常な形態のリンパ管の増生が見られた (下図参照)。異型なリンパ管では免疫細胞がリンパ管内へそしてリンパ節へ移動できず免疫機能が低下し、間質液の排液機能も低下し、慢性炎症が持続し悪循環を生じていると考えた (Nihei et al; Journal of Pathology.2014)。



我々は以前 macropahge colony-stimulating factor (M-CSF) が骨格筋を刺激して VEGF-A 産生を誘導して悪性腫瘍の血管新生を促進し (Okazaki et al; J. Immunol.2005,174;7531-38)、M-CSF が骨格筋細胞内シグナル伝達経路の PI3K / Akt、及び ERK/MAPK 経路を介して VEGF-A 産生を誘導すると報告した (Okazaki et al; Am J Pathol 2007 171 1093-1103)。

マクロファージや骨格筋などが VEGF-C、VEGF-D を産生すると報告されて

はいるがその産生を誘導してくるサイトカインは不明である。そこで、われわれは M-CSF に着目し、マクロファージ・骨格筋における M-CSF 誘導性の VEGF-C、VEGF-D の産生について検討したところ、マクロファージでは確認できなかったが、in vivo の実験でマウス骨格筋より VEGF-C、VEGF-D が産生誘導されている (下図) ことを確認した。

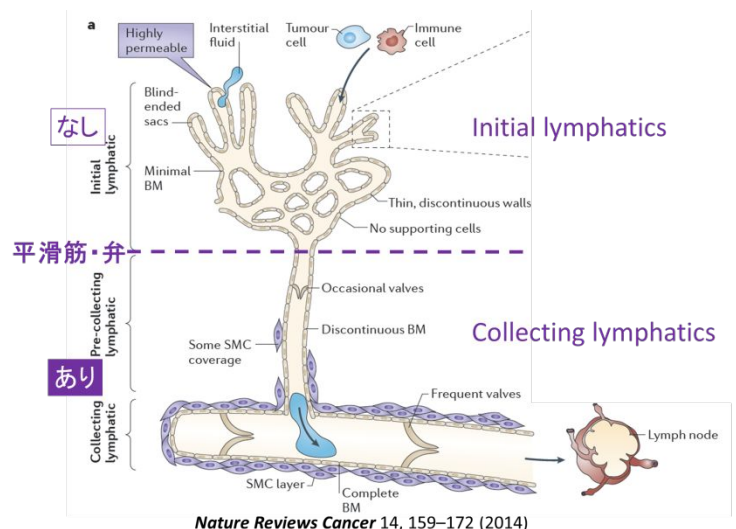


当初、今回の研究では in vitro の実験として MSCF 添加による骨格筋細胞株からの VEGF-C、-D の産生を評価したが、有意な産生がみられなかったため実験計画を変更した。

我々の検討から横隔膜からも有意な VEGF-C、-D の産生がみられていたため、横隔膜のリンパ管に着目して実験を行った。

2. 研究の目的

リンパ管は間質液を吸収し免疫細胞が入る initial lymphatic と平滑筋に覆われ内部に弁があり輸送管として機能する collecting lymphatic がある (下図)。リンパ管は胸水

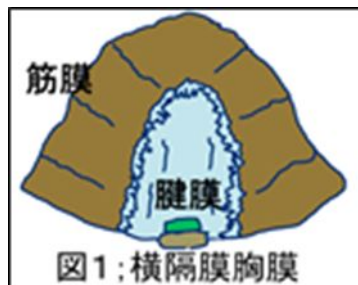


を全量吸収するが正常横隔膜胸膜での分布やそのリンパ流の方向は不明である。また癌や炎症による胸膜炎でのリンパ管の構造や機能の変化や、リンパ管新生を促進する VEGF-C、VEGF-D、その受容体 VEGFR-3 の阻害による胸水への効果も不明である。

そこで本研究では正常マウス横隔膜リンパ管の構造や機能を解析し、次に胸腔内に Lewis 肺癌細胞を投与した悪性胸水マウス、Lipopolysaccharide(LPS)を投与した炎症性胸水マウスにおける横隔膜リンパ管の構造や機能、リンパ管新生阻害剤投与のそれらへの影響を解析し胸膜炎治療への適応を目指すことを目的とした

### 3. 研究の方法

(1) 正常横隔膜(下図)における initial lymphatic と collecting lymphatic の横隔膜胸膜での分布の評価



C57BL/6 マウスに麻酔をかけパラホルムアルデヒドで全身を還流し横隔膜を取り出す。横隔膜の whole mount でリンパ管 (initial lymphatic のみ) を抗 LYVE-1 抗体、リンパ管(すべてのリンパ管)を抗 Podoplanin 抗体、リンパ管周囲の平滑筋を抗  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 抗体にて染色する。共焦点顕微鏡を用いて撮影し、それぞれのリンパ管の分布の評価を行う。評価の方法はリンパ管密度とリンパ管径の測定を行う。リンパ管密度の測定については imageJ software を用いて、またリンパ管径については 200 倍率の 1 視野あたり 10 本のリンパ管の径を測定し、10 視野における合計の分布を評価した。

(2) 胸水モデルの作成とリンパ管の評価  
○悪性胸膜炎モデルの作成

C57/B6 マウスに麻酔後、肋間筋を小切開し、胸腔へ 24G サーフロー針留置し、先行論文を参考に 15 万/200  $\mu$ l PBS に調整した Lewis 肺癌細胞 (Lewis Lung carcinoma Cells :LLC) を投与し作成する。

○炎症性胸水モデルの作成

上記と同様な手技を用いて先行論文を参考に胸腔内に 250ng/100  $\mu$ l PBS に調整した LPS を投与し作成する。10 日後に横隔膜を採取し、1)と同様に免疫染色を行い正常リンパ管とリンパ管密度、リンパ管径を比較し評価する。

(3) VEGFR-3 や他の受容体との併用阻害による治療効果の検討

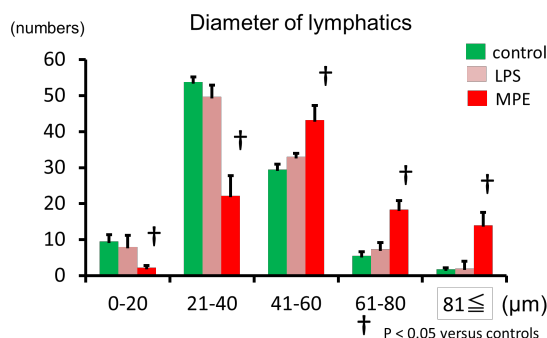
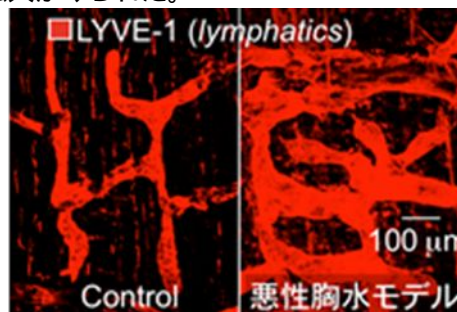
それぞれの胸水モデルに VEGFR-3 阻害剤である SAR131675 (リンパ管新生阻害剤) や sunitinib (VEGF-R2, VEGF-R3 阻害: 血管新生阻害とリンパ管新生阻害、c-kit 阻害: mast cell 阻害) を週に 5 日間、経胃管投与をして胸水が減るか、症状が軽快するかを胸水量やマウスの酸素飽和度を計り評価する。

### 4. 研究成果

(1) 正常横隔膜における initial lymphatic と collecting lymphatic の横隔膜胸膜での分布の評価

正常横隔膜では幅の広いバンド状のリンパ管がお互いに連結し、脊柱周辺の腱中心から放射状に広がっていた。筋膜では initial lymphatics のみが、腱膜ではリンパ管周囲に平滑筋がみられ collecting lymphatics が混在していた。

(2) 胸水モデルの作成とリンパ管の評価  
悪性胸膜炎モデル(MPE)ではリンパ管密度増加、リンパ管径の拡大がみられた(下図)。炎症性胸膜炎モデルマウスではリンパ管径の拡大がみられた。



機序として癌や炎症により横隔膜からの VEGF-C, -D 産生が引き起こされ、それがリンパ管の拡大を引き起こすことが考えられた。

(3) 今回の研究期間で阻害剤投与実験まで着手ができなかった。

## 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)

[学会発表](計2件)

第56回 日本呼吸器学会学術総会(東京)

2016年4月10日

正常及び敗血症、癌性胸膜炎モデルマウス

胸膜(横隔膜)のリンパ管の解析

小林 誠、岡崎 達馬、二瓶真由美、突田 容子、小松 理世、玉井ときわ、杉浦 久敏、一ノ瀬 正和

東京国際フォーラム(日本 東京)

ATS 2016 International Conference

2016年5月18日

Mouse pleural lymphatics under physiological condition, and in malignant pleural effusion and sepsis models

Yoko Tsukita, Tatsuma Okazaki, Makoto Kobayashi, Riyo Komatsu, Hisatoshi Sugiura and Masakazu Ichinose

MOSCONE CONVENTION CENTER(米国 サンフランシスコ)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 誠 (Kobayashi, Makoto)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 10644809

### (2)研究分担者

岡崎 達馬 (Okazaki, Tatsuma)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号: 40396479

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

突田 容子 (Tsukita, Youko)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

小松 理世 (Komatsu, Riyo)