

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08586

研究課題名(和文) 静脈内皮細胞からリンパ管内皮細胞へのダイレクト・リプログラミング方法の開発

研究課題名(英文) Development of a direct reprogramming method from venous endothelial cells to lymphatic endothelial cells

研究代表者

平田 哲 (HIRATA, Satoshi)

旭川医科大学・大学病院・教授

研究者番号：80199067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管は胎生期の静脈壁から分化し発生する。線維芽細胞から直接心筋細胞へ分化誘導することが可能であることが報告されている。静脈からリンパ管へ直接分化誘導する方法を開発する。HUVEC、HSAVECおよびHDLECの遺伝子発現をqPCRで評価した。HDLECでProx1、VEGFR-3、LYVE-1、ANGPT2が他の2細胞よりも高発現していた。Prox1とVEGFR-3の過剰発現ベクターを作成し、HSAVECに遺伝子導入したが、HSAVECをLECに誘導することはできなかった。継続して網羅的解析を実施する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果が臨床応用されればリンパ浮腫診療において極めて画期的な治療法となる。本治療法の開発は、患者自身の静脈から分化させるものでES細胞やiPS細胞を使用しないことから倫理的問題は全く無く、安全性の観点からも発癌を含めたあらゆる点で優れた治療法と考える。また原発性、続発性リンパ浮腫を問わず応用可能であり、また外傷、廃用性、静脈性浮腫などにも治療効果が期待できることから、多くの浮腫病態において汎用性の高い治療法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lymphatic vessels develop by differentiation from the vein wall during fetal life. It has been reported that it is possible to induce differentiation of fibroblasts directly into cardiomyocytes. To develop a method to directly induce differentiation from veins into lymphatic vessels, we evaluated gene expression in HUVECs, HSAVECs, and HDLECs by qPCR. Prox1, VEGFR-3, LYVE-1, and ANGPT2 were highly expressed in HDLECs than in the other two cells. Overexpression of Prox1 and VEGFR-3 vectors were created and gene transfer was performed into HSAVECs, but HSAVECs could not be induced into LECs. We will continue to conduct comprehensive analysis.

研究分野：外科

キーワード：ダイレクト・リプログラミング リンパ管

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ管は胎生期の静脈壁から分化し発生することが知られている (Sabin FR. Am J Anat, 1902.)。この際に COUP-TF II や Sox18 の発現が必要であり、またリンパ管のマスター遺伝子と認識されている Prox1 や VEGFR-3 などの遺伝子もリンパ管の発生、分化に重要であることが明らかになっている。また VEGFR-3、FoxC2、Sox18 の 3 遺伝子異常は原発性リンパ浮腫を引き起こすことが知られている (Oliver G. Nat. Rev. Immunol. 2004.; Francois M, et al. Nature. 2008.; Petrova T.V, et al. Nat. Med, 2004.)。

先天的なリンパ管の形成異常を原因とする原発性リンパ浮腫は進行性の難治性疾患で出生 10 万人に対して 1~3 人程度の割合で発症し、本邦に約 3600 人の患者が存在する。また乳癌、婦人科癌などに施行される治療手段であるリンパ節郭清や放射線治療の合併症として続発性リンパ浮腫が発症し、本邦で 10 万人以上の患者が存在する。これらは同様にリンパ液が貯留し四肢や外陰部、頭頸部などに著明な浮腫を発症する。死には至らないものの醜形と身体活動の制限から QOL を著しく障害する。しかし根治的な治療手段は現在存在しない。そこで我々は肝細胞増殖因子 (HGF) のリンパ管新生作用とリンパ浮腫動物モデルでの治療効果を発見し (Y. Saito, et al. Circulation. 2006; Y. Saito, et al. Biomed Res Int. 2013) 、さらにこれらの成果を基盤として、第 I/II 相治験を実施した。世界初のリンパ浮腫遺伝子治療薬として成果が期待される (特許 4111993)。

しかしこの遺伝子治療には伸長させるリンパ管の存在が必須で、無形成、極度の低形成による原発性リンパ浮腫には効果は望めない。この場合には“種”となるリンパ管内皮細胞が必要である。このリンパ管の“種”となる細胞をどのように獲得するかが、今後の重要な課題である。近年細胞治療の試みで線維芽細胞から直接心筋細胞へ分化誘導することが可能であることが報告されている (Wada R, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)。

### 2. 研究の目的

正常 (末梢) 静脈からリンパ管を分化誘導する方法を開発することを目的とした。

本研究はリンパ管の発生過程を考慮し、生体の分化した静脈からリンパ管を分化させようとする新たな再生医療の試みである。従来の ES 細胞や iPS 細胞などの未分化な細胞を使用しないリンパ管独自の特性に着目した独創的な研究であると考えられる。困難な探索的な研究であるとは理解しているが、これまでに多くの再生医療の試みがなされ、未分化な細胞から血管を含む多くの臓器を再生することが極めて難しい現状を考えた時、チャレンジする価値は十分にあると思われる。

今回は全体の開発研究のスタートとして以下の点を目標とした。1) 静脈細胞群における静脈の特性を持った細胞群とリンパ管の特性を持った細胞群の差異を明らかにする。2) 静脈内皮細胞からリンパ管内皮細胞を誘導可能な因子を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養系

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト伏在静脈内皮細胞 (HSaVEC) およびヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) の 3 細胞培養系 (タカラバイオ社) を使用した。細胞はそれぞれ Endothelial Cell Growth Medium 2 (HUVEC および HSaVEC)、Endothelial Cell Growth Medium MV 2 (HDLEC) を使用して培養し 6~8 継代で実験に使用した。培養はインキュベーターを使用し 37°C、5%CO<sub>2</sub>、100%湿度とした。

細胞への遺伝子導入は Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC 社) を使用した。導入 2 時間後に培地交換し、その後は回収まで 1 日、3 日、5 日間それぞれ培養した。

#### (2) real time PCR

細胞は 100mm Dish に 100%コンフルエントとなるまで培養し、トリプシン処理でペレットとした。細胞ペレットより mRNA を抽出 (QIAGEN 社 RNeasy Plus Mini Kit 使用) し cDNA 化 (Roche 社 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit 使用) した。各遺伝子発現は TaqMan Probe 法により qPCR (Roche 社 LightCycler96 システム使用) で評価した。GAPDH を内在性コントロールとして使用した。使用したプローブは以下の通りである; GAPDH、Ets-1、Ets-2、Prox1、VEGFR-3、ANGPT2、LYVE-1 (以上 ThermoFisher SCIENTIFIC 社)、HGF、Met、Sox18、FoxC2、VEGF-A、VEGF-C、TGF-β 1 (以上 Roche 社)。

#### (3) 過剰発現ベクターの作成

Prox1 および VEGFR-3 の過剰発現ベクターを作成した。Prox1 遺伝子と VEGFR-3 遺伝子は以下の PCR プライマーを使用し、HDLEC の cDNA をテンプレートとして PCR により増幅 (タカラバイオ

社 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version 使用)、回収 (QIAGEN 社 QIAquick Gel Extraction Kit 使用) した。Prox1; 5' -TATGAATTCGTGATGCCTGACCATGAC、GAGCTGCTTCATGAGTAGAAATCTAGAATA-3'、VEGFR-3; 5' -ATAAAGCTTCGGCCGGAGATGCAG、GGACAAGAGGAGCATGAAAGTCTAGATAT-3'。PCR 産物および pcDNA3.1+ (ThermoFisher SCIENTIFIC 社) を制限酵素 EcoR I あるいは HindIII、および Xba I (すべてタカラバイオ社) で処理した後、ライゲーション (タカラバイオ社 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> 使用) し過剰発現ベクターを作成した。

#### (4) 統計解析

すべての結果は ANOVA により統計解析した。Tukey's multiple comparisons test により比較した。P<0.05 を統計学有意とした。解析には GraphPad Prism Version9 を使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) 静脈内皮細胞とリンパ管内皮細胞の遺伝子発現の違い

はじめに静脈系内皮細胞とリンパ管内皮細胞の遺伝子発現の差異を明らかにするため、成熟した静脈系細胞として HSAVEC、未分化な静脈系細胞として HUVEC、成熟したリンパ管内皮細胞として HDLEC を用い、遺伝子発現を qPCR で解析した。解析の対象とした遺伝子は過去の文献よりリンパ管の形成に重要と思われる 13 遺伝子 (Prox1、HGF、Met、LYVE-1、Ets-1、Sox18、VEGFR-3、TGF- $\beta$ 1、FoxC2、ANGPT2、VEGF-C、Ets-2、VEGF-A) とした。結果を Figure 1 に示す。Prox1、LYVE-1、VEGFR-3、ANGPT2 の 4 遺伝子が HDLEC において他の 2 細胞よりも有意に高発現していた。HGF、Met、Ets-1、TGF- $\beta$ 1 については有意差を認めなかったが同様の傾向を示した。興味深いことに同じ静脈系細胞である HSAVEC と HUVEC でも Sox18、FoxC2、VEGF-C、Ets-2、VEGF-A の発現が異なっていた。詳しくみると、Sox18、FoxC2、VEGF-C については HDLEC と HUVEC の発現パターンが似ており、Ets-2、VEGF-A については HDLEC と HSAVEC の発現パターンが似ていた。

この結果からリンパ管内皮細胞のマスター遺伝子とされる Prox1 およびリンパ管新生に必須とされる VEGF-C の受容体 VEGFR-3 の 2 遺伝子の発現を上昇させることで静脈系内皮細胞をリンパ管内皮細胞へと誘導可能なのではないかと仮説を立てた。表面マーカーである LYVE-1 および増殖因子である ANGPT2、さらに Ets-1 と Met はリンパ管誘導のマーカーとして利用することとした。

#### (2) 過剰発現ベクターの有効性

Prox1 と VEGFR-3 の過剰発現ベクターを作成した。この有効性を確認するため、過剰発現ベクターを HSAVEC に遺伝子導入し、Prox1 および VEGFR-3 の発現を qPCR で解析した。遺伝子導入効率については、コントロールとして用いた GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察し、GFP(+) 細胞数をカウントすることで確認したが、60%前後の導入効率であり、十分な遺伝子導入ができていると考えた。qPCR の結果は、Prox1、VEGFR-3 とともに導入 1 日目で高発現しており、コントロール群 (GFP) に対して Prox1 で 1164 倍 (p<0.05)、VEGFR-3 で 946 倍 (p<0.01) であった。遺伝子発現はその後減少し、5 日目には Prox1、VEGFR-3 とともに統計学的な有意差を認めなかった。いずれにしても両過剰発現ベクターが HSAVEC 内で機能し過剰発現が誘導されていることを確認した (Figure 2)。

#### (3) 過剰発現ベクターによるダイレクト・リプログラミングの試み

次に Prox1 と VEGFR-3 の 2 遺伝子で HSAVEC をリンパ管に誘導可能であるかを確認するために、各過剰発現ベクターを HSAVEC に遺伝子導入したあと、1、3、5 日目にマーカーとした LYVE-1、ANGPT2、Ets-1、Met の発現を qPCR で確認した。結果を Figure 3 に示す。すべてのマーカー遺伝子は Day5 まで上昇を認めず、Prox1 と VEGFR-3 の 2 遺伝子では HSAVEC を LEC に誘導することはできていなかった。

以上の結果から、静脈内皮細胞をリンパ管内皮細胞にダイレクト・リプログラミングするためにはさらなる誘導因子の同定が必要であることがわかった。本研究は継続し、網羅的解析により誘導因子を絞り込んでいく計画としている。

Figure 1

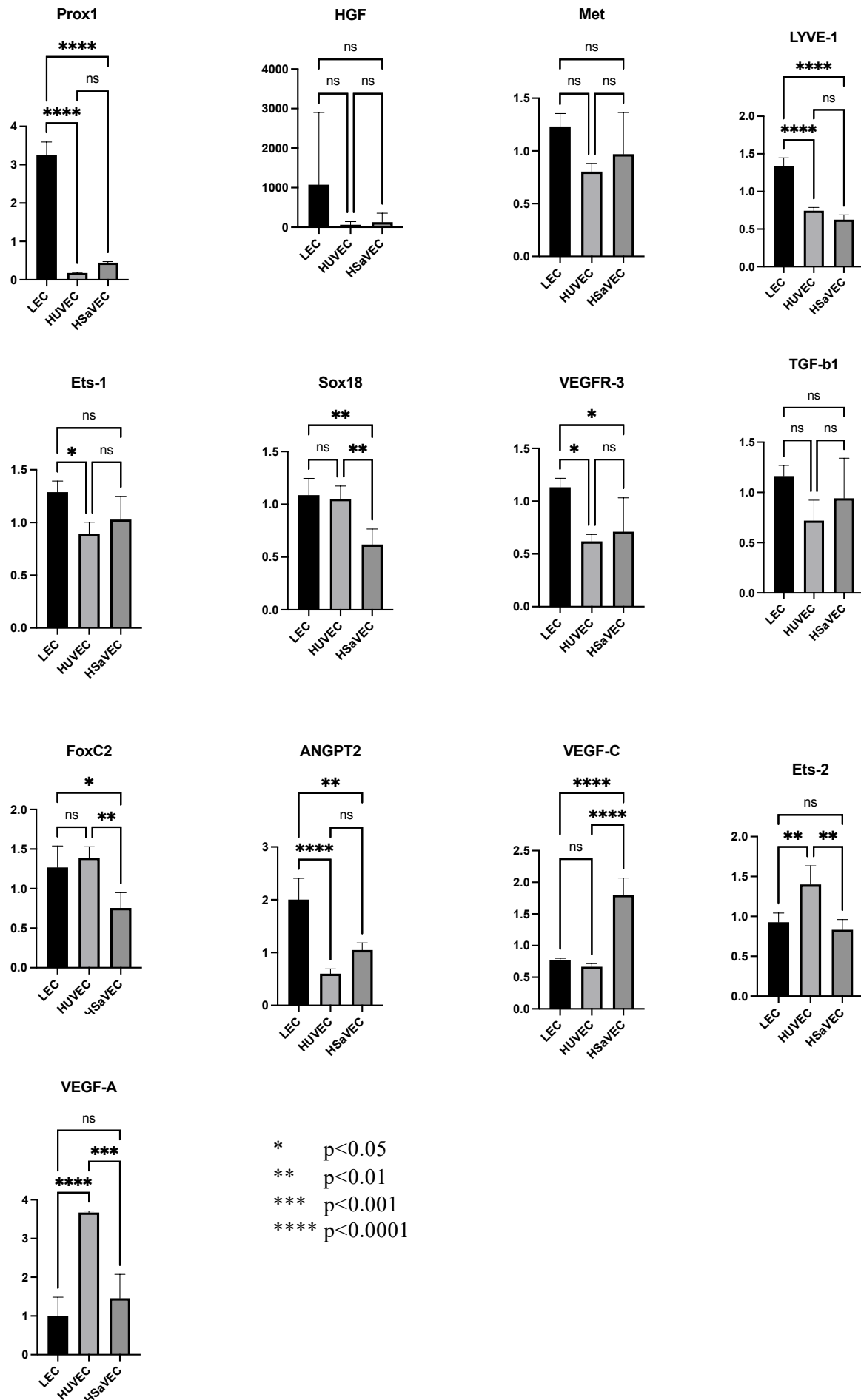


Figure 2

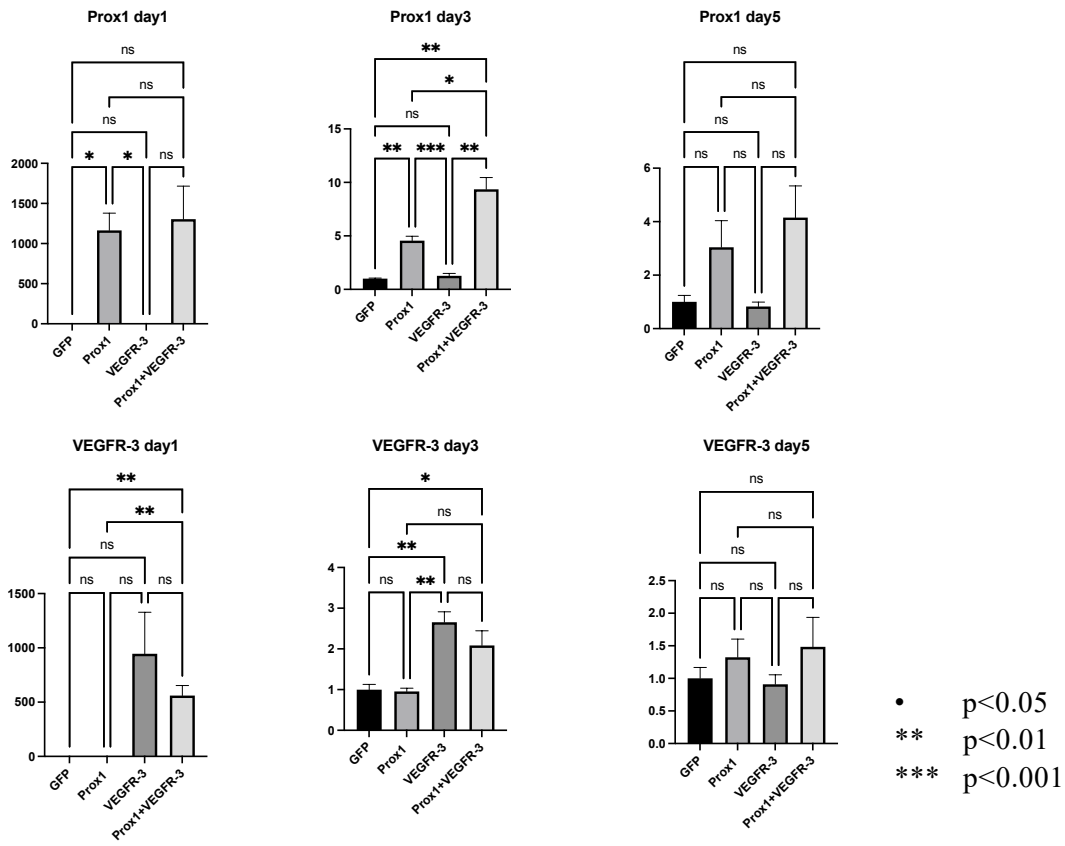
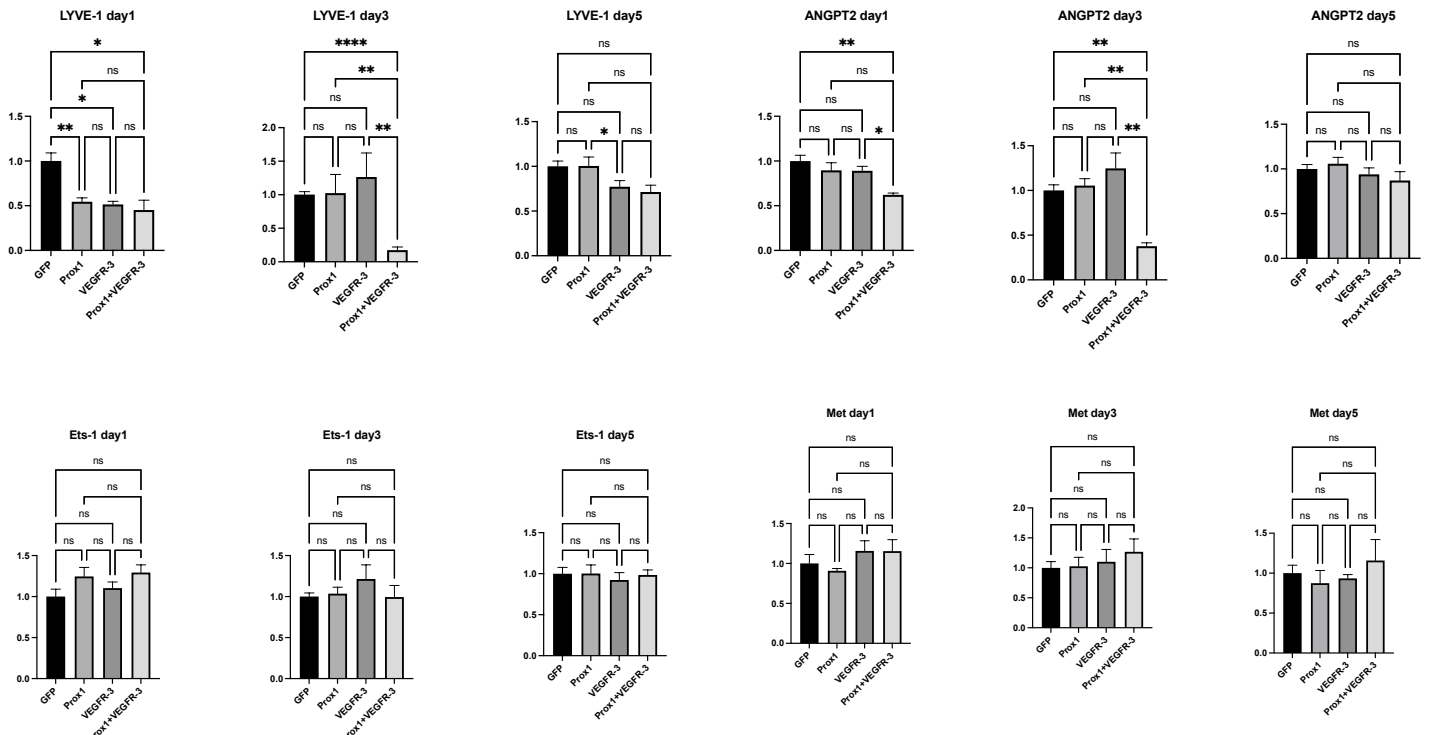


Figure 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齊藤 幸裕  (SAITO Yukihiro)  (80540583)	旭川医科大学・医学部・准教授    (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関