

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15424

研究課題名(和文) VEGF増加は高内皮細静脈を増生させ、2次・3次リンパ組織のリモデリングを促す

研究課題名(英文) Upregulation of VEGF induces high endothelial venule neogenesis and remodeling of secondary and/or tertiary lymphatic tissues.

研究代表者

竹之内 和則 (Takenouchi, Kazunori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30646758

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)：リンパ節内のHEVが免疫細胞に対する機能を保持しているか、細胞接着因子の発現について調べた。リンパ節内のHEVにはMECA-79によるPeripheral node Adressin (PNAd)の発現を認めた。ICAM-1、GlyCAM-1についても増殖したHEV上に発現を認め、機能的な役割を担っていることが示唆された。HEVがなぜ増殖するかについてリンパ節のホモジネート、組織染色によりLTの検出を試みたがコントロール群とは有意な差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VEGFは主として血管増殖を司るが、我々の研究において、VEGFは2次リンパ組織内でのHEV形成やリンパ濾胞の構造変化をきたすので免疫系にも深く関わる分子であると考えられる。

また、3次リンパ組織はがん免疫・自己免疫疾患・遷延性の腎臓病のような慢性的な免疫異常との関連が示唆されている。3次リンパ節内と2次リンパ節内のHEV発生・増殖過程は類似していることが知られており、in vivo モデルにおいてその後の免疫応答などを詳細に分析することで、様々な疾患の基礎となる現象を理解することが本研究の意義である。ひいては難治性慢性炎症の治療の一助になると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Expression of peripheral node addressin detected using MECA-79 antibody was observed on high endothelial venule (HEV) in lymph nodes. Expression of ICAM-1 and GlyCAM-1 was also observed on the HEV which was proliferated, suggesting that they have a functional role.

Regarding the reason why HEV proliferates, we tried to detect lymphotoxin by lymph node homogenate and tissue staining, but no significant difference was observed compared with the control group.

We created a tumor-bearing mouse by subcutaneously transplanting it using cultured cancer cells, but we could not obtain stable data. In the future, it will be necessary to further study what kind of the cancer cells to choose, adjustment of the transplantation amount, and the timing of pathological autopsy.

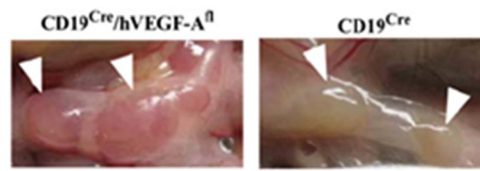
研究分野：血管代謝

キーワード：VEGF 3次リンパ節 2次リンパ節 免疫減弱 胚中心

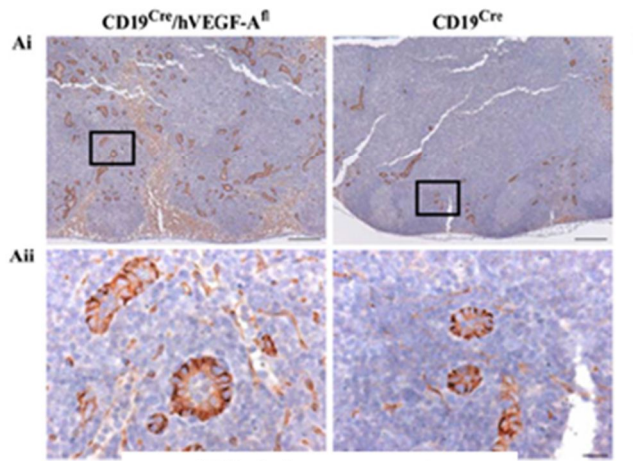
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究開始以前より我々は、Crow-Fukase 症候群の病態解析モデルとして、B 細胞特異的に血管内皮成長因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を過剰発現するマウスを作成し研究を行ってきた。その過程で B 細胞由来の VEGF は、リンパ節内で高内皮細静脈 High Endothelial Venule (HEV) を増加させ、好塩基球を集簇し、脾臓の肥大化と赤髄・白髄の組織構造の崩れをもたらすこと、ovalbumin に対する獲得免疫・抗体産生を減弱させることを報告してきた (J Immunol. 2010)。しかし、なぜ脾臓の組織構造が崩れ、抗体産生が減弱するかは解明できておらず、また、リンパ節内に増えた HEV が外観だけでなく、機能的に作用しているかは明らかにされていない。HEV はリンパ組織を形成する上で免疫細胞をリクルートするための非常に重要な構造であるにも関わらず、どのような条件で分化してくるのかは未だ十分に解明されていない。そこで我々は VEGF によってリモデリングしたリンパ節・脾臓をさらに詳細に分析し、VEGF がリンパ組織・免疫系にもたらす影響について詳細に分析することとし、次の5点を重要課題とした。



B cell-VEGF Ig でのリンパ節腫脹



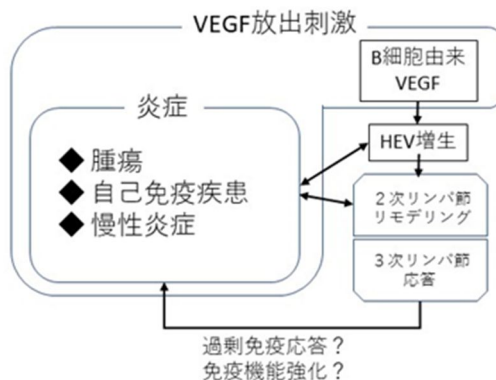
B 細胞由来 VEGF により HEV が増加・拡大する。

- (1) B 細胞由来の VEGF により、なぜ HEV の増生がおこるのか。
- (2) 増生した HEV は外観だけでなく、機能的に免疫細胞をリクルートしているのか。
- (3) B 細胞由来の VEGF により、なぜ脾臓の組織構造の崩れが認められるのか。
- (4) このマウスモデルで ovalbumin に対する抗体産生やサイトカイン産生が減弱したのはなぜか。
- (5) もし、このマウスにがん細胞を移植したら、HEV 増生によりがん免疫は強化されるのか、あるいはやはり抗体産生など減弱した免疫系により、がん細胞増殖は亢進するのか。

2. 研究の目的

免疫系組織は胸腺・骨髄から成る 1 次リンパ組織やリンパ節・脾臓・パイエル板などの 2 次リンパ組織から成るが、近年、3 次リンパ組織の存在が注目されてきた。3 次リンパ組織は明確な隔壁を持たない、T cell zone、B 細胞濾胞と HEV から成るリンパ様組織であるが、3 次リンパ組織はがん免疫・自己免疫疾患・遷延性の腎臓病のような慢性的な免疫異常との関連が示唆されていた。以上のことから、VEGF を過剰発現しただけで HEV 形成が認められるこのマウスモデルを詳細に分析すれば、多くの疾患の解明の手掛かりになるものと考えられた。

本来生体内に存在すべきでない抗原が出現した場合には必ず免疫系が作動し、炎症が起こる。炎症細胞による様々なサイトカインの産生により、酸素需要が増大し、結果として炎症の場では低酸素刺激により VEGF が誘導されることになる。つまり、感染症・がん細胞増殖・自己免疫疾患などの慢性疾患では VEGF の誘導が起こり、時には 3 次リンパ組織を形成して免疫系が賦活化される。我々が作成した B 細胞由来 VEGF の過剰発現モデルは無菌的炎症の一型といえ、脾臓・リンパ節のリモデリングを促すことが示されている。3 次リンパ節内と 2 次リンパ節内の HEV 発生・増殖過程は類似していることが知られており、in vivo モデルにおいてその後の免疫応答などを詳細に分析することで、様々な疾患の基礎となる現象を理解することが本研究の目的であった。



3. 研究の方法

- (1) B 細胞由来の VEGF により、なぜ HEV の増生がおこるのか。  
これまでに広く認められている HEV 形成関連分子として Lymphotoxin (LT) がある。VEGF の上昇により、LT の上昇がもたらされていないか確認した。リンパ節および脾臓のホモジネー

トや病理組織を用いて LT<sup>+</sup>、LT<sup>-</sup> の濃度測定、免疫染色を行うとともに、LT 受容体の染色も行うことで、責任細胞の究明を試みた。

(2) 増生した HEV は外観だけでなく、機能的に免疫細胞をリクルートしているのか。

HEV 特異的抗原として、Peripheral node Adressin (PNAd)、Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1)、HEC-6ST/GlcNAc6ST-2 などがあげられるが、PNAd は特に重要であり、MECA-79 モノクローナル抗体によって検出した。MAdCAM-1 は頸部リンパ節では発現しないが腹腔内リンパ節では発現が認められるなど部位毎に異なることが報告されているので、それも併せて検証した。その他、ICAM-1、GlyCAM-1 など白血球の血流からリンパ節のエントリーに必要な分子についても組織染色を試みた。

(3) B 細胞由来の VEGF により、なぜ脾臓の組織構造の崩れが認められるのか。

通常のリンパ組織で認められるような胚中心構造が保持されているかを Ki67、B 細胞マーカー、T 細胞マーカーを用いて組織染色を行った。また、Follicular Dendritic cell (FDC) や Fibroblast Reticular cell (FRC) などのリンパ組織に重要な細胞の構成について検討した。

(4) B 細胞特異的 VEGF 過剰発現マウスで ovalbumin に対する抗体産生やサイトカイン産生が減弱したのはなぜか。

脾臓内での濾胞構造が崩れていることから、ナイーブ B 細胞から形質細胞への分化に障害が起こっている可能性が示唆されてきた。脾臓とリンパ節において、ovalbumin 投与時の形質細胞の増加量、および抗体産生量を免疫染色・フローサイトメーター、ELISA などにより定量的に評価した。

(5) B 細胞特異的 VEGF 過剰発現マウスにがん細胞を移植したら、HEV 増生によりがん免疫は強化されるのか、あるいは抗体産生など減弱した免疫系により、がん細胞増殖は亢進するのか。

このマウスモデルを用いて、腹腔内あるいは皮下に腫瘍細胞を移植する。その際に、投与する腫瘍細胞の数をいくつかの段階に振り分け、腫瘍増大のための初期投与数の閾値を探り、生存期間の長短を比較した。腫瘍投与後、腫瘍塊の周囲に 3 次リンパ節形成が比較的早期に起こるかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

2018 年度は主として、リンパ節内の HEV が免疫細胞に対する機能を保持しているか、細胞接着因子の発現について調べた。リンパ節内の HEV には MECA-79 による Peripheral node Adressin (PNAd) の発現を認めた。ICAM-1、GlyCAM-1 についても増殖した HEV 上に発現を認め、機能的な役割を担っていることが示唆された。HEV がなぜ増生するかについてリンパ節のホモジネート、組織染色により LT の検出を試みたがコントロール群とは有意な差を認めなかった。

また、脾臓内のリンパ組織で認められるような胚中心構造の崩れがリンパ節内でも認められるかを検討した。無刺激でのリンパ節内胚中心の構造は比較的保たれていたが、ovalbumin 投与を行うと Tg 群で non-B、non-T 細胞の増殖傾向を認めたが、有意差はなかった。これに関してはさらなる検討が必要と考えられた。

2019 年度はさらに、Follicular Dendritic cell (FDC) や Fibroblast Reticular cell (FRC) などのリンパ組織に重要な細胞の構成についても検討を行った。フローサイトメーターを用いてリンパ節の生理食塩水浮遊液の形質細胞、T 細胞、B 細胞、FDC、FRC の定量的評価を行った。また、ovalbumin 投与時のこれらの細胞数の変化についてコントロール群との比較を行った。その結果は概ね 2018 年と同様の結果であった。投与時間別の検討が十分でなかった為、抗体産生減弱機構の究明の為にはさらなる検討が必要と思われた。

リンパ節、脾臓以外の組織における 3 次リンパ節構造を様々な病理組織切片を用いて探索するも、無刺激状態ではそれらの組織以外に 3 次リンパ組織を見出すことはできなかった。

1 種類の培養がん細胞を用いて皮下移植することにより担癌マウスの作成を行ったが、個体ごとに表現型が異なり、安定したデータを得られなかったことから、今回は十分な成果を得られなかった。がん細胞の選別、移植量の調整を行い、病理解剖の時期などさらなる検討が必要と考えられた。また、摂取部位による免疫細胞の変化も今後の検討課題と考えられた。

癌細胞の皮下摂取後の抗体産生量は Tg 群、コントロール群共に増加傾向にあったが、両者に有意な差は認めなかった。ovalbumin の結果と異なるが、抗原に対する即時性の違いがある為、今後も再度検討を重ねる必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上田英昭、松本和久、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、橋口照人、井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討
3. 学会等名 第13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会（SSC）シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamakuchi M, Takagi K, Matsuyama T, Kondo K, Uchida A, Misono S, Takenouchi K, Oyama Y, Inoue H, Hashiguchi T
2. 発表標題 The role of IL-13 in regulatin pulmonary artery endothelial cell migration
3. 学会等名 The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----