

令和 3 年 4 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16994

研究課題名(和文) 知覚神経系によるリンパ管新生の制御とリンパ浮腫治療

研究課題名(英文) Regulation of sensory nerve system in lymphangiogenesis and lymph edema

研究代表者

美島 利昭 (Mishima, Toshiaki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00296477

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)：痛みや炎症などの侵害刺激により遊離されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が受容体活性調節蛋白1(RAMP1)に作用してリンパ浮腫に関与するかを調べた。マウスにリンパ浮腫を作成すると、野生型マウスよりもRAMP1ノックアウトマウス(RAMP1^{-/-})のリンパ浮腫が遷延しリンパ管新生因子産生が抑制された。RAMP1^{-/-}では炎症性マクロファージが浸潤し、リンパ管新生因子(VEGF-C)はRAMP1シグナルに依存して産生された。リンパ浮腫においてはCGRPがマクロファージのRAMP1シグナルに作用してリンパ管新生を促進してリンパ浮腫が改善することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの腋窩リンパ節廓清術後、子宮・卵巣がんの骨盤内リンパ節廓清術後、またこれらに追加される放射線療法後などの患者では2次性のリンパ浮腫が発症することがある。多くは難治的で慢性化するだけでなく、皮膚の広範な肥厚と線維化、繰り返す蜂窩織炎などのために患者のQOLは著しく損なわれる。現在でも本質的な治療方法はないため、リンパ再生を含めたリンパ管新生増強方策が切望されている。この点、CGRPや特異的RAMP1アゴニストが2次性リンパ浮腫の治療に有効であることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Secondary lymphedema commonly arises as a complication of cancer surgery and radiation treatment; however, the underlying mechanisms are poorly understood. The present study examined whether RAMP1 plays a role in increased lymphangiogenesis during secondary lymphedema. A model of lymphedema was generated by surgical removal of pre-existing lymphatic vessels from the subcutaneous tissue on the tails of RAMP1-deficient (RAMP1^{-/-}) mice and their wild-type (WT) counterparts. Lymphedema in RAMP1^{-/-} mice was sustained, with suppressed lymphangiogenesis and reduced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGFR-3. The number of pro-inflammatory macrophages in RAMP1^{-/-} mice was higher than that in WT mice. RAMP1 signaling improves lymphedema and accelerates lymphangiogenesis associated with reduced recruitment of pro-inflammatory macrophages.

研究分野：血管外科

キーワード：リンパ浮腫 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

乳がん手術時の腋窩リンパ節廓清、子宮・卵巣がん手術時などの骨盤内リンパ節廓清など、これらに追加される放射線療法などを行なうと、2 次性のリンパ浮腫（上下肢浮腫）が発症することがある。これらの病態はリンパ流障害によるリンパ液滞留によるリンパ浮腫である。多くは難治性で慢性化するだけでなく、皮膚の広範な肥厚と線維化、繰り返す蜂窩織炎などのために患者の QOL は著しく損なわれる。保存的治療として弾性ストッキング着用やマッサージなどの理学療法または外科的リンパ管再建術などの治療法がなされ、ある一定の効果をみせるものの、限定的で十分とは言えない。現在でも本質的な治療方法はないため、リンパ再生を含めたリンパ管新生増強方策が切望されている。

一方、炎症刺激などを感知して、脊髄後根神経節から産生される神経ペプチドのひとつカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide : CGRP)にはその受容体サブタイプのひとつである受容体活性調節タンパク質 1 (receptor activity-modifying protein 1, RAMP1)に働いて血管拡張作用や痛覚作用などがある。

われわれは、CGRP/RAMP1 システムが腫瘍増殖、胃潰瘍修復および虚血組織改善時などにおいて、血管新生増強作用を示して病態に関与することを報告した。さらにマクロファージに発現する RAMP1 に作用してリンパ管新生を増強することで創傷治癒過程が促進する可能性をみいだした。特に RAMP1 シグナルが創傷肉芽組織部に形成されたリンパドレナージ機能を亢進しており、リンパ流調節作用があるものと考えられる。

2. 研究の目的

2 次性リンパ浮腫に対する根本的な治療がないことを踏まえ、リンパ浮腫の機序とその制御機構を神経系と免疫系のクロストークの観点から解明できないかと考えた。そこで、本研究においてはマウス尾部リンパ浮腫モデルを用いて、集積するマクロファージの RAMP1 シグナルによるリンパ管新生の制御機構を解明し、治療応用の可能性を探ることを目的とした

3. 研究の方法

RAMP1 欠損マウス(RAMP1-/-)と野生型マウス(WT)にマウス尻尾部基部皮下組織を全周搔把しリンパ管を選択的に結紮切離するリンパ浮腫モデルを作成し、以下の点を明らかにする研究計画と方法を考案した。

(1) リンパ浮腫における RAMP1 の関与とリンパ管新生作用

RAMP1 欠損マウス(RAMP1-/-)と野生型マウス(WT)に作成したマウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて末梢に生じる浮腫を尾部径を経時的に計測することで評価する。RAMP1 の発現および発現細胞を解析する。また浮腫部組織におけるリンパ管新生についてリンパ管内皮マーカーである LYVE-1 抗体を用いて免疫組織により定量評価する。さらにリンパ管新生因子産生やリンパ管内皮マーカー発現を PCR で測定する。次にリンパ管機能を検証する。尾先端部に FITC dextran を注入しリンパ管造影を行い、新生リンパ管の構造、機能、リンパ流などを生体イメージング法にて調べ、RAMP1 受容体シグナルのリンパ管形成の役割を解析する。

(2) マクロファージにおける RAMP1 シグナルの役割解明

尾部浮腫部に集積するマクロファージを CD11 b 抗体を用いて免疫染色で評価する。集積に關与するケモカイン産生やリンパ管新生に關わる因子(VEGF-C, VEGF-D など)をマクロファージが RAMP1 シグナルに依存して産生するかどうかを解析する。また、リンパ管新生に關与するマクロファージの特性を檢討する目的で傷害性マクロファージ (M1) か、修復性マクロファージ(M2)かについて檢討する。

(3) 培養マクロファージによる検討

RAMP1-/-とWTの骨髓から採取した培養マクロファージを、CGRP で刺激するとリンパ管新生因子(VEGF-C, VEGF-D) 発現が RAMP1 シグナルに依存して発現するかどうかを調べる。さらに、CGRP が傷害性 M1 型マクロファージの修復性 M2 型マクロファージへの分化誘導に關与するかを検証する。

4. 研究成果

リンパ浮腫は RAMP1-/-マウスにおいて遷延した

尾部浮腫処置をおこなった後の尾部径を経時的に測定したところ WT に比較して RAMP1-/-では尾部径が大きく、リンパ浮腫の遷延化がみられた(図 1)。また RAMP1 発現は WT で処置後に増大し、その発現細胞はマクロファージにみられた。

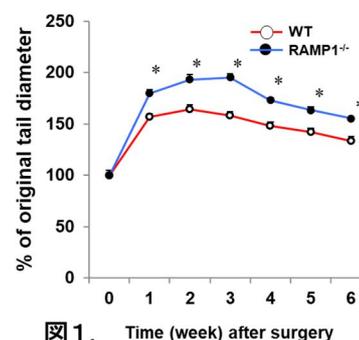


図1. Time (week) after surgery

リンパ管を LYVE-1 で染色して、リンパ管密度とリンパ管占有面積を測定すると、WT は RAMP1-/-よりもリンパ管密度が多く、反対にリンパ管面積は少なかった。この結果は、RAMP1-/-尾部におけるリンパ管は数が少なく、かつ各リンパ管は拡張したものであることを意味する。さらにリンパ管内皮マーカーである LYVE-1 と VEGFR3 の発現は RAMP1-/-は WT よりも減少した。またリンパ管新生因子である VEGF-C と VEGF-D も同様の結果であった。

尾先端部に FITC dextran を注入しリンパ管造影を行い、新生リンパ管の構造、機能、リンパ流などを生体イメージング法にて調べると、注入した蛍光色素のリンパ管外漏出が RAMP1-/-は WT よりも見られた。RAMP1-/-ではリンパ管内皮透過性が亢進しており、リンパ液吸収機能が障害されている可能性が示唆された。

RAMP1-/-マウスでは浮腫部に炎症性マクロファージが集積した

浮腫部における RAMP1 発現細胞は CD11 b 陽性細胞であることからマクロファージの関与が考えられた。そこで、集積マクロファージをカウントすると RAMP1-/-は WT よりも増加した。マクロファージのケモカインである CCL2 産生も RAMP1-/-は WT よりも増加した。さらにマクロファージの表現形式を檢討すると、RAMP1-/-は WT よりも炎症性マクロファージ関連マーカー (TNF , IL-1) が増加し、修復性マクロファージ関連マーカー (IL-10, Arginase1) が減少した。リンパ管新生にはマクロファージが重要な役割を果たすが、RAMP1 シグナルは修復性マクロファージを集積させてリンパ管新生を増強する可能性が示唆された。また、免疫二重染色をおこない、CD11 b 陽性マクロファージは VEGF-C ならびに VEGF-D と発現が共在したことから、マクロファージからリンパ管新生が産生されたものと考えられた。

RAMP1 シグナルは修復性マクロファージを誘導した

培養骨髄由来マクロファージを CGRP で刺激したところ、WT 由来のマクロファージからの VEGF-C 産生が増強した。しかしながら、RAMP1^{-/-}由来マクロファージでは変化がなかった(図2)。この結果から RAMP1 シグナルに依存してマクロファージはリンパ管新生因子を産生することが示唆された。

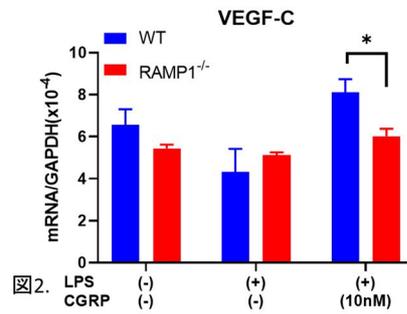


図2.

さらに、培養骨髄マクロファージを CGRP で刺激

すると、炎症性マクロファージ関連マーカである TNF は WT 由来マクロファージでは減少し、RAMP1^{-/-}由来マクロファージでは増加した(図3)。反対に修復性マクロファージ関連マーカである MR は WT 由来マクロファージでは増加し、RAMP1^{-/-}由来マクロファージでは減少した。従って、RAMP1 シグナルは修復性マクロファージを誘導したものと考えられた。

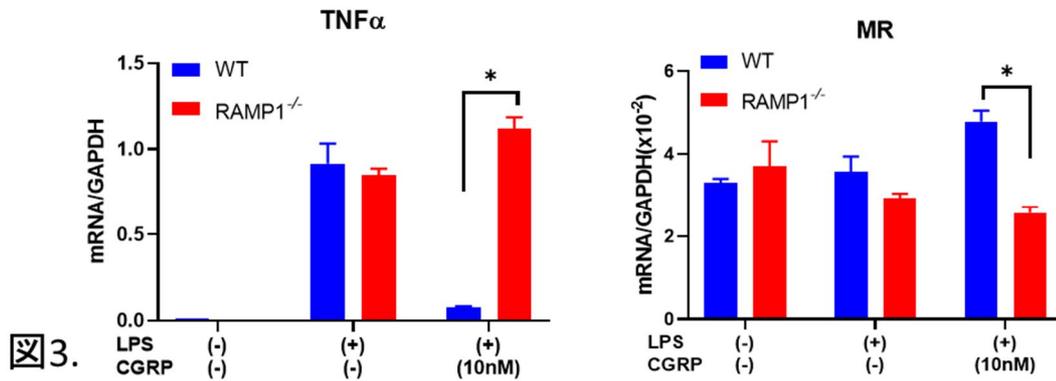


図3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuru S, Ito Y, Matsuda H, Hosono K, Inoue T, Nakamoto S, Kurashige C, Mishima	4. 巻 100
2. 論文標題 RAMP1 signaling in immune cells regulates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 738-750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0364-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagata T, Ikeda Y, Ishii S, Kishihara J, Ohkubo H, Mishima T, Kitamura T, Miyaji K, Ako J	4. 巻 18
2. 論文標題 Improved hemodynamics following endovascular treatment for acquired aortic coarctation: A case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiol Cases	6. 最初と最後の頁 138-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2018.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi K, Kitamura T, Kohira S, Torii S, Mishima T, Ohkubo H, Tanaka Y, Sasahara A, Fukunishi T, Ohtomo Y, Horikoshi R, Murai Y, Miyaji K	4. 巻 21
2. 論文標題 Cerebral oximetry for cardiac surgery: a preoperative comparison of device characteristics and pitfalls in interpretation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Artif Organs	6. 最初と最後の頁 412-418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10047-018-1052-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagata Takako, Ikeda Yuki, Ishii Shunsuke, Kishihara Jun, Ohkubo Hiroto, Mishima Toshiaki, Kitamura Tadashi, Miyaji Kagami, Ako Junya	4. 巻 18
2. 論文標題 Improved hemodynamics following endovascular treatment for acquired aortic coarctation: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 138 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2018.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Kensuke, Kitamura Tadashi, Kohira Satoshi, Torii Shinzo, Mishima Toshiaki, Ohkubo Hiroto, Tanaka Yuki, Sasahara Akihiro, Fukunishi Takuma, Ohtomo Yuki, Horikoshi Rihito, Murai Yuta, Miyaji Kagami	4. 巻 21
2. 論文標題 Cerebral oximetry for cardiac surgery: a preoperative comparison of device characteristics and pitfalls in interpretation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 412~418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-018-1052-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北村律、鳥井晋三、宮本隆司、美島利昭、大久保博世、藤岡俊一郎、松代卓也、八嶽一貴、荒記春奈、田所祐紀、大西義彦、宮地鑑
2. 発表標題 Pre-operative neutrophil-lymphocyte ratio predicts bleeding tendency during elective total arch replacement
3. 学会等名 The 28th Congress of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保博世、美島利昭、藤岡俊一郎、村井佑太、石堂博敬、荒記春奈、福西琢真、井上信幸、北村律、宮本隆司、鳥井晋三、宮地鑑
2. 発表標題 破裂性腹部大動脈瘤・腸骨動脈瘤に対するステントグラフト内挿術
3. 学会等名 第47回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義也、井上智仁、大高史聖、美島利昭、大久保博世、馬嶋正隆
2. 発表標題 RAMP1 signaling in hepatic macrophages plays a critical role in immune-mediated hepatitis
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------