

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19553

研究課題名（和文）血管とリンパ管が独立したネットワークを構築する原理の解明

研究課題名（英文）Mechanisms for specification of blood and lymphatic vessels

研究代表者

久保田 義顕（Kubota, Yoshiaki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：50348687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：血管とリンパ管は、同じ脈管系の組織でありながら、最終的な合流地点（頸部の静脈角）を除き、一切接続することは無く、血流とリンパ流が交わることは無い。しかしながら、血管とリンパ管の構造・組織学的特徴を比べると、ほぼ見分けがつかないほど酷似しており、両者がお互いをどのように見分け、独立性を担保するのは未解明である。本研究の成果としては、遺伝子改変マウスや培養細胞の解析において、リンパ管発生のマスター転写因子であるProx1の発現量を負に制御する機構を見出し、血管内皮細胞においてこの制御が破綻すると、血管がリンパ管を接続すべき同志であると認識してしまうことを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は血管・リンパ管という体内の2つの酷似する循環系が、なぜ一切交通することなく、独立したネットワークを形成するのかという、長年世界的に未解明とされている生物学的な疑問を解き明かしたという学術的重要性を持つ。また、臨床的側面からは、リンパ浮腫の病態解明、治療への発展性を秘める。将来的には本研究で見出されたシグナル経路に介入することで、局所で薬剤的に静脈-リンパ管シャントを創出できれば、リンパ浮腫の画期的治療になると考える。

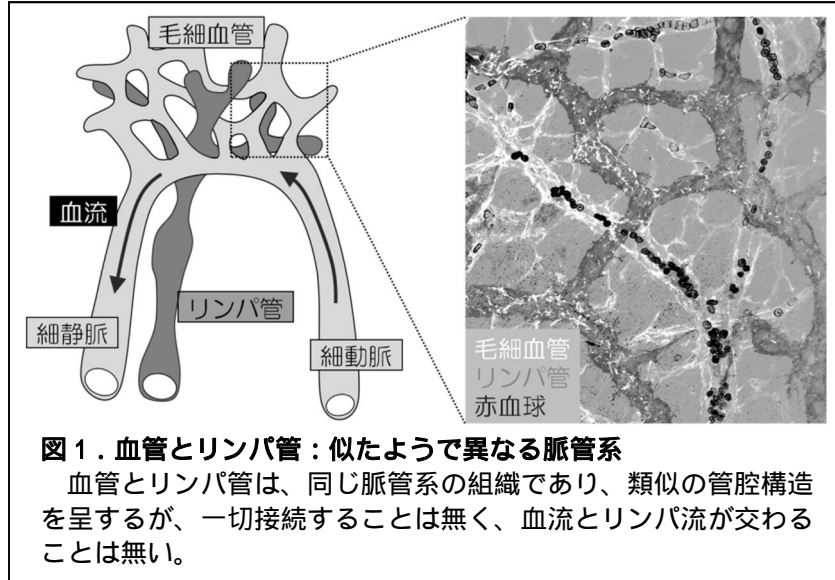
研究成果の概要（英文）：Vascular and lymphatic systems are two major circulatory systems properly distributed throughout the body. The structures of these two are histologically very similar but anatomically never share the lumen with except for the “venous angle”, the final junction of collecting lymph ducts and subclavian veins. The expression of Prospero Homeobox Protein 1 (Prox1), a master transcription factor of lymphatic specification from venous endothelial cells, determines both the initiation and maintenance of the identity as lymphatic endothelial cells, somehow contributing to the separation of blood and lymphatic systems. Here, using genetically modified mice, we found a tumor suppressor, which pathway ultimately governs the expressions of Prox1, and developmentally separates blood and lymphatic vascular systems. Our data may pave the way to treat the secondary lymphedema, which frequently occurs after extensive lymph node dissection associated with cancer surgery.

研究分野：解剖学、発生生物学、血管生物学

キーワード：血管 リンパ管 Prox1

## 1. 研究開始当初の背景

血管とリンパ管は、同じ脈管系の組織でありながら、最終的な合流地点（頸部の静脈角）を除き、一切接続することは無く、血流とリンパ流が交わることは無い。これは両者の固有の生理的機能、つまり肺や腸管から取り入れた酸素・栄養を全身に送り届ける血管の機能、そしてリンパ液の回収、免疫提示細胞の動線というリンパ管の機能の発揮のために必須の構造であると言える（図1）。このように、



血管とリンパ管は生命現象全体の観点から俯瞰した場合、全く別物の組織であるが、その解剖学的、組織学的特徴を比べると、かなり類似しており、特に毛細血管と毛細リンパ管、細静脈と集合リンパ管とはほぼ見分けがつかないほど酷似している。個体の発生過程において、脈管組織がネットワークを形成する過程では、頻りに管腔どうしの吻合、切離を繰り返しつつ、各臓器にカスタマイズされた形で成熟したものとなっていく。従って、血管とリンパ管が各々独立してネットワークを形成するためには、血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞がお互いを別物として認識し、相互に排他的である必要がある。もともとリンパ管の起源は、部位、種によって多少の際はあがるが、基本的に胎生後期の静脈からの分化・発芽により生じるとされ、そのマスター転写因子である Prospero homeobox 1 (Prox1) がリンパ管の発生、増殖、維持に必須であることが知られている (Wigle & Oliver Cell 1999)。また、発芽した後のリンパ管構造が静脈から切離される段階においては、血管外に出た血小板がその役割の一端を果たすことも知られている。

## 2. 研究の目的

血管とリンパ管の独立性を担保すべく、血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞が如何にしてお互いの identity を感知し、別々に発生していくのか、そしてネットワーク確立後もどのようにして独立性を担保しているかは不明なところが多く、発生学の分野においては重要な課題となっている。本研究は、血管とリンパ管それぞれにおいて特有の分子機構があり、原則として相交わらないという従来のパラダイムにおける発想を転換し、放っておくと血管とリンパ管同志が吻合してしまう、つまりお互いかなりの可塑性を有するが、その行使を防ぐ分子基盤が存在するという観念に立ち、その全容を明らかにすべく遂行された。

## 3. 研究の方法

本研究は、がん抑制遺伝子として知られてきた X 遺伝子に関し、血管内皮細胞特異的欠損マウスを作成したところ、血管とリンパ管の異常吻合により致死となる、という偶然見出した表現型を足掛かりとして展開された。また、これまでの解析において、X 遺伝子がリンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 の発現量を何らかの形で負に制御しており、血管内皮細胞においてこの制御が破綻すると、血管がリンパ管を接続すべき同志であると認識してしまうことを示唆する所見を得ていた。本研究においてはこれを足掛かりとし、まず X 遺伝子が Prox1 を制御する分子メカニズムに関して、細胞生物学的・生化学的な手技 (Two-hybrid 法、CHIP-seq、ルシフェラーゼアッセイなど) を駆使し、結合タンパク、プロモーター活性の観点から解析された。併せて遺伝子改変マウスの交配によるレスキュー効果を確認することで、in vitro、in vivo の両面から下流の分子経路を検証した。それと同時に転移性がんモデルにおける X 遺伝子欠損マウスの表現型、つまり腫瘍血管・リンパ管新生、および腫瘍遠隔転移における影響を解析された。本研究は、本来可塑性を有する血管とリンパ管が、独立してネットワークを形成・維持するメカニズムの全容を X 遺伝子および下流の分子経路を軸として明らかにし、将来的にはリンパ浮腫治療の分子標的、がん転移を制御する分子機構の解明にもつながる基盤となるものと考え遂行された。

## 4. 研究成果

本研究では、X 遺伝子がリンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 の発現量を負に制御

しており、血管内皮細胞においてこの制御が破綻すると、血管がリンパ管を接続すべき同志であると認識してしまうことを、Prox1 とのダブルロックアウトにより確認した。メカニズムとしては、ChIP-seq 解析において、X 遺伝子によって核内移行が制御される bHLH 型転写因子が Prox1 のエンハンサー領域 (E-box 配列を 2 個含む) に結合することを見出した。また、培養血管内皮細胞株における、ルシフェラーゼアッセイ、siRNA によるロックダウンの系により、X 遺伝子と Prox1 の間を媒介するのがこの転写因子であることを確認した。X 遺伝子欠損マウスにおいては、リンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 が、通常発現することのない静脈内皮細胞に異所性に発現する。しかしながら、いわゆる成熟リンパ管内皮マーカ (VEGFR3, Podoplanin, LYVE1 など) が Prox1 陽性静脈内皮で発現するわけではなく、『リンパ管もどき静脈内皮細胞』(lymphatic-biased venous endothelial cells) が生じているものと考えられた。これに関し単一細胞 RNA シークエンス『リンパ管もどき静脈内皮細胞』の遺伝子発現のプロファイリングが行われ、動脈、静脈、リンパ管マーカ発現を単一細胞レベルで同時に比較検討した結果、この『リンパ管もどき静脈内皮細胞』が、まぎれもなく静脈とリンパ管内皮の transition の状態であることが示された。

本研究成果は血管・リンパ管という体内の 2 つの酷似する循環系が、なぜ一切交通することなく、独立したネットワークを形成するのかという、長年世界的に未解明とされている生物学的な疑問を解き明かしたという学術的重要性を持つ。また、臨床的側面からは、がん転移、リンパ浮腫、などの病態解明、治療への発展性を秘める。リンパ浮腫は大きく 2 つに分類される。一つは原因不明の「特発性リンパ浮腫」であり、もう一つは、がんの外科治療などの後遺症として起こる「続発性リンパ浮腫」である。社会的に特に問題になっているのは後者であり、リンパ節郭清の結果、リンパの還流機能が低下し上肢・下肢に深刻な浮腫 (むくみ) が生じる。現在のところ、治療法として運動療法や弾性ストッキングなどの理学療法、鏡視下リンパ管 - 静脈吻合術が挙げられるが、熟練のマイクロサージャリ (微小外科) の技術を以てしても治療効果が十分とは言い難い。将来的には X 遺伝子のシグナル経路に介入することで、局所で薬剤的に静脈 - リンパ管シャントを創出できれば、リンパ浮腫の画期的治療になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Lee Seung-Jun, Lee Choong-kun, Kang Seok, Park Intae, Kim Yoo Hyung, Kim Seo Ki, Hong Seon Pyo, Bae Hosung, He Yulong, Kubota Yoshiaki, Koh Gou Young | 4. 巻<br>128               |
| 2. 論文標題<br>Angiopoietin-2 exacerbates cardiac hypoxia and inflammation after myocardial infarction  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Investigation   | 6. 最初と最後の頁<br>5018 ~ 5033 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1172/JCI99659   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Si Sha, Nakajima-Takagi Yaeko, Iga Takahito, Tsuji Mayoko, Hou Libo, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Saraya Atsunori, Yamazaki Satoshi, Takubo Keiyo, Kubota Yoshiaki, Minamino Tohru, Iwama Atsushi | 4. 巻<br>63               |
| 2. 論文標題<br>Hematopoietic insults damage bone marrow niche by activating p53 in vascular endothelial cells   | 5. 発行年<br>2018年          |
| 3. 雑誌名<br>Experimental Hematology   | 6. 最初と最後の頁<br>41 ~ 51.e1 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.exphem.2018.04.006   | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>久保田義顕  |
| 2. 発表標題<br>Vascular and lymphatic systems in health and disease |
| 3. 学会等名<br>第43回 日本微小循環学会（招待講演）                                  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                          | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 馬場 理也<br><br>(Baba Masaya)<br><br>(10347304) | 熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授<br><br><br><br><br>(17401) |    |