

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790796

研究課題名 (和文) 皮膚アレルギー性接触皮膚過敏反応におけるリンパ管の機能解析

研究課題名 (英文)

The role of lymphatic vessels in cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions

研究代表者

森安 麻美 (MORIYASU ASAMI)

京都府立医科大学・附属病院・研究員

研究者番号：40433271

研究成果の概要：

皮膚の炎症では、血管透過性が高まり組織液の貯留や浮腫等が生じるが、その組織修復にリンパ管が関与していると考えられている。リンパ管新生では、VEGF-Cがリンパ管内皮細胞に特異的に発現するVEGFR-3に作用することで、その分化や増殖を誘導することが知られている。そこで、VEGF-CおよびVEGFR-3-Ig融合蛋白を発現すべく組み込まれたAAVベクターを用いてトランスジェニックマウスを作成し、耳介に接触過敏反応を誘導した。VEGF-C発現マウスでは速やかに腫脹が減少し、リンパ管新生を阻害しているVEGFR-3-Ig融合蛋白発現群では炎症の軽減が遅延した。これらから、VEGFR-3を介したVEGF-Cによるリンパ管機能への作用が炎症における組織修復の促進に関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	330,000	2,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ管は組織液、リンパ球などの免疫担当細胞、漏出した蛋白質、小腸で吸収された脂肪を血管へ送る管であり、循環系、免疫系の重要な装置である。リンパ管研究によって新たな病態の理解が進み、癌におけるリンパ節転移の制御法としての抗リンパ管新生療

法や、リンパ浮腫の治療法として vascular endothelial growth factor (VEGF) -C を投与するリンパ管新生療法など、新規の治療法の開発が進んでいる。近年、炎症の場においても、リンパ管が重要な役割を果たしていることが認識されてきている。慢性気道炎症では、拡大したリンパ管は血管から漏出した浸

出液や活性化した抗原提示細胞をリンパ節へと送る導管の役割を果たしており、リンパ管新生が欠如すると、滲出液の除去が妨げられ、リンパ浮腫へつなぐと報告されている。一方、表皮での VEGF-A が過剰発現しているトランスジェニックマウスを用いて遅延型アレルギー反応を実験的に評価した報告では、炎症反応の増強とリンパ管の拡張がみられ、VEGF-A が、リンパ管数の増加と拡張の促進、血管透過性の亢進、白血球遊走の促進などの機能を有し、それが慢性炎症を持続させると考えられている。さらには皮膚慢性炎症性角化症のひとつである尋常性乾癬の皮疹においても真皮内リンパ管が拡張・増加している。このように炎症におけるリンパ管の役割や経時的なリンパ管の形態学的な推移については、報告が少ないため未だ不明な点が多く、そのメカニズムについての解明が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、皮膚の炎症におけるリンパ管新生の程度および経時的なリンパ管の形態の変化を、皮膚接触過敏反応によって生じる接触皮膚炎モデルを用いて検討する。また、リンパ管新生を阻害したときの皮膚炎の変化を検討し、皮膚炎におけるリンパ管の機能解析を行う。

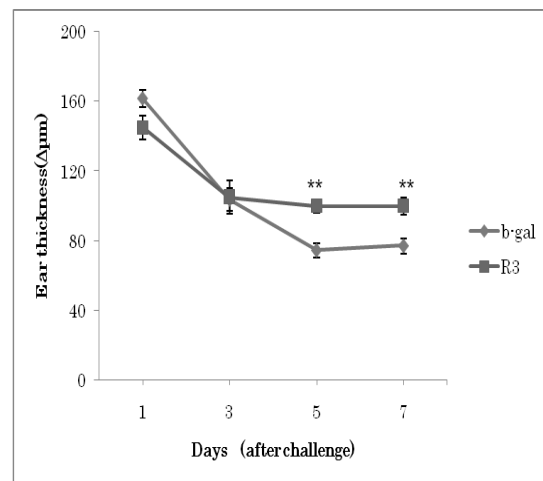
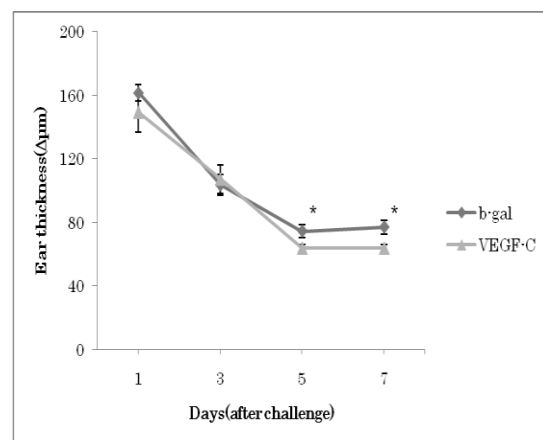
## 3. 研究の方法

(1) マウス耳介に trinitrochlorobenzene (TNCB) を塗布してアレルギー性接触皮膚炎モデルを作製し、2 週間刺激を加えて慢性炎症を生じた耳介組織を採取した。炎症部での経時的なリンパ管の形態変化をリンパ管の特異的マーカーである LYVE-1 での免疫染色と画像処理による定量評価により機能解析した。

(2) 同様に TNCB を塗布して接触過敏反応を誘導したマウスに、ヒト由来の VEGF-C および VEGFR3-Ig 融合蛋白を発現すべく組み込まれた Adeno-Associated Virus ベクターを尾静脈から静注してトランスジェニックマウスを作成した。TNCB による刺激を中止した後の経時的な耳介の厚さを測定、比較した。また組織を採取し、リンパ管特異的マーカーである LYVE-1 の免疫染色と画像処理による定量評価によりリンパ管の機能解析し、耳介腫脹との相関について検討した。加えて、マクロファージのマーカーである抗 CD11b 抗体での免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

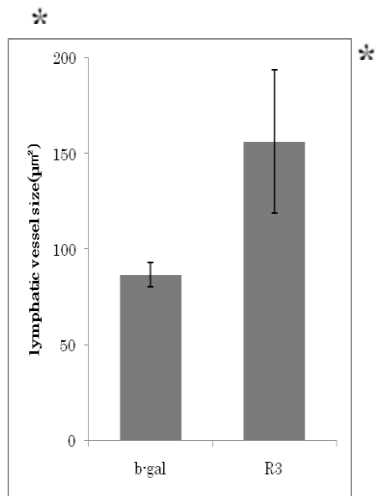
(1) TNCB 塗布にてアレルギー性接触皮膚炎による慢性炎症を生じた耳介組織を採取した。経時的な耳介組織でのリンパ管の形態変化を、LYVE-1 での免疫染色と画像処理により解析したところ、組織でのリンパ管の数は変化しなかったが、リンパ管の拡張が認められた。耳介の腫脹の軽減と共に、リンパ管のサイズも 10 日後に control と同程度まで縮小した。(2) 次に、VEGF-C および VEGFR3-Ig 融合蛋白のトランスジェニックマウスを作成し、同様に慢性炎症での耳介組織の変化を観察した。VEGF-C の遺伝子導入により、耳介腫脹は早期に軽減がみとめられた。また、VEGFR-3 を阻害することで、炎症反応の軽減が遅延した。(図 1)



(図 1 ear thickness)

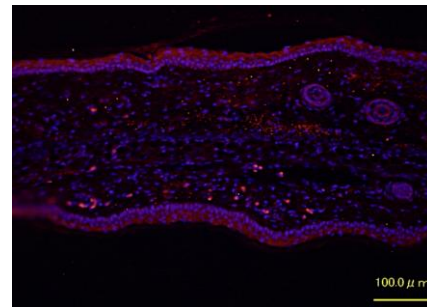
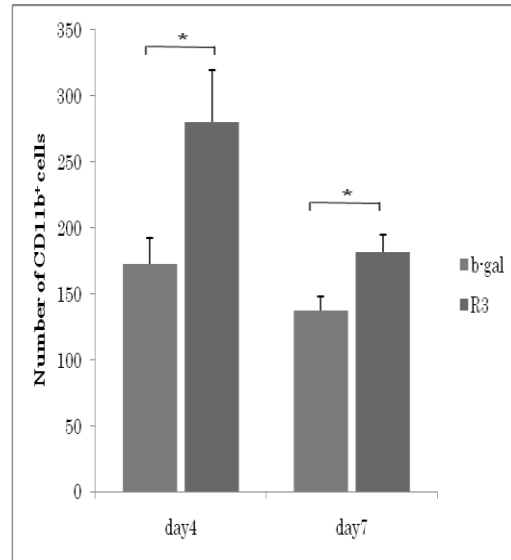
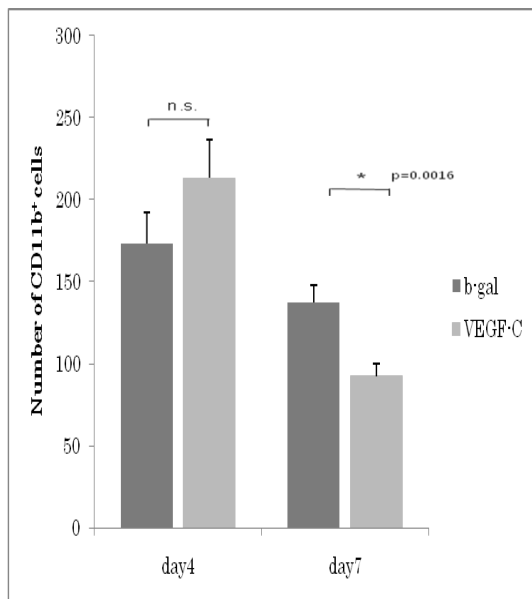
また、組織でのリンパ管の形態変化を LYVE-1 での免疫染色を行い画像処理にて評価した。両者共にリンパ管の数は control と比較して有意な差はみられなかった。また、リンパ管のサイズは、VEGF-C トランスジェニックマウスと control では有意な差はみとめなかったが、VEGFR-3-IgG 融合蛋白発現群で

は day7 でもリンパ管の拡張が持続していた。  
(図 2 )

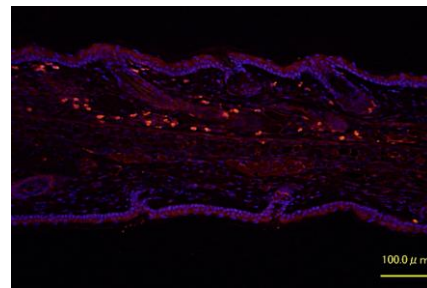


(図 2 lymphatic vessel size )

次にマクロファージのマーカである抗 CD11b 抗体での免疫染色を行ったところ、VEGF-C 発現群では control と比較して day7 での CD11b 陽性マクロファージ数の有意な減少をみとめた。一方 VEGFR-3-IgG 融合蛋白発現群では control よりもマクロファージ数の軽減が遅延していた。(図 3 )



(a: control)



(b: anti-VEGFR-3)

図 3 number of CD11b<sup>+</sup> cells  
(a and b) Immunofluorescence stains for CD11b in red at day7 after elicitation.

以上の結果から、VEGFR-3 を介した VEGF-C によるリンパ管への作用が、皮膚における慢性炎症の修復に関与していることが示唆された。リンパ管数の変化が明らかではなかったが、炎症細胞であるマクロファージ数の変化から、VEGF-C はリンパ管新生のみならず、既存のリンパ管による炎症細胞や血管から漏出した浸出液の回収などのリンパ管機能の活性化を介して、炎症の修復を促している可能性が考えられた。これらから、皮膚の慢性炎症において、VEGF-C—VEGFR-3 を介した

リンパ管機能の活性化促進が、アレルギー性皮膚炎を含め皮膚の慢性炎症に対する治療の新たな標的となる可能性がある。

#### 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 1 件)

浅井 純、森安麻美、皮膚遅延型接触過敏反応におけるリンパ管の機能解析、日本皮膚科学会、2008年4月19日、日本(京都)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森安 麻美 (MORIYASU ASAMI)

京都府立医科大学・附属病院・研究員

研究者番号：40433271