

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10695

研究課題名(和文) 外傷性脳損傷に対する髄膜リンパ管の役割

研究課題名(英文) Role of meningeal lymphatics for traumatic brain injury

研究代表者

島田 亮 (Shimada, Ryo)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10376725

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)：髄膜リンパ管は、脳脊髄液と脳の組織液を、頸部浅リンパ管と頸部深リンパ管を経由し、深前頸リンパ節に輸送している。外傷性脳損傷での髄膜リンパ管障害を捉えるため、マウスの外傷性脳損傷モデルを用い、脳損傷作成後に髄膜からセルソータで採取した髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子とタンパク発現の変化を解析した。

髄膜リンパ管内皮細胞数は損傷群がSham群と比べて有意に減少した。リンパ管内皮細胞に特異的に発現するLYVE1の髄膜リンパ管内皮細胞のmRNA発現量は損傷群が有意に減少した。一方、リンパ管新生にかかわるFLT4とNRP2の髄膜リンパ管内皮細胞のmRNAとタンパクの発現量は損傷群が有意に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

晩年のアルツハイマー病や認知症のリスクの増加は、若年時の中等度および重度の脳損傷に関連している。多くのヒトは早期の脳損傷の症状としては完全に回復したが、新たな認知症状は脳損傷後数十年で現れる。脳損傷時と晩年の間に多くの事象および暴露が脳損傷による障害と相互作用する可能性があるか、あるいは認知症のリスクに寄与する可能性がある。これらの要因に関する客観的な情報はほとんどない。本研究は若年外傷性脳損傷での髄膜リンパ管内皮細胞の障害と新生が確認され、髄膜リンパ管障害の病態への関与が示唆された。今後、髄膜リンパ管障害が晩年脳に及ぼす影響の解析を予定している。

研究成果の概要(英文)：The meningeal lymphatics (ML) transport cerebrospinal fluid and brain tissue fluid to the deep anterior cervical lymph nodes via the shallow and deep cervical lymphatics. To capture ML vessel damage in traumatic brain injury (TBI), we used a mouse model of TBI and analyzed changes in mRNA and protein expression in meningeal lymphatic endothelial cells (MLECs) collected by cell sorter from the meninges after creation of brain injury. The number of MLECs was significantly decreased in the injured group compared to the sham group. The mRNA expression of LYVE1, which is specifically expressed in LECs, in MLECs was significantly decreased in the injured group. On the other hand, mRNA and protein expression of FLT4 and NRP2, which are involved in lymphangiogenesis, in MLECs was significantly increased in the injured group. The results confirmed the impairment and neogenesis of MLECs in traumatic brain injury, suggesting their involvement in the pathogenesis of meningeal lymphangiopathy.

研究分野：法医学病理、脳神経外傷

キーワード：髄膜リンパ管内皮細胞 フローサイトメトリ セルソータ Microarray mRNA発現 ELISA タンパク発現

1. 研究開始当初の背景

髄膜リンパ機能の障害は、脳への巨大分子の血管内流入および間質液からの巨大分子の流出を遅らせ、マウスにおける認知障害を誘発すると最近報告されている。今までの研究で、細胞老化マーカーの老化関連酸性-ガラクトシダーゼを脳損傷マーカーとして、病理診断や法医学診断で有用と見いだされた。脳損傷歴のある者は認知症やアルツハイマー病が罹患しやすいと知られている。脳損傷と細胞老化を特徴とする晩年の認知症やアルツハイマー病と直接結びつきの限界がある。脳損傷がどのように細胞老化させたかのメカニズムはまだはっきりと分かっていない。ここで、脳損傷は髄膜リンパ機能に悪影響を与え、晩年の認知症やアルツハイマー病に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

髄膜リンパ管は脳脊髄液と脳の組織液を深前頸リンパ節に輸送している。外傷性脳損傷では、頭部に作用した外力が髄膜を介して脳を損傷するので、髄膜リンパ管障害の脳機能への影響が予想される。本研究では、外傷性脳損傷での髄膜リンパ管障害を捉えるため、マウスの外傷性脳損傷モデルを用い、受傷後の髄膜リンパ管内皮細胞をフローサイトメトリのセルソータで採集し、遺伝子とタンパク発現の変化を解析した。

3. 研究の方法

損傷群はマウスの頭蓋骨に骨窓を開け、髄膜の上から打撃を加えて大脳皮質に損傷を形成した。Sham 群は髄膜の損傷を最小限にするため、骨窓を開けず、骨窓と同大の頭蓋骨の外板と板間層をドリルで削り、内板を残し、上下可動化した骨片が髄膜に触れるものとした (Fig 1)。

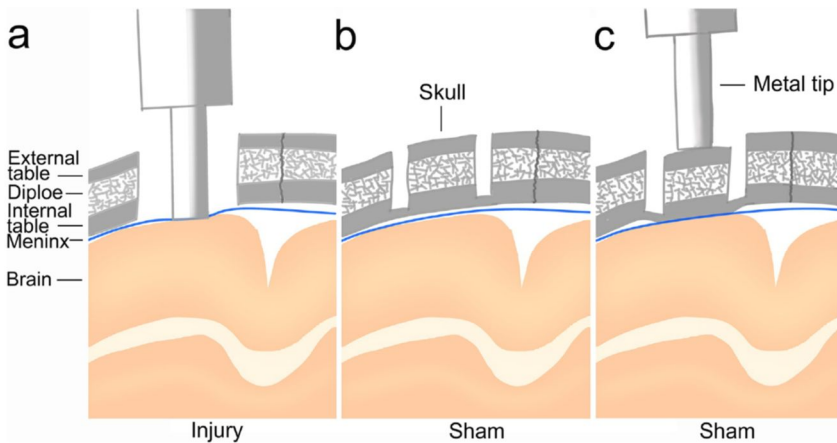


Fig 1. Surgery for the CCI mouse model. (a) In the injury group, the skull was removed, and a rounded metal tip was used to directly impact the brain. (b) For the sham group, resection of the external table and upper part of the internal table of the skull was performed using a drill. (c) The rounded metal tip was pushed into the bone flaps manually to transmit the pressure to the brain via the bone flaps in the sham group.

受傷後 3 日目の髄膜(硬膜、くも膜、軟膜)の細胞を分離し、CD45、CD31 及び podoplanin (PDPN) 抗体で標識し、フローサイトメトリのセルソータ機能を用いて髄膜リンパ管内皮細胞(CD45 陰性で CD31 と PDPN が陽性の細胞)を採取した (Fig 2)。

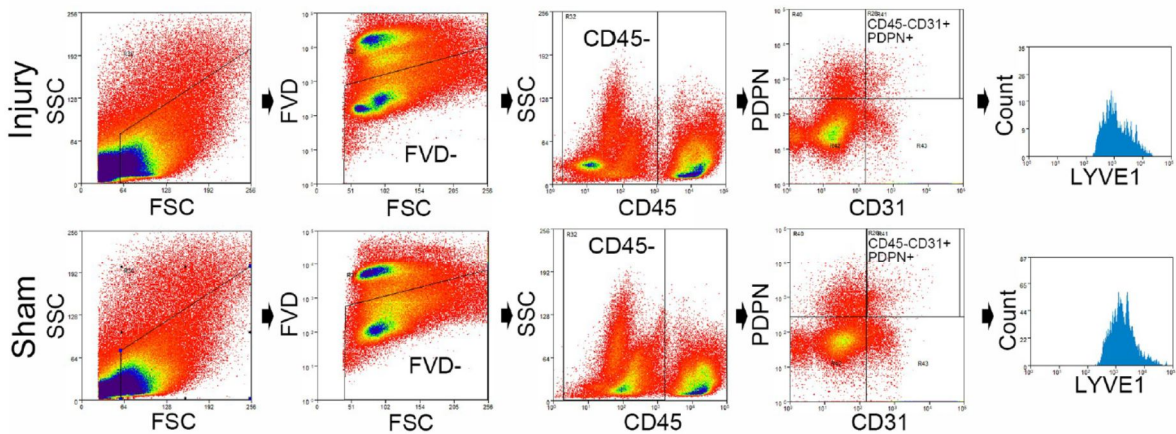


Fig 2. Isolation of meningeal lymphatic endothelial cells (LECs) via flow cytometry. Representative dot and contour plots showing the gating strategy used to isolate LECs via flow cytometry from the meninges of mice with traumatic brain injury and the sham mice. The cell count graph shows the number of cells, which were gated by CD45-CD31+PDPN+, labeled with the anti-LYVE1 antibody.

microarray、realtime PCR 及び ELISA を用い髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA とタンパクの発現解析を行った。

4. 研究成果

髄膜リンパ管内皮細胞数は損傷群が Sham 群と比べて有意に減少した (Fig 3)。

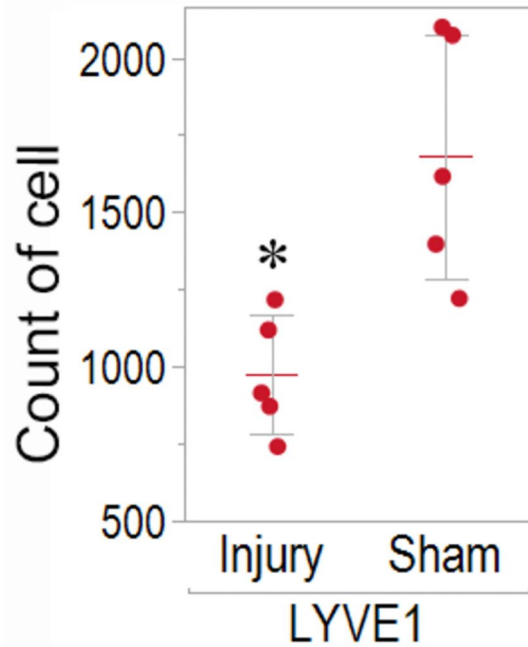


Fig 3. Count of viable LYVE1 positive meningeal lymphatic endothelial cells (LECs) via flow cytometry. The count of viable, CD45-CD31-PDPN+ LYVE1 positive meningeal LECs was compared between the injury and sham groups 3 days after injury via flow cytometry. (* $p < 0.0122$ between the injury and sham groups, $n = 5$ for each group).

リンパ管内皮細胞に特異的に発現する lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 の髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現量は損傷群が Sham 群と比べて有意に減少した。一方、リンパ管新生にかかわる FMS-like tyrosine kinase 4 と neuropilin 2 の髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA とタンパクの発現量は損傷群が Sham 群と比べて有意に増加した (Fig 8、9)。

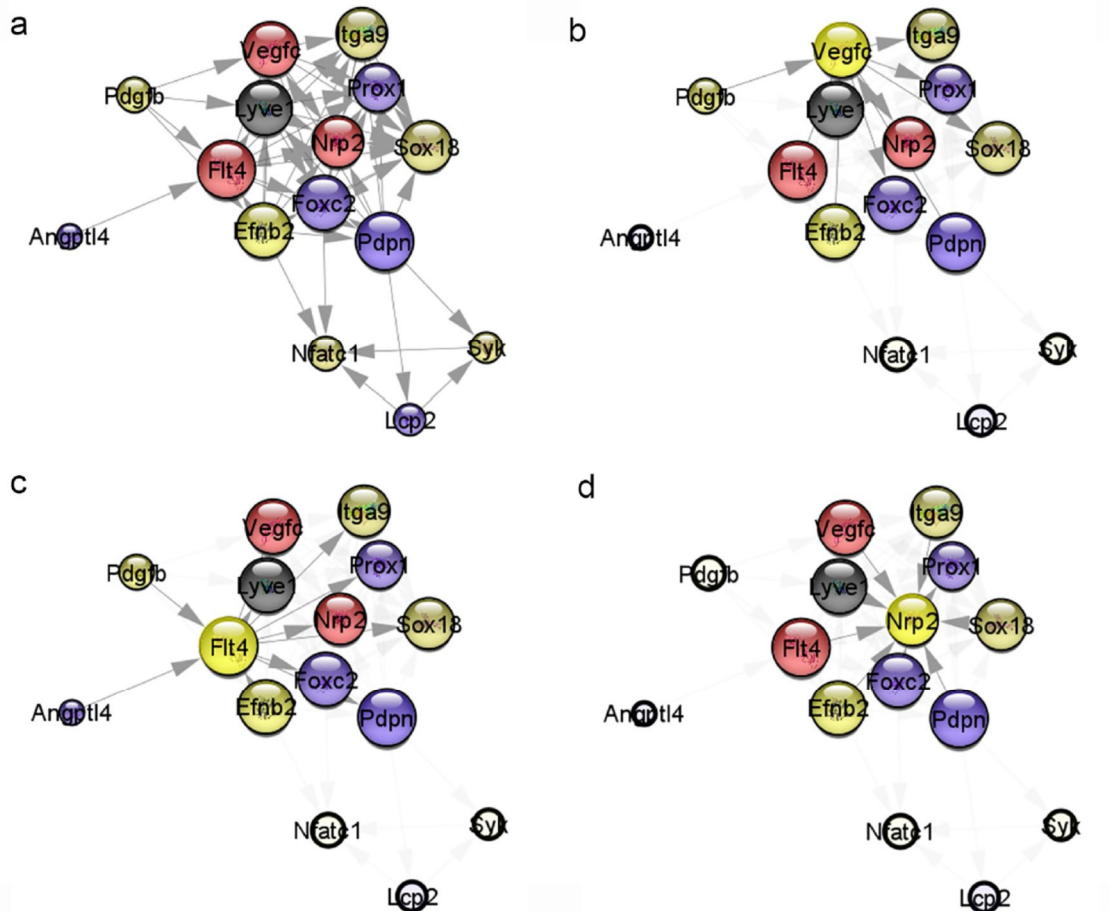


Fig 8. Lymphangiogenesis pathway gene of the protein-protein interaction (PPI) network obtained using Cytoscape with the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) plug-in. (a) The PPI network for all lymphangiogenesis pathway genes is shown. The PPI network of genes regulating or regulated by (b) *Vegfc*, (c) *Flt4*, and (d) *Nrp2*. Near red color indicates upregulation, and near black color indicates downregulation; the larger the circle, the larger the value of interaction degree. ($n = 3$ for each group).

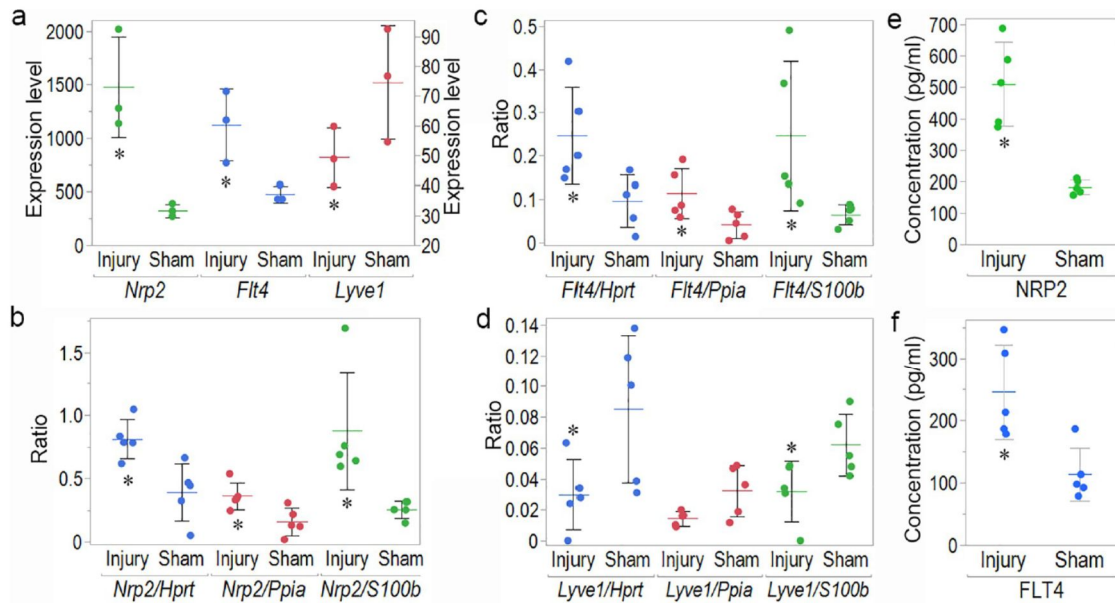


Fig 9. Microarray, RT-PCR and ELISA data for meningeal LECs from mice with injury and sham mice 3 days after injury. (a) The mRNA expression levels of *Nrp2* (left Y-axis), *Flt4* (right Y-axis), and *Lyve1* (right Y-axis) were determined using microarrays. The mRNA expression levels of (b) *Nrp2*, (c) *Flt4*, and (d) *Lyve1* were normalized to those of that of *Hprt*, *Ppia*, and *S100b* using RT-PCR. The protein expression levels of (e) NRP2 and (f) FLT4 in meningeal LECs, as determined using ELISA, were compared between the injury group and the sham group 3 days after injury. (* $p < 0.05$ between injury and sham group, $n = 3$ for each group, as assessed using microarrays, $n = 5$ for each group, as assessed using RT-PCR and ELISA).

外傷性脳損傷での髄膜リンパ管内皮細胞の障害と新生が確認され、髄膜リンパ管障害の病態への関与が示唆された。今回は脳損傷後の髄膜リンパ管内皮細胞の解析であり、今後、髄膜リンパ管障害が脳に及ぼす影響を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada Ryo, Tatara Yuki, Kibayashi Kazuhiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Gene expression in meningeal lymphatic endothelial cells following traumatic brain injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273892	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島田 亮
2. 発表標題 外傷性脳損傷モデルマウスにおける髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子発現変化
3. 学会等名 第90回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田 亮
2. 発表標題 Changes in gene expression in meningeal lymphatic vessels in mice with traumatic brain injury
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田 亮
2. 発表標題 マウス外傷性脳損傷後の髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子とタンパクの発現解析
3. 学会等名 第46回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田 亮
2. 発表標題 外傷性脳損傷に伴う髄膜リンパ管内皮細胞の障害と新生
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023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
---------	---------