

令和 4 年 4 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16297

研究課題名(和文) 神経 免疫相互作用による炎症時のリンパ管新生制御機構

研究課題名(英文) Inflammation-associated lymphangiogenesis through neuro-immune interaction

研究代表者

松田 弘美 (MATSUDA, HIROMI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00525743

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)：リンパ管は生体内の組織液維持や免疫応答などの生理的な役割を果たし、炎症時にはリンパ管が増殖新生する。私たちは、知覚神経から遊離されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が免疫細胞に発現するCGRP受容体のサブユニットである、受容体活性調節蛋白1(RAMP1)に作用してリンパ管新生を促進することを見いだした。すなわち、LPS投与により誘導されたマウス腹膜炎において、横隔膜にRAMP1シグナルに依存してマクロファージやT細胞からリンパ管新生因子を産生して新生リンパ管が形成された。この結果から、RAMP1シグナルによるリンパ管新生を標的とした炎症制御の治療の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では炎症刺激により知覚神経から放出されるCGRPが免疫細胞にあるRAMP1受容体を介してリンパ管の可塑性を制御することを明らかにした。知覚神経系と免疫系との分子レベルでのクロストークがリンパ管新生に関与し、炎症を制御するという新原理を提案できた。この解明により、RAMP1シグナルによる横隔膜リンパ管新生増強作用を介した炎症制御の応用につながる。また他の炎症モデルでも検証を加え、リンパ管可塑性制御が炎症制御となりうるか、炎症による誘導リンパ管新生に対して神経ペプチドシグナル伝達経路を標的とする新しい治療戦略に発展する可能性を探る基盤研究を進めることになる。

研究成果の概要(英文)：Lymphatic vessels play a physiological role in the maintenance of fluids and immune responses. During inflammation, newly formatted lymphatic vessels are appeared. Herein, we found that calcitonin gene-related peptide (CGRP), which is released from the sensory nervous system, promoted lymphangiogenesis via receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), a subunit of the CGRP receptor. During LPS-induced peritonitis in mice, macrophages and T cells produced pro-lymphatic vascular growth factors to form the new lymphatic vessels in the diaphragm in a RAMP1 dependent manner. These results suggest that RAMP1 signaling is a target of therapy for inflammation via lymphangiogenesis.

研究分野：免疫

キーワード：リンパ管新生 炎症

1. 研究開始当初の背景

神経系と免疫系の相互作用によるリンパ管新生の可能性

リンパ管は体液循環の維持や免疫担当細胞の動員などに関わる。炎症時には構造や機能変化をさせて、増殖新生し、いわゆる可塑性を示す。この新生リンパ管については炎症を促進させるのか、あるいは抑制させるのか、その病理生理学的意義は十分明らかでない。また集積免疫細胞がリンパ管新生に寄与するが、その制御機構は理解されていない。一方、神経系は免疫系を調節するが、その分子基盤については未解明である。最近、交感神経が免疫細胞のアドレナリン受容体に作用し炎症反応を制御することが報告された。神経系から遊離される神経伝達物質に対する受容体が免疫細胞に存在することが見いだされ、分子レベルにおける神経系と免疫系とのクロストークが注目されている。

私たちは LPS(Lipopolysaccharide)腹腔内反復投与による腹膜炎マウスを作成し、横隔膜リンパ管新生には浸潤した免疫細胞が関与していることを報告した(Life Sci 2015)。また細胞外環境を感知し知覚神経終末から遊離される神経ペプチドである CGRP (Calcitonin gene-related peptide) は RAMP1 (Receptor activity modifying protein 1) と CLR(calcitonin receptor-like receptor)のヘテロダイマーで構成されるが、マクロファージに発現する RAMP1 受容体に作用して創傷治癒過程におけるリンパ管新生に関与することを見いだした(Faseb J 2014)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスの腹腔内に炎症惹起物質 LPS を投与し、腹膜炎マウスを作成し、腹腔内の間質液の排液に重要とされる横隔膜上のリンパ管に着目し、このリンパ管新生における CGRP/RAMP1 シグナルの役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験動物には 8 週令の雄性 RAMP1 欠損マウス(RAMP1^{-/-})および野生型マウス(WT)を用いた。腹腔内に大腸菌由来の LPS(Lipopolysaccharide)を投与して腹膜炎モデルを作成した。横隔膜を採取し、リンパ管ならびに集積細胞を免疫染色や PCR などで比較検討した。また培養骨髄細胞や脾臓リンパ球を用いて、リンパ管新生因子が RAMP1 シグナルに依存して産生されるかを検討した。骨髄由来マクロファージのリンパ管新生への関与を調べるために骨髄移植実験をおこなった。さらにリンパ管ドレナージ機能を、腹腔内に投与した FITC-デキストランの蛍光強度を測定することにより評価した。

4. 研究成果

1) RAMP1 シグナルのリンパ管新生における役割解明

LPS 投与により WT では経時的に横隔膜リンパ管新生を認めた(図 1)。一方、RAMP1^{-/-}ではリンパ管新生は抑制された(図 2)。また横隔膜組織におけるリンパ管内皮マーカー発現やリンパ管新生因子(VEGF-C, VEGF-D)発現が抑制された。

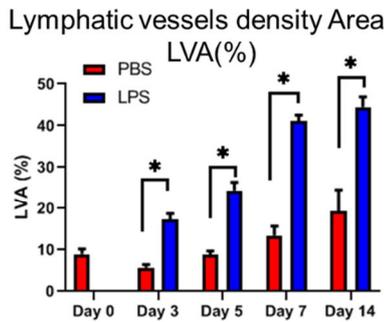


図1. LPS投与により経時的に横隔膜にリンパ管が新生した

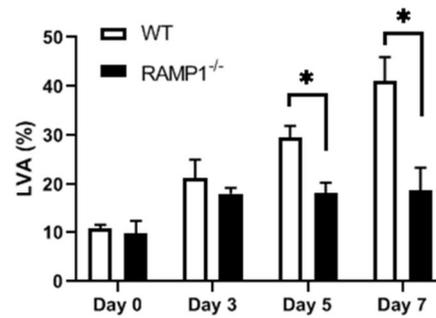


図2. WTに比較してRAMP1^{-/-}でリンパ管新生は抑制された

RAMP1 シグナルが横隔膜リンパ管新生に関与することが分かったため、RAMP1 発現をさらに解析した。RAMP1 はリンパ管内皮ではなく CD 4 陽性細胞である T cells と CD 1 1 b 陽性細胞である macrophages 上には RAMP1 が発現しており、CGRP/ RAMP1 シグナルが新生リンパ管に直接作用しているのではなく、免疫細胞を介して作用していることが示唆された。

2) 集積 T 細胞の関与

T 細胞ならびにマクロファージが横隔膜リンパ管新生に関与するものと考え、集積細胞数をカウントした。まずは T 細胞に注目し、CD 4 陽性細胞数 (T 細胞) をカウントすると RAMP1^{-/-} の CD4⁺ 細胞数が WT より減少した (図 3)。二重免疫染色で T 細胞はリンパ管新生因子 VEGF-C、VEGF-D と共陽性となり、CD4⁺ 細胞の VEGF-C、VEGF-D 発の陽性率はそれぞれ約 70%、90% であった。抗 CD4 中和抗体で T 細胞を除去するとリンパ管新生やリンパ管新生因子は抑制された。In vitro では脾臓由来 T 細胞によるリンパ管新生因子は RAMP-1 依存して増強した。以上の結果から腹腔内に LPS を投与すると炎症などの侵害刺激を受けて知覚神経の末端より CGRP が放され、T 細胞にある RAMP1 に結合し、VEGF-C、VEGF-D を分泌してリンパ管新生が生じる可能性が示唆された。

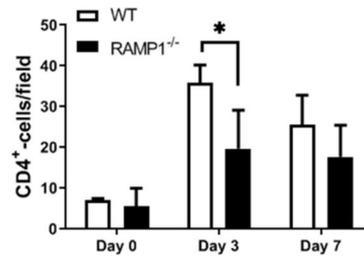


図3. 横隔膜に集積するCD4陽性細胞はRAMP1^{-/-}で減少した。

3) 集積マクロファージの関与

ついで、マクロファージのリンパ管新生への関与を検討した。CD 1 1 b 陽性細胞数は驚いたことに、WT よりも RAMP1^{-/-} の方が増加した (図 4)。ケモカインの発現量を測定すると RAMP1^{-/-} で CCL 2、CCL 5 の発現が増加していたことから、RAMP1 シグナルがケモカインの放出を減少させることが示唆された。横隔膜組織と骨髓培養マクロファージでのマクロファージの表現形式を調べると、RAMP1^{-/-} では炎症性マクロファージ関連遺伝子 TNFα の発現が増加し、

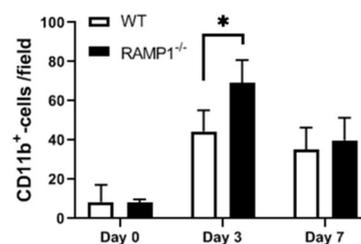


図4. 横隔膜に集積するCD11b陽性細胞はRAMP1^{-/-}で増加した。

以上をまとめると、RAMP1 シグナルが横隔膜リンパ管新生に関与することが示唆された。RAMP1 はリンパ管内皮ではなく CD 4 陽性細胞である T cells と CD 1 1 b 陽性細胞である macrophages 上に発現しており、CGRP/ RAMP1 シグナルが新生リンパ管に直接作用しているのではなく、免疫細胞を介して作用していることが示唆された。

修復性マクロファージ関連遺伝子 MR は低下していた。このことから RAMP1 シグナルによって炎症性マクロファージの誘導が減少し、修復性マクロファージを誘導する可能性が示された。また、二重免疫染色解析でマクロファージは VEGF-C、VEGF-D と共陽性であった。培養骨髄細胞は RAMP1 シグナルに依存して VEGF-C、VEGF-D を産生した。WT のマクロファージをクロドロン酸で除去すると、横隔膜リンパ管新生は抑制された。さらに骨髄キメラマウスを作成すると、RAMP1 シグナルを発現する骨髄由来マクロファージが横隔膜に集積してリンパ管新生を促進することが分かった。以上より、腹腔内に L P S を投与すると炎症などの侵害刺激を受けて知覚神経の末端より C G R P が放出され、骨髄からリクルートされた主に修復性マクロファージにある RAMP1 に結合し、リンパ管新生因子 V E G F - C を介してリンパ管新生が増強することが示唆された。

4) リンパ管ドレナージ機能評価

横隔膜新生リンパ管機能を腹水ドレナージ機能の観点から検討した。FITC-dextran を腹腔内に投与後、腹腔内洗浄液と胸腔内の縦隔リンパ節を回収し、FITC 蛍光強度を測定した。WT では LPS 投与は PBS 投与と比較して残存 FITC-dextran の蛍光強度は低下したが、RAMP1^{-/-} では差がなかった。このことから腹腔間質液のリンパ管ドレナージは、RAMP1^{-/-} では障害されることが示唆された。さらに横隔膜のリンパ液は縦隔リンパ節に注ぐため、右縦隔リンパ節を採取し FITC-dextran の蛍光強度を測定した。LPS 投与した WT から採取した右縦隔リンパ節の蛍光強度は PBS 投与と比較して高く、RAMP1^{-/-} から採取したものでは差はなかった。これらの結果から RAMP1 シグナルは腹膜炎時の横隔膜のリンパ管のドレナージ機能を改善することが示された。

【結論】

結論：腹膜炎モデルにおいて、知覚神経末端から放出される神経ペプチド CGRP が免疫細胞の RAMP1 受容体に作用してリンパ管新生を促進し、炎症調節に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuda H, Ito Y, Hosono K, Tsuru S, Inoue T, Nakamoto S, Kurashige C, Hirashima M, Narumiya S, Okamoto H, Majima M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Roles of Thromboxane Receptor Signaling in Enhancement of Lipopolysaccharide-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Drainage Function in Diaphragm.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol.	6. 最初と最後の頁 1390-1407.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.120.315507.	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 Tsuru Seri, Ito Yoshiya, Matsuda Hiromi, Hosono Kanako, Inoue Tomoyoshi, Nakamoto Shuji, Kurashige Chie, Mishima Toshiaki, Tsujikawa Kazutake, Okamoto Hirotugu, Majima Masataka	4. 巻 100
2. 論文標題 RAMP1 signaling in immune cells regulates inflammation-associated lymphangiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	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 山下 敦、鈴木 将嗣、安藤 寿恵、松田 弘美、杉村 憲亮、戸田 雅也、岡本 浩嗣	4. 巻 24
2. 論文標題 経カテーテル的大動脈弁置換術（TAVR）術後に非心臓手術を施行された5例の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Anesthesia	6. 最初と最後の頁 55 ~ 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11478/jscva.2020-2-001	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 細野加奈子、伊藤義也、松田弘美、津留世里、畑中公、馬嶋正隆、成宮周、天野英樹
2. 発表標題 LPS誘発性腹膜炎マウスの横隔膜リンパ管新生、リンパドレナージ機能におけるトロンボキサン受容体シグナルの役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津留 世里、伊藤 義也、松田 弘美、細野 加奈子、岡本 浩嗣、馬嶋 正隆
2. 発表標題 免疫細胞のTPシグナルは腹膜炎時の横隔膜リンパ管新生を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津留世里, 伊藤義也, 細野加奈子, 井上智仁, 松田弘美, 蔵重千絵, 中本修司, 大高史聖, 岡本浩嗣, 馬嶋正隆
2. 発表標題 腹膜炎時の横隔膜リンパ管新生を制御する受容体活性調節蛋白1 (RAMP1) の役割
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津留 世里、伊藤 義也、松田 弘美、細野 加奈子、岡本 浩嗣、馬嶋 正隆
2. 発表標題 免疫細胞のTPシグナルは腹膜炎時の横隔膜リンパ管新生を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------