

令和 3 年 4 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18704

研究課題名(和文) 子宮内膜症におけるリンパ管新生を制御するVEGFR1シグナルの役割

研究課題名(英文) Role of VEGFR1 signaling in lymphangiogenesis during endometriosis

研究代表者

関口 和企 (Sekiguchi, Kazuki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90458810

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)：子宮内膜症進展には血管新生以外にもリンパ管新生が関与する可能性をマウス異所性子宮内膜症モデルで調べた。リンパ管新生因子の受容体であるリンパ管内皮受容体VEGFR3を阻害すると、子宮内膜移植片組織内のリンパ管新生とともに移植片の成長も抑制された。血管内皮増殖因子1型受容体(VEGFR1)欠損マウスを用いて検討すると、リンパ管新生、リンパ管新生因子、リンパ管内皮マーカーなどともに移植片成長も抑制された。リンパ管新生は子宮内膜移植片に集積するマクロファージや線維芽細胞がVEGFR1に依存して産生するリンパ管新生因子によるものと分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖年齢の女性のQOLを損なう子宮内膜症には有効な治療法が望まれている。本研究によって、子宮内膜病変の間質に集積するマクロファージや線維芽細胞がリンパ管新生を増強することで子宮内膜症進展を促進することを明らかにした。これまでリンパ管新生の子宮内膜症における役割は不明であったことから、ひとつのメカニズムを解明できたものと考えられる。今後、子宮内膜症への治療的応用につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined whether lymphangiogenesis as well as angiogenesis contributes to the development of endometriosis using ectopic endometriosis model in mice. Inhibition with VEGFR3 signaling suppressed lymphatic vessel density and the size of endometriotic implants. In VEGFR1 deficient mice, lymphangiogenesis as indicated by lymphatic vessel density, lymphatic growth factors, and lymphatic endothelial markers were decreased as compared with those in wild-type mice. Lymphatic growth factors secreted from accumulated macrophages and fibroblasts in the endometrial implants were involved in the progression of endometriosis in a VEGFR1 signaling dependent manner.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 リンパ管

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の原因には骨盤内の炎症、局所の免疫異常やエストロゲン産生などが示唆されるが、十分には理解されていない。子宮内膜症は異所性に内膜組織が増殖するため、血管新生だけでなくリンパ管新生が関与している可能性がある。実際、子宮内膜症において、リンパ管新生やリンパ管新生因子発現が増強しているという臨床報告が散見される。しかし、子宮内膜症におけるリンパ管新生の役割は未解明である。

申請者らはマウス異所性子宮内膜症モデルを作成し、宿主由来のマクロファージが内膜移植片に集積して、血管内皮増殖因子 (VEGF-A) を産生し血管新生増強作用により子宮内膜症に関与することを報告した。さらに VEGF-A の受容体である VEGF1 型受容体 (VEGFR1) を発現するマクロファージが宿主の骨髄から内膜移植片に集積して子宮内膜症に関わっていることを見いだした。

一方、申請者らは腫瘍増殖や炎症などの病態時において、組織間質に集積するマクロファージや線維芽細胞などの間質細胞がリンパ管新生を増強することを報告してきた。このときにも、(VEGFR1) を発現するマクロファージがリンパ管新生因子を産生してリンパ管新生に関わる可能性を見いだした。また、リンパ管新生 (既存の血管からの新しいリンパ管の成長) が子宮内膜症病変で起こること、また VEGF-C および VEGF-D を含むリンパ管新生増強因子発現が腹膜病変で増加していることが臨床報告されている。これらの知見は、新生リンパ管が子宮外性子宮内膜症の病態に関与している可能性を示唆しているが、リンパ管新生が子宮内膜症病変の成立と進行に寄与するメカニズムはまだ完全には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では子宮内膜症進展に果たすリンパ管新生の役割と、リンパ管新生制御に VEGFR1 シグナルが関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物には 9 週令の雌性 VEGFR1 TK 欠損マウス (TK-/-) マウスおよび野生型 C57BL/6 (WT) マウスを用いた。宿主の両側卵巣を摘出 1 週間後、ドナーマウスの子宮片を宿主マウスの両側腹膜壁に移植して異所性子宮内膜症モデルを作成した (ドナー宿主)。宿主には卵巣摘出後から 1 週間ごとにエストラジオールジプロピオン酸塩を投与した。

移植後 0 日目、7 日目、14 日目、および 21 日目に麻酔下で移植内膜組織を摘出し、移植片面積を評価した。移植片内リンパ管の発達や集積免疫細胞数を免疫組織学的に評価し、また移植片の遺伝子発現量を real time PCR 法を用いて測定した。

培養骨髄由来マクロファージ、および線維芽細胞 (L929 細胞株) を用いてリンパ管新生増強因子産生について検討した。リンパ管ドレナージ機能は移植片内に投与した蛍光色素 FITC デキストランの蛍光強度を測定して評価した。

4. 研究成果

リンパ管新生の子宮内膜症進展に果たす役割

WT-WT マウスの移植片の大きさは移植後 14 日目に最大となった。移植片を抗 LYVE-1 抗体で染色し、リンパ管密度 (LVD) とリンパ管面積 (LVA%) を計測すると、14 日目にピークを迎えた。また LYVE-1 および VEGFR3 発現レベルは、子宮内膜移植後に増加し、14 日目および 21 日目に最大に達した。これらの結果に基づき、その後の実験では移植後 14 日目のリンパ管新生を評価した。

WT-WT マウスに VEGFR3 キナーゼ阻害剤である MAZ51 を投与すると、移植片サイズは減少し、LVD と LVA% が減少した。また LYVE-1 および Prox-1 mRNA 発現も減少した。このとき、血管新生に関するマーカーには変化がなかった。これらの結果から、VEGFR3 シグナルを介したリンパ管新生が子宮内膜移植片の成長に寄与していることが示唆された。

VEGFR1 シグナルの子宮内膜症進展とリンパ管新生に果たす役割

移植後 14 日目の移植片面積 (図 1) およびリンパ管新生 (LVD、LVA%) (図 2) は WT-WT マウスでは 0 日目に比べて有意に大きくなったが、TK-/- TK-/- マウスでは変化は見られなかった。リンパ管内皮マーカーである LYVE-1、Prox-1 および VEGFR3 の mRNA 発現は WT

WT マウスでは 14 日目に 0 日目よりも高かったが、

TK-/- TK-/- マウスではこれらの増加が有意に抑制された。また VEGFR1、VEGF-A の mRNA についても同様であった。これらの結果よりリンパ管新生は VEGFR1 シグナルに依存して誘導されることが示唆された。また移植

片の免疫二重染色では VEGFR1 は LYVE-1 とは共染しなかった。このことから、VEGFR1 シグナル伝達はリンパ管内皮に直接作用してリンパ管内皮を増殖させてリンパ管新生を増強するのではないことを示している。

リンパ管新生におけるマクロファージと線維芽細胞の役割

リンパ管新生増強因子 VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現量は、WT-WT マウスでは移植後 14 日目に 0 日目よりも高かったが、TK-/- TK-/- マウスではその増加が抑制された。VEGF-C と VEGF-D は免疫二重染色で CD11b+細胞 (マクロファージ)、S100A4+細胞 (線維芽細胞) 両者に発現した。これらの結果から、VEGFR1 シグナル伝達はマクロファージおよび線維芽細胞から VEGF-C および VEGF-D を産生して移植片のリンパ管形成に関与することが示唆された。

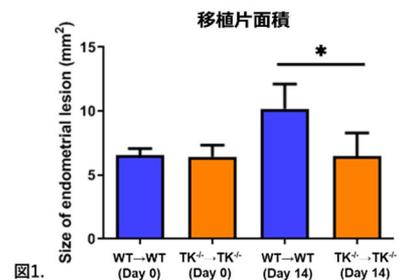


図1.

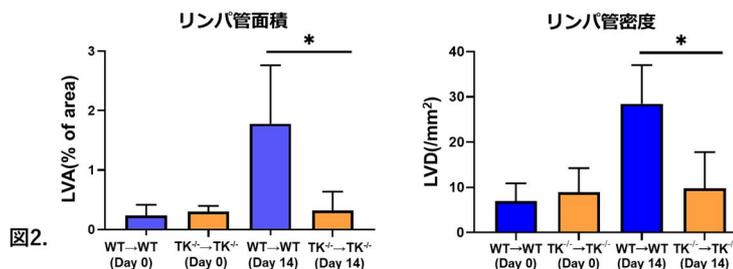


図2.

VEGFR1 シグナルの培養マクロファージおよび線維芽細胞におけるリンパ管新生因子産生作用

骨髄由来マクロファージと培養線維芽細胞を VEGFR1 の特異的アゴニストである PIGF で刺激し、VEGF-C と VEGF-D mRNA 発現レベルを調べた。PIGF は WT マクロファージにおいて VEGFR1 発現を誘導したが、TK-/-マクロファージにおいては誘導しなかった。PIGF

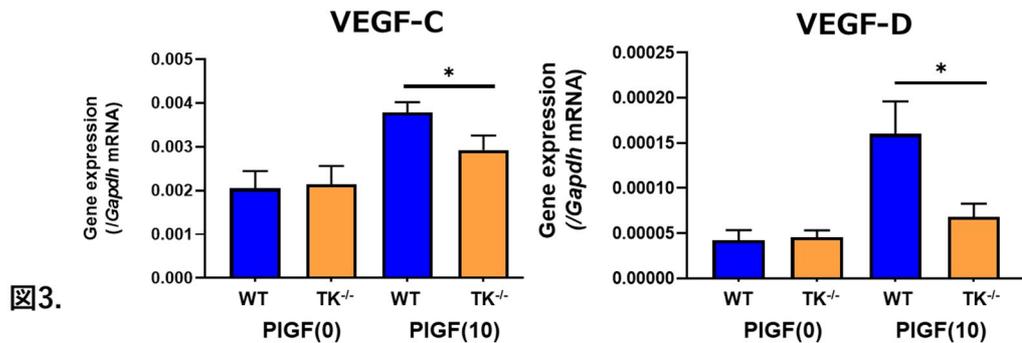


図3.

によって誘導された WT マクロファージにおける VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現レベルは、TK-/-マクロファージにおけるそれよりも有意に増加した (図3)。

また培養線維芽細胞 (L929 細胞) では、PIGF が VEGFR1、VEGF-C、VEGF-D の mRNA 発現レベルを上昇させ、VEGFR1 中和抗体で処理することでこれらの上昇は有意に抑制された。

子宮内膜移植片からのリンパドレナージ 機能

WT WT マウスと TK-/- TK-/-マウスの移植片におけるリンパ管のドレナージ機能を比較するために、一方の子宮内膜移植片に FITC デキストランを注入した。注入後 3 時間後に、注入したインプラントに対する同側の傍大動脈リンパ節を切除し、リンパ節内の残留 FITC デキストラン量を測定した。WT WT マウスの蛍光強度は TK-/- TK-/-マウスの蛍光強度よりも高かった。

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 Hattori Kyoko, Ito Yoshiya, Honda Masako, Sekiguchi Kazuki, Hosono Kanako, Shibuya Masabumi, Unno Nobuya, Majima Masataka	4. 巻 143
2. 論文標題 Lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling contributes to the progression of endometriosis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 255 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsh.2020.05.003	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 Honda Masako, Ito Yoshiya, Hattori Kyoko, Hosono Kanako, Sekiguchi Kazuki, Tsujikawa Kazutake, Unno Nobuya, Majima Masataka	4. 巻 24
2. 論文標題 Inhibition of receptor activity-modifying protein 1 suppresses the development of endometriosis and the formation of blood and lymphatic vessels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 11984 ~ 11997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.15823	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 Sekiguchi K, Ito Y, Hattori K, Inoue T, Hosono K, Honda M, Numao A, Amano H, Shibuya M, Unno N, Majima M.	4. 巻 9
2. 論文標題 VEGF Receptor 1-Expressing Macrophages Recruited from Bone Marrow Enhances Angiogenesis in Endometrial Tissues.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43185-8	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服部 響子、伊藤 義也、本田 雅子、関口 和企、海野 信也、馬嶋 正隆
2. 発表標題 子宮内膜症におけるリンパ管新生を制御するVEGFR1の役割解明
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 本田雅子、関口和企、吉野修、恩田貴志、海野信也
2. 発表標題 子宮内膜症における血管・リンパ管新生を制御する神経ペプチドCGRPの役割
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部 響子, 伊藤 義也, 本田 雅子, 関口 和企, 細野加奈子, 海野 信也, 馬嶋 正隆
2. 発表標題 子宮内膜症におけるリンパ管新生を制御するVEGFR1の役割解明
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019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
---------	---------