

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17072

研究課題名(和文)臓器特異的リンパ管発生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the organ-specific lymphatic vessel development

研究代表者

丸山 和晃(Maruyama, Kazuaki)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90821984

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)：リンパ管内皮細胞は静脈内皮細胞からの出芽による単一起源に由来すると考えられてきた。申請者らは、心臓リンパ管の独自起源や発生を制御するシグナルが存在する事を報告した(Maruyama et al., Dev bio, 2019, iScience, 2021)。つまり、心臓構成細胞である転写因子Islet1を発現する未分化中胚葉細胞の分化により心臓リンパ管の50-60%が形成される。さらに、申請者が同定した心臓リンパ管起源が、頭頸部筋肉・心筋の起源として近年同定された心臓咽頭中胚葉(CPM)であるという事を明らかにした(Maruyama et al., eLife, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により尾索動物以降に存在するとされるCPMが脈管形成へも広く寄与することが明らかとなった。さらに、難治性疾患であるヒト脈管奇形は頭頸部に多く生じることが知られていたが、体幹部と頭頸部で細胞起源が異なることが明らかとなったことで、脈管奇形の好発部位の説明が可能となる可能性がある。今後ヒト遺伝子変異を導入したマウスモデルを作成し、ヒト疾患のモデルマウス作成へと研究を深化させていきたいと考える。

研究成果の概要(英文)：Lymphatic endothelial cells were once believed to originate solely through sprouting from venous endothelial cells. However, recent research has revealed that 50-60% of cardiac lymphatic vessels actually form through the differentiation of undifferentiated mesoderm cells(Dev Biol, 2019; iScience, 2021). These cells express the transcription factor Islet1, a key component of cardiac development. The origin of these cardiac lymphatic vessels has now been identified as the cardiac pharyngeal mesoderm (CPM). This region was later distinguished as the source of head and neck muscles as well as myocardium (Maruyama et al., eLife, 2022).

研究分野：リンパ学

キーワード：リンパ管 血管 心臓 発生学 ヒト疾患 心臓・血管病理 疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ管内皮細胞 (Lymphatic Endothelial Cells: LECs) は静脈内皮の分化転換によってのみ生じると長く考えられてきた。すなわち総主静脈に転写因子 **Prospero Homeobox 1 (Prox1)** が発現する事で静脈内皮細胞の一部が LECs に分化し、全身へ分布する事でリンパ管が形成されるとされてきた。近年、新規リンパ管マーカーの同定や遺伝的細胞系譜解析により、静脈由来ではない臓器ごとに特色ある LECs の由来が報告されている。申請者らは、心臓リンパ管の 30% 程度が静脈から生じるのではなく転写因子 Islet1 (Isl1) を発現する鰓弓内の二次心臓予定領域細胞に由来する事を見出した(Maruyama et al., *Developmental Biology*, 2019)。本研究課題ではこれらの成果や手法を応用、発展させ、新たな臓器特異的 LECs の起源・発生過程の同定を試みる。本研究による成果はリンパ管発生に関して新たな知見をもたらし、リンパ管疾患の病態解明や治療開発の礎になると期待される。

## 2. 研究の目的

リンパ管は全身に分布するが、臓器ごとに特徴的な生理学的役割や解剖学的特徴を持つ。こうした機能・構造の差異を説明するには、従来の全身を対象としたリンパ管発生研究では十分では無く、個々の臓器に着目した解析が必要であると考えられる。これまで LECs は静脈内皮の分化転換により生じるとされてきたが、申請者は二次心臓予定領域細胞の心臓 LECs への寄与を明らかにしている。本研究では、この知見により導かれた問い、すなわち、未分化中胚葉系細胞の一次心臓予定領域や心外膜前駆組織などの心臓前駆細胞が LECs に寄与するのか、その分布、発生過程が静脈由来リンパ管とどのように異なり、いかに協調してリンパ管網を作り上げるのか。以上を明らかにする事で心臓前駆細胞が寄与する部位での独自のリンパ管形成機構を解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究ではマウス胚で Cre-LoxP システムを使用し、以下の実験を行う。

1)非静脈由来 LECs (Tie2-細胞系譜) の分布: *Tie2-Cre* マウスをレポーターマウス (R26ReYFP) と交配し、得られた胎仔より E9.5 から E17.5 の各ステージの切片作製を行う。eYFP、Prox1、内皮細胞マーカーである PECAM の抗体を用いて免疫組織染色を行い、eYFP<sup>+</sup>/PECAM<sup>+</sup>/Prox1<sup>+</sup> (静脈由来)、eYFP<sup>+</sup>/PECAM<sup>+</sup>/Prox1<sup>+</sup> (非静脈由来) LECs の心臓周囲での分布を明らかにする。また *Tie2-Cre* マウスを *Prox1-flox* マウスと交配させ、血管内皮細胞特異的に Prox1 をノックダウンする事で静脈由来リンパ管形成を阻害し、残存したリンパ管の分布領域が上記 eYFP<sup>+</sup>/PECAM<sup>+</sup>/Prox1<sup>+</sup> (非静脈由来) LECs の分布と整合性がある事を確認する。

2)心臓前駆細胞の LECs への寄与: 二次心臓予定領域 (*Isl1-Cre*)、一次心臓予定領域 (*Nkx2.5-Cre*)、中胚葉 (*Mesp1-Cre*)、心外膜前駆細胞・中皮細胞 (*WT1-Cre*) を標識する各マウスを R26ReYFP と交配し E9.5 から E17.5 の各ステージで切片作製と免疫組織染色を行い、eYFP<sup>+</sup>/PECAM<sup>+</sup>/Prox1<sup>+</sup> LECs の分布と eYFP<sup>+</sup>細胞の割合を明らかにする。この際、E10.5 から E11.5 での総主静脈内皮に eYFP<sup>+</sup>細胞が寄与しない事が確認できれば、その細胞系譜が非静脈由来の LECs である事が示さ

**れる。**この実験により心臓前駆細胞がどの発生段階で LECs への分化能を獲得するか明らかにする。また、LEC<sub>s</sub> への寄与が確認された Cre マウスを *Prox1*-flo<sub>x</sub> マウスと交配させ、リンパ管形成を阻害したマウス胚の切片作製とリンパ管マーカーの免疫組織染色を行い、心臓前駆細胞のリンパ管網形成への寄与を明らかにする。

3)リンパ管の時空間的発生解析: PECAM と *Prox1*、*VEGFR3*、*LYVE1* などのリンパ管マーカーを組み合わせ、E9.5 から E17.5 にかけて全胚切片・心臓ホール免疫組織染色を行い、リンパ管発生過程を時空間的に明らかにする。加えて、タモキシフェン依存的に内皮細胞を標識する *VE-cad-CreERT2* マウスを R26ReYFP と交配させ eYFP<sup>+</sup>/PECAM<sup>+</sup>/*Prox1*<sup>+</sup> LEC<sub>s</sub> の時期特異的な発生過程を明らかにする。静脈由来 LEC<sub>s</sub> は E9.5 にタモキシフェンを投与する事で標識されるが、非静脈由来リンパ管の発生段階を解析するために (2)、(3)前半の実験により推測された発生段階に準じて (具体的には E13.5, E14.5 を予想している) タモキシフェン投与を行い、静脈・非静脈由来リンパ管網形成過程を時空間的に明らかにする。

4)心臓前駆細胞由来リンパ管内皮細胞の他臓器リンパ管への寄与: 近年、二次心臓予定領域細胞が気管支・肺の中胚葉由来細胞の起源である事が明らかになった。また心外膜前駆組織は体腔を覆う中皮細胞の一部と考えられており *WT1*-Cre マウスは中皮細胞全般を標識する。*Mesp1*-Cre は中胚葉全般を標識するが、*WT1* の発現領域とは相反する。こうした報告を元に**心臓前駆細胞由来リンパ管の他臓器への分布**に関しても R26ReYFP マウスを用いて分析する。

5)心筋梗塞モデルを用いたリンパ管新生時の LEC<sub>s</sub> 供給源の探索: 心筋梗塞時のリンパ管新生は微小循環を調節し心機能維持に重要である事が知られているが、新生する LEC<sub>s</sub> の供給源は未知である。そこで心臓前駆細胞特異的 Cre マウスと R26ReYFP を掛け合わせた 2 ヶ月齢マウスで心筋梗塞モデルを作出し、心筋梗塞時の LEC<sub>s</sub> の供給源を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

リンパ管内皮細胞(lymphatic endothelial cells: LEC<sub>s</sub>)は静脈内皮細胞からの出芽(lymphangiogenesis)による単一起源に由来すると考えられてきたが、申請者らは、**心臓リンパ管の独自起源や発生を制御するシグナルが存在する事を報告した**(Maruyama et al., *Dev bio*, 2019, *iScience* , 2021)。さらに申請者が同定した心臓リンパ管の起源が、**頭頸部筋肉・心筋の起源**として近年同定された Cardiopharyngeal mesoderm (CPM)と同一のものであるという事を明らかにした (Maruyama et al. *m eLife*, 2022)。すなわち、頭頸部・縦隔・心臓では、**体幹部の静脈由来 LEC<sub>s</sub> とは起源が異なり**、転写因子 *Islet1* (*Isl1*)陽性の CPM が直接の分化転換(lymphvasculogenesis)により LEC<sub>s</sub> を産生し、リンパ管網が形成される事を報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Maruyama Kazuaki, Imanaka-Yoshida Kyoko   | 4. 巻<br>23                    |
| 2. 論文標題<br>The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress  | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>2617 ~ 2617     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms23052617  | 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>-                     |
| 1. 著者名<br>Maruyama Kazuaki, Naemura Kazuaki, Yoshihara Kenji, Imanaka-Yoshida Kyoko, Kurihara Hiroki, Miyagawa-Tomita Sachiko   | 4. 巻<br>2                     |
| 2. 論文標題<br>Surgical protocol for permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice to generate a model of myocardial infarction  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>STAR Protocols  | 6. 最初と最後の頁<br>100775 ~ 100775 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.xpro.2021.100775  | 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>-                     |
| 1. 著者名<br>Maruyama Kazuaki, Naemura Kazuaki, Arima Yuichiro, Uchijima Yasunobu, Nagao Hiroaki, Yoshihara Kenji, Singh Manvendra K., Uemura Akiyoshi, Matsuzaki Fumio, Yoshida Yutaka, Kurihara Yukiko, Miyagawa-Tomita Sachiko, Kurihara Hiroki | 4. 巻<br>24                    |
| 2. 論文標題<br>Semaphorin3E-PlaxinD1 signaling in coronary artery and lymphatic vessel development with clinical implications in myocardial recovery  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>iScience  | 6. 最初と最後の頁<br>102305 ~ 102305 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2021.102305  | 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>-                     |
| 1. 著者名<br>Maruyama Kazuaki, Naemura Kazuaki, Arima Yuichiro, Uchijima Yasunobu, Nagao Hiroaki, Yoshihara Kenji, Singh Manvendra K., Uemura Akiyoshi, Matsuzaki Fumio, Yoshida Yutaka, Kurihara Yukiko, Miyagawa-Tomita Sachiko, Kurihara Hiroki | 4. 巻<br>24                    |
| 2. 論文標題<br>Semaphorin3E-PlaxinD1 signaling in coronary artery and lymphatic vessel development with clinical implications in myocardial recovery  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>iScience  | 6. 最初と最後の頁<br>102305 ~ 102305 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2021.102305  | 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>Shimizu Takashi、Maruyama Kazuaki、Kawamura Takeshi、Urade Yoshihiro、Wada Youichiro                                    | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>PERK participates in cardiac valve development via fatty acid oxidation and endocardial-mesenchymal transformation | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>20094 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-77199-4  | 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>-           |

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鳥居 壮多, 丸山 和晃, 小林 裕子, 白水 崇, 今中-吉田 恭子 |
| 2. 発表標題<br>オミクス解析を用いたSema3E-PlxnD1シグナル下流因子の探索  |
| 3. 学会等名<br>第111回日本病理学会総会                       |
| 4. 発表年<br>2022年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>原 慈, 俵 功, 丸山 和晃, 今市 将太, 今中-吉田 恭子 |
| 2. 発表標題<br>免疫チェックポイント阻害薬心筋炎モデルマウスの作成        |
| 3. 学会等名<br>第111回日本病理学会総会                    |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松井 健汰, 丸山 和晃, 今中-吉田 恭子     |
| 2. 発表標題<br>心筋梗塞後のリンパ管新生の特徴-時相と分布に着目して |
| 3. 学会等名<br>第111回日本病理学会総会              |
| 4. 発表年<br>2022年                       |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>丸山 和晃、今中 恭子、栗原 裕基 |
| 2. 発表標題<br>新規リンパ管内皮細胞起源の同定   |
| 3. 学会等名<br>第7回血管生物若手研究会      |
| 4. 発表年<br>2022年              |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>丸山 和晃、今中 恭子、栗原 裕基 |
| 2. 発表標題<br>新規リンパ管内皮細胞起源の同定   |
| 3. 学会等名<br>第29回血管生物医学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2022年              |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>丸山 和晃、今中 恭子、栗原 裕基 |
| 2. 発表標題<br>新規リンパ管内皮細胞起源の同定   |
| 3. 学会等名<br>第20回日本心臓発生研究会     |
| 4. 発表年<br>2021年              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| <p>冠動脈・心臓リンパ管発生を制御する新たなシグナルを同定<br/> <a href="https://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20210330.pdf">https://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20210330.pdf</a></p> <p>新しいリンパ管の起源を発見 (三重大学大学院医学系研究科・医学部ホームページ)<br/> <a href="https://www.medic.mie-u.ac.jp/news/news_20221011.php">https://www.medic.mie-u.ac.jp/news/news_20221011.php</a></p> |
|---|

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|