

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：27501

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21590217

研究課題名（和文）リンパ管新生におけるアンジオポエチンの発現・機能解析とリンパ管誘導システムの開発

研究課題名（英文）Expression and functional roles of angiopoietins in lymphangiogenesis and development of lymphatic induction system

研究代表者

下田 浩 (SHIMODA HIROSHI)

大分県立看護科学大学看護学部・教授

研究者番号：20274748

研究成果の概要（和文）：本研究では従来の脈管成長因子とは異なる中間型 (imp) VEGF-C を新たに作製し、これを用いてリンパ管新生モデルを確立させた。また、リンパ管の形成に与る成長因子、アンジオポエチン (Ang) - 2 のリンパ管新生に対する役割を本モデルで明らかにした。さらに、これらの研究成果をもとに高度な生体内リンパ管新生を誘導する impVEGF-C/ Ang-2 システムを開発した。本システムは新しいリンパ浮腫治療戦略として期待できる。

研究成果の概要（英文）：A new lymphangiogenesis model with our own produced intermediately-processed (imp) VEGF-C, a specific lymphangiogenic factor, was established. The role of Angiopoietin (Ang)-2, another molecule regulating lymphatic vascular formation, in lymphangiogenesis was further defined using our model. On the basis of these results, we have developed a highly lymphangiogenic system with a mixture of impVEGF-C and Ang-2, and this provides a new therapeutic strategy for lymphedema.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：リンパ管新生、アンジオポエチン、リンパ管誘導、分子形態学、リンパ浮腫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、様々な病態やがんなどに対する医学的治療により生じるリンパ管系の破綻が難治性のリンパ浮腫を引き起こすことが新しい医学的・社会的問題となっている。この問題の解決のために、生体内におけるリンパ管新生のメカニズムの解析とその臨床応用が急がれている。報告者はこれまで遺伝子改変マウスを用いてアンジオポエチンがリンパ管の発生・形成の重要な調節因子であることを明らかにしてきたが、リンパ

管新生におけるアンジオポエチンの発現と機能は不明であった。

(2) 報告者らは従来のリンパ管成長因子とは異なる新しい中間型 (imp) VEGF-C の作製に成功し、これを用いた生体内リンパ管新生モデルを確立した。

(3) (2) のリンパ管新生モデルがリンパ管新生におけるアンジオポエチンの発現と機能の解析に応用可能であることを確認した。

## 2. 研究の目的

- (1) リンパ管新生におけるアンジオポエチンの発現と機能の解明
- (2) リンパ管誘導システム開発の基盤確立

## 3. 研究の方法

(1) VEGF-A, VEGF-C, impVEGF-C, Ang-2, impVEGF-C と Ang-2 など各種成長因子を含有するグラフト移植マウスモデルを作製し、各モデルにおけるリンパ管新生動態を分子形態学的手法を用いて解析した。

(2) impVEGF-C グラフト・リンパ管新生モデルにおいてアンジオポエチンと関連分子群の発現を分子生物学的および分子形態学的手法を用いて解析した。

(3) Ang-2 ノックアウト (KO) マウスを用いた impVEGF-C グラフトモデルにおいてリンパ管と血管の新生動態を解析した。

(4) (1)~(3) で得られた情報をもとに impVEGF-C/ Ang-2 デリバリーグラフトの至適化を行い、新生リンパ管の機能形態を解析することで、リンパ管新生誘導システム開発への有用性と問題点を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) impVEGF-Cのリンパ管新生作用

血管成長因子 VEGF-A、従来の成熟型リンパ管成長因子 VEGF-C、我々が新規開発した中間型リンパ管成長因子 impVEGF-C、Ang-2 のリンパ管新生作用をグラフトモデルで検討したところ、impVEGF-C は他の成長因子に比べて有意に新生リンパ管をグラフト内に誘導した(図1, 5)。これより、impVEGF-C は VEGF-A、VEGF-C など従来の成長因子よりリンパ管新生の誘導に極めて有用であると考えられる。

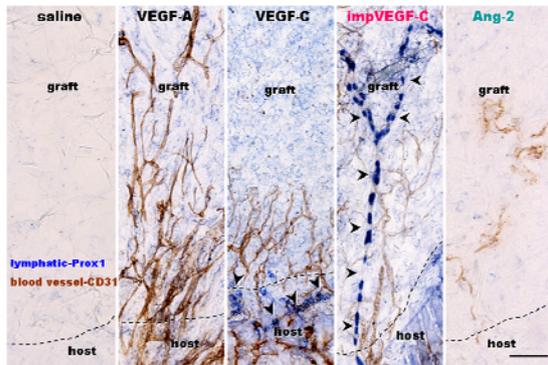


図1. 成長因子グラフトにおけるリンパ管新生：リンパ管内皮マーカーProx1 (青) と血管内皮マーカーCD31 (茶色) を用いた組織化学的解析。impVEGF-C は従来の成長因子に比べて明瞭に新生リンパ管 (矢頭) を誘導する。Bar 50  $\mu$  m

### (2) リンパ管新生におけるAng-2の必要性

野生型マウスの impVEGF-C グラフト内にはリンパ管新生とともに Ang-2 を発現する多数の間質細胞が出現した(図2)。これに対し、Ang-2 KO マウスに移植した impVEGF-C グラフトでは間質細胞は見られるが、Ang-2 の発現はなく、リンパ管新生がほとんど見られなかった(図3)。これらのことは impVEGF-C によるリンパ管新生には Ang-2 が必要であることを示唆している。

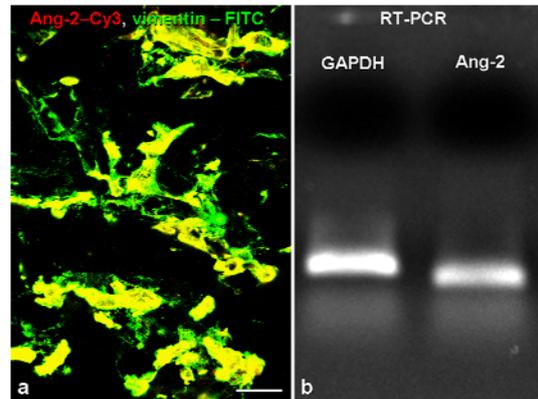


図2. impVEGF-C グラフトにおける Ang-2 の発現：a. vimentin (緑) と Ang-2 (赤) に対する免疫組織化学。b. Ang-2 と GAPDH に対する RT-PCR。impVEGF-C グラフト内に出現する間質細胞は Ang-2 を発現する (黄)。Bar (a) 25  $\mu$  m

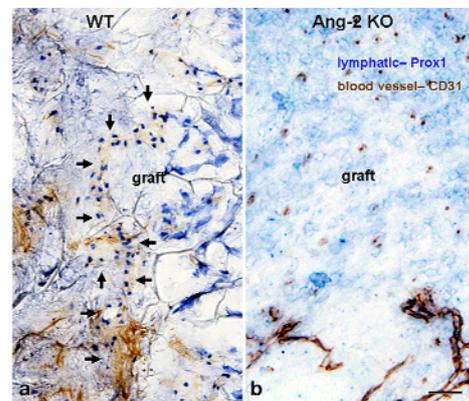


図3. Ang-2 KO マウスにおけるリンパ管新生：リンパ管内皮マーカーProx1 (青) と血管内皮マーカーCD31 (茶色) を用いた組織化学的解析。野生型マウス (WT) では impVEGF-C グラフト内に明瞭な新生リンパ管 (矢印) を見る (a) が、Ang-2 KO マウスではリンパ管新生は見られない。

### (3) impVEGF-CとAng-2のリンパ管新生相乗作用

impVEGF-C と Ang-2 を至適混合添加したグラフトは極めて高度なリンパ管新生を誘導

し(図4a)、グラフト内のリンパ管内皮細胞数は impVEGF-C 単独のグラフトに比べて有意に増加した(図5)。さらに、Ang-2 を添加することにより胎生期に出現する静脈からのリンパ管発生を誘導することが出来た(図6)。これはリンパ浮腫に対する外科治療として現在行われているリンパ管-静脈吻合と同様の形態を呈していた(図4b)。以上の結果は、Ang-2 が impVEGF-C によるリンパ管新生を促進するだけでなく、成体におけるリンパ管発生を誘導することを示している。impVEGF-C と Ang-2 によるドラッグデリバリーシステムの開発は簡便で調節性に優れたリンパ管誘導システムを提供し、新しいリンパ浮腫治療戦略となる可能性が示唆される。

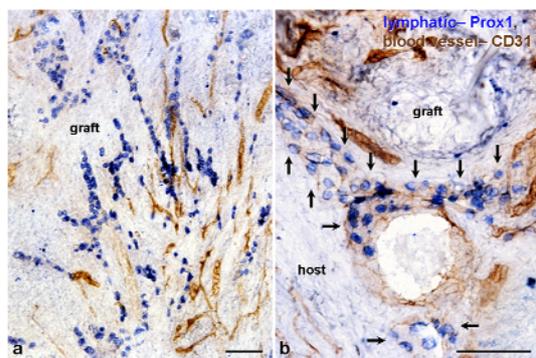


図4. impVEGF-C+Ang-2 グラフトにおけるリンパ管新生：リンパ管内皮マーカーProx1(青)と血管内皮マーカーCD31(茶色)を用いた組織化学的解析。impVEGF-C と Ang-2 を至適混合添加したグラフトでは極めて旺盛なリンパ管新生(a)とともに、小静脈からのリンパ管発生(b, 矢印)が見られる。Bars 100  $\mu$ m

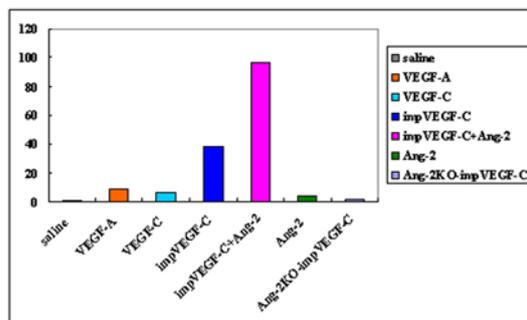


図5. 移植4週後の各成長因子グラフトにおけるリンパ管内皮マーカーProx1陽性細胞密度(数/ $\text{mm}^2$ )。impVEGF-CはVEGF-A, VEGF-C, Ang-2に比べて有意に新生リンパ管を誘導する( $p < 0.01$ )。impVEGF-C+Ang-2ではimpVEGF-C単独よりもさらに、有意で高度なリンパ管新生を示す( $p < 0.01$ )。

#### (4) impVEGF-C/ Ang-2 グラフト内新生リンパ管の機能形態

impVEGF-C と Ang-2 により誘導された新生リンパ管は毛細リンパ管としての機能形態をもち、血管とは明瞭に区別され、complexus adherens により連結した内皮細胞で構成されていた(図6)。これらの新生リンパ管は組織液の吸収を示すとともに、免疫細胞などの輸送に寄与しており(図6)、impVEGF-C/ Ang-2 によるリンパ管新生システムで誘導されるリンパ管はその機能性も充分備えていた。

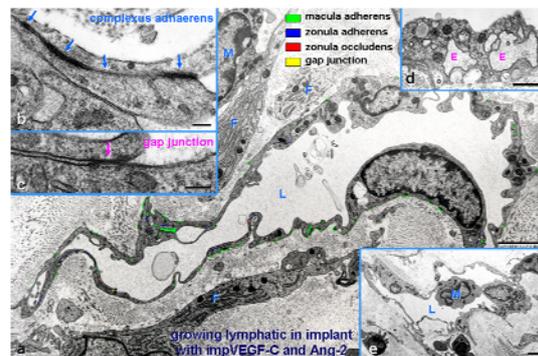


図6. impVEGF-C+Ang-2 グラフト内新生リンパ管の透過電顕像。a. 新生リンパ管は種々の接着装置で連結した内皮細胞から成る毛細リンパ管の形態を示す。F, 線維芽細胞; L, リンパ管; M, 大食細胞。b. 内皮細胞間の複合型接着装置(矢印)。c. 内皮細胞間のギャップ結合(矢印)。d. 内皮細胞の組織液吸収を示す大きな細胞質内エンドソーム(E)。e. 新生リンパ管(L)内の大食細胞(M)。Bars 2  $\mu$ m (a), 200 nm (b), 100 nm (c), 1  $\mu$ m (d), 2  $\mu$ m (e)

#### (5) 研究成果の位置づけとインパクト

本研究は、従来の成長因子より有意に生体内のリンパ管を成長させる impVEGF-C を新規に作製するとともに、リンパ管新生に与る Ang-2 の役割を解明することで Ang-2 が impVEGF-C によるリンパ管新生作用を高度に促進することを見出した。本研究結果はリンパ管新生における Ang-2 の重要性を初めて浮き彫りにしている。さらに、これらの研究成果をもとに高度なリンパ管新生を誘導する impVEGF-C/ Ang-2 による成長因子システムを開発した。本システムはそのリンパ管新生・発生誘導作用によりリンパ浮腫などリンパ管系の破綻に関連する様々な病態への臨床応用性が期待される。

本研究は第51回日本組織細胞化学会で最優秀演題賞を受賞した。

#### (6) 今後の展望

本研究で新規に開発した impVEGF-C/ Ang-2 による成長因子システムは高度な生体内リ

リンパ管新生を誘導することが明らかになった。本研究成果は、現在新たな医学的・社会的問題となっている、難治性リンパ浮腫に対して全く新しい治療戦略を提供すると考えられる。現在これを実現すべく、本システムを自己組織化ペプチド水ゲルを用いたドラッグデリバリーシステムに発展させ、原発性・続発性リンパ浮腫モデルに対する効能評価を開始している。

## 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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Shimoda H, Bernas MJ, Witte MH: Dymorphogenesis of lymph nodes in Foxc2 haploinsufficient mice. *Histochem Cell Biol* 135: 603–613, 2011. (査読有)
- ② 下田 浩: リンパ管発生・新生の分子形態学的プロフィール. *リンパ学* 33:39–41, 2010. (査読無)
- ③ Shimoda H: Immunohistochemical demonstration of Angiopoietin-2 in murine lymphatic vascular development. *Histochem Cell Biol* 131: 231–23, 2009. (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① 下田 浩、村上正裕、Bernas MJ、Witte MH: リンパ管形成におけるAngiopoietin-2 の発現・機能解析. 日本顕微鏡学会・第67回学術集会—シンポジウム、2011. 5. 福岡
- ② 下田 浩、磯貝純夫: Histochemical demonstration of lymphatic vessels in zebrafish. 第116回日本解剖学会・学術集会、2011. 3. 横浜
- ③ 下田 浩、Bernas MJ、Witte MH: lymphedema-distichiasisモデルにおけるリンパ節異形成の分子形態学的解析. 第42回日本臨床分子形態学会、2010. 9. 静岡
- ④ 下田 浩: リンパ管発生・新生におけるAngiopoietin-2 の発現・機能解析. 第51回日本組織細胞化学会—最優秀演題賞、2010. 9. 東京
- ⑤ 下田 浩、村上正裕: 脈管成長因子グラフトにおけるリンパ管新生. 第115回日本解剖学会総会・学術講演会、2010. 3. 岩手
- ⑥ 下田 浩: リンパ管発生・新生の分子形態学的プロフィール. 第33回日本リンパ学会総会—シンポジウム、2009. 6. 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下田 浩 (SHIMODA HIROSHI)  
大分県立看護科学大学看護学部・教授  
研究者番号: 20274748

### (2) 連携研究者

村上正裕 (MURAKAMI MASAHIRO)  
大阪大谷大学薬学部・教授  
研究者番号: 50174280  
駄阿 勉 (DAA TSUTOMU)  
大分大学医学部・准教授  
研究者番号: 10217218