

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09776

研究課題名（和文）リンパ浮腫における新生リンパ管形成を制御する脂質メディエーターの役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Role of Lipid Mediators in Regulating Neo-Lymphangiogenesis in Lymphedema

研究代表者

美島 利昭（Mishima, Toshiaki）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00296477

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）：マウス2次性リンパ浮腫モデルを作成し2次性リンパ浮腫における内因性トロンボキサンの役割を調べた。マクロファージに発現するトロンボキサン受容体シグナルを阻害すると、リンパ浮腫部に集積するトロンボキサン受容体シグナル欠損マクロファージは炎症性マクロファージタイプとなり、リンパ管新生を抑制しリンパ管機能障害をきたしてリンパ浮腫が遷延することが分かった。トロンボキサン受容体を標的にしたリンパ浮腫対策治療法の開発につながる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

2次性リンパ浮腫に対してはリンパマッサージや弾性ストッキング着用などの理学療法がメインであり、治療に抵抗性であることが多い。リンパ浮腫改善のためには機能的新生リンパ管の形成が促進されるより有効な治療法が望まれる。これまでTP受容体シグナルにはリンパ管新生促進作用は知られておらず、TP受容体シグナルを標的とすることは、2次性リンパ浮腫の治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To examine the role of endogenous thromboxane in secondary lymphedema, we created a mouse model of secondary lymphedema in tails. Deficient thromboxane receptor (TP) signaling in macrophages prolonged tail lymphedema, suppressed lymphangiogenesis, and disturbed lymphatic drainage function. Macrophages deficient TP signaling displayed a pro-inflammatory phenotype, resulting in suppressing lymphangiogenesis. The results of the present study suggest that TP signaling may have therapeutic potential for improving lymphedema symptoms by enhancing lymphangiogenesis and lymphatic transport.

研究分野：血管外科

キーワード：リンパ浮腫 リンパ管新生 トロンボキサン

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は、間質液調節による体液循環の維持や免疫細胞の動員などの役割を担う。さらに、炎症や悪性腫瘍の転移などにも関与する重要な器官である。リンパ浮腫はリンパ節廓清術を伴う外科手術後、放射線療法などの合併症として発症し、浮腫に伴う運動機能障害、線維化を伴う慢性皮膚炎症、易感染性などをきたし患者のQOLを低下させる。リンパ浮腫に対してはリンパマッサージや弾性ストッキング着用などの理学療法がメインであり、治療に抵抗性であることが多い。リンパ浮腫改善のためには機能的新生リンパ管の形成が鍵となるものと推定されるが、その病態については不明な点が多い。

これまで、われわれは2次性リンパ浮腫におけるリンパ管新生解明のために、マウス尻尾部基部皮下組織を全周搔爬しリンパ管を選択的に結紮切離するリンパ浮腫モデルを用いて検討を重ねてきた。リンパ管結紮処置部より末梢側に発症した浮腫は、同部位にリンパ管が新生すると急速に浮腫が軽減することが分かっている。本モデルを用いて、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ-2を介して産生される脂質メディエーターである、プロスタグランジン E2 がリンパ浮腫を改善すること、さらにマクロファージがリンパ浮腫形成に関与することを報告した。

一方で、プロスタグランジンと同じくシクロオキシゲナーゼ-2の働きによりアラキドン酸から合成されるトロンボキサン A2 は、トロンボキサン A2 受容体 (Thromboxane prostanoid, TP 受容体) を介して強力な血小板凝集や細動脈収縮を引き起こす。興味深いことに申請者らは TP 受容体シグナルが血管新生を促進し虚血組織改善する作用があることを見いだした。さらに TP 受容体シグナルはリンパ管新生に関与する可能性や TP 受容体は血小板のみならず、活性化されたマクロファージにも存在することも見いだした。

そこで、トロンボキサン A2 がリンパ浮腫に関与する可能性があるものと考え、2次性リンパ浮腫モデルを用いて TP 受容体シグナルの2次性リンパ浮腫における役割を解明することとした。

2. 研究の目的

本研究では、マウス2次性リンパ浮腫モデルを用い、内因性トロンボキサンがリンパ管新生抑制作用によりリンパ浮腫に関与することと、その制御機構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週令の雄性野生型マウス(WT)C57BL/6 マウスとトロンボキサン受容体ノックアウトマウス(TP^{-/-}マウス)を用いた。またマクロファージ特異的 TPKO マウス (m TP^{-/-}マウス) と対照マウス (Cont) を用いた検討もおこなった。

既報に従い、麻酔下にマウス尾部リンパ浮腫モデルを作成した。尾部径の経時的変化を記録した。また処置部から組織を採取し、一部は RT-qPCR による遺伝子解析に、また一

部は免疫組織学的解析用とした。

遺伝子発現解析は RT-qPCR によった。リンパ管新生促進因子 (VEGF-C,D)、リンパ管内皮マーカー (LYVE-1, VEGFR3, Prox1)、マクロファージ表現形質マーカー (炎症性、TNF, IL-1); 抗炎症性 (MR, IL-10)、ケモカイン (CCL2) ケモカイン受容体 (CCR2) などの測定をおこなった。

リンパ管新生は免疫染色によっても解析した。新生リンパ管を抗 LYVE-1 抗体で染色し、LYVE-1 陽性リンパ管径を ImageJ を用いて測定した。また ImageJ を用いてリンパ管占有面積を求め、観察面積に対する割合 (リンパ管面積 (LVA) %) で示した。またマクロファージ集積はマクロファージマーカーである CD68 抗体を用いて染色し、CD68 陽性細胞数をカウントし CD68 陽性細胞数で示した。

リンパ管構造とリンパ管ドレナージ機能を解析するために蛍光生体顕微鏡により、尾部リンパ管を観察した。麻酔下にマウス尾部末梢から FITC-dextran を真皮内に注入し、30 分後のリンパ管を観察した。リンパ管内の造影剤強度と蛍光色素占有面積をイメージソフトで解析した。

マクロファージ由来のリンパ管新生促進因子産生が TP 受容体シグナルに依存したマクロファージの形質による違いによるものかどうかを調べた。Cont マウスまたは mTP^{-/-}マウスの骨髄細胞を培養し LPS/IFN γ または IL-4 で刺激した後のリンパ管新生促進因子発現を PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) TP 受容体シグナル阻害はリンパ浮腫を増悪し、リンパ管新生を抑制した。

リンパ浮腫の改善に、TP 受容体シグナルが関与するかを調べるため、WT または TP^{-/-}マウスの尾部にリンパ浮腫を作成した (図 1)。処置後 6 週間後まで尾部径を測定したところ、WT では 2 週をピークに以後漸減したが、6 週間後の尾部径は前値より 40% 増加した。一方、TP^{-/-}マウスでは、尾部径は 3 週後がピークとなり、以後漸減したが、WT マウスよりも尾部径は高値であり、尾部の浮腫が遷延した。処置後 6 週間後の尾部径は前値よりも 50% 増加していた。

リンパ管新生を調べると、リンパ管占有面積ならびにリンパ管径は WT マウスよりも TP^{-/-}マウスで減少した。リンパ管内皮マーカー (LYVE-1, VEGFR3, Prox1) およびリンパ管新生促進因子 (VEGF-C, D) も WT マウスよりも TP^{-/-}マウスで減少した (図 2)。

これらの結果から TP 受容体シグナル阻害はリンパ浮腫を増悪し、リンパ管新生を抑制させることが分かった。

2次性リンパ浮腫のTP KOでの増強

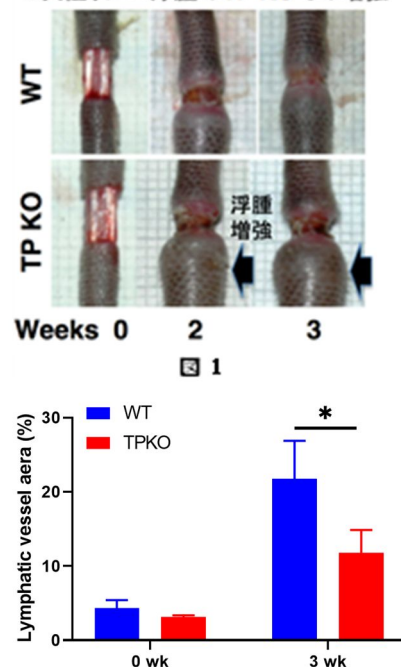


図2. TP受容体シグナル阻害は浮腫部のリンパ管新生を抑制した

(2) TP 受容体シグナル阻害はリンパ浮腫部へのマクロファージ集積を促進した。

これまでの研究からマクロファージはリンパ管新生に関与することが報告されている。そ

ここで、リンパ浮腫部にマクロファージについて免疫染色で解析した。リンパ浮腫組織内の CD68 陽性細胞数は、WT マウスよりも TP^{-/-}マウス 加した (図3)。さらに、CD68 陽性細胞の集積は、マクロファージのケモカインである CCL2 とその受容体である CCR2 の発現上昇と関連していた。またマクロファージ CD68 陽性細胞は TP 受容体発現と一致したが、リンパ管内皮とは重ならなかった。従って、リンパ管新生はリンパ管内皮に TP が発現増強してリンパ管内皮が増殖するのではなく、マクロファージに発現する TP 受容体の作用による可能性が示唆された。

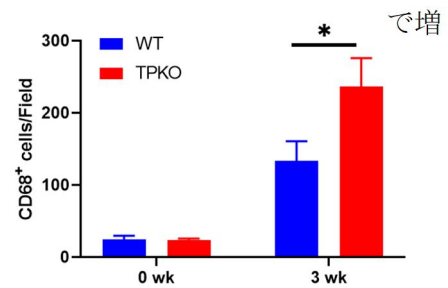


図3. TP受容体シグナル阻害は浮腫部の集積マクロファージを増強した

(3) マクロファージ特異的 TP 受容体シグナル阻害はリンパ浮腫を増悪させた。

上記の結果から、マクロファージに発現する TP 受容体シグナルがリンパ浮腫ならびにリンパ管新生に関与する可能性をさらに確かめるために、マクロファージ特異的 TPKO マウス (mTP^{-/-}マウス) と対照マウス (Cont) を用いた。

処置後 6 週間後まで尾部径を測定したところ、Cont では 2 週をピークに以後漸減したが、6 週間後の尾部径は前値より 40%増加した。一方、mTP^{-/-}マウスでは、尾部径は 3 から 4 週後がピークとなり、以後漸減したが、Cont マウスよりも尾部径は高値であり、尾部の浮腫が遷延した。処置後 6 週間後の尾部径は前値よりも 60%増加していた。

リンパ管新生を調べると、リンパ管占有面積ならびにリンパ管径は Cont マウスよりも mTP^{-/-}マウスで減少した。リンパ管内皮マーカー (LYVE-1, VEGFR3, Prox1) およびリンパ管新生促進因子 (VEGF-C, D) も Cont マウスよりも mTP^{-/-}マウスで減少した。

これらの結果からマクロファージ TP 受容体シグナル阻害はリンパ浮腫を増悪し、リンパ管新生を抑制させることが分かった。

(4) マクロファージ特異的 TP 受容体シグナル阻害はリンパ浮腫部への炎症性マクロファージ集積を促進した。

さらに、リンパ浮腫部にマクロファージについて免疫染色で解析した。リンパ浮腫組織内の CD68 陽性細胞数は、Cont マウスよりも mTP^{-/-}マウスで増加した。さらに、CD68 陽性細胞の集積は、マクロファージのケモカインである CCL2 とその受容体である CCR2 の発現上昇と関連していた。マクロファージは、リンパ管新生に極めて重要な役割を果たすリンパ管新生促進因子 (VEGF-C と VEGF-D) 産生に関与する。そこで、浮腫部に集積したマクロファージが VEGF-C、または VEGF-D を発現しているかどうかを調べたところ、蛍光免疫二重染色で CD68 陽性細胞は VEGF-C および VEGF-D を共発現していることが示された。

リンパ管新生に関与するマクロファージの表現型式の特徴は、炎症性マクロファージ (M1 様マクロファージ) よりかは抗炎症性マクロファージ (M2 様マクロファージ) であることが報告されている。そこで、本モデルにおける集積するマクロファージの特徴を調べるため、炎症性マクロファージの関連因子である TNF- α , IL-1 β mRNA 発現レベル、および抗炎症性マクロファージ関連因子である MR, IL-10 の mRNA 発現レベルを調べた。炎

症性マクロファージに関連する mRNA 発現量は、Cont マウスよりも mTP^{-/-}マウスで増加した。一方、抗炎症性マクロファージに関連する mRNA 発現量は、Cont マウスよりも mTP^{-/-}マウスで減少した。これらの結果から抗炎症性マクロファージがリンパ管新生やリンパ浮腫改善に関与していることが示唆された。

さらに、in vitro で培養骨髄マクロファージにおける TP 受容体シグナル阻害が、リンパ管新生促進因子を制御するかどうかを調べた。培養骨髄マクロファージを LPS/IFN γ , IL-4 で刺激すると、それぞれ、炎症性マクロファージ並びに抗炎症性マクロファージに分化する。その上で、リンパ管新生促進因子発現を調べると VEGF-C、および VEGF-D の mRNA 発現レベルは、Cont マウス由来の抗炎症性マクロファージでは増加したが、TP^{-/-}マウス由来の抗炎症性マクロファージでは変化しなかった。これらの所見から、培養骨髄マクロファージの VEGF-C、および VEGF-D の発現は、抗炎症性マクロファージの TP 受容体シグナルを介して増加する可能性が示された。

(5) マクロファージ特異的 TP 受容体シグナル欠損はリンパ浮腫部におけるリンパ管機能を障害した。

リンパ浮腫部のリンパ管機能を蛍光色素を注入することで評価した。処置前のリンパ管は鼈甲模様を示し、蛍光色素はリンパ管内にとどまっていた。リンパ浮腫形成後ではリンパ管内の蛍光色素強度は低下し、リンパ管外への色素漏出を伴った。Cont マウスよりも mTP^{-/-}マウスでは、リンパ管内の蛍光色素強度はさらに低下し、リンパ管外への色素漏出が増加した。この結果から、マクロファージ特異的 TP 受容体シグナル欠損はリンパ管壁の透過性を亢進し、リンパ液の管内から管外への漏出がおき、リンパ灌流が障害されていることが示唆された。

(6) まとめ

マウス尾部浮腫モデルにおいて、内因性トロンボキサンはマクロファージの TP 受容体に作用して機能的な新生リンパ管の形成を促進させることで、リンパ浮腫軽減に関与することが示唆された。リンパ浮腫では TP 受容体を標的としたリンパ管新生促進作用を活用することが新たな治療応用へつながる可能性があるものと考えられる。

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 Mishima T, Hosono K, Tanabe M, Ito Y, Majima M, Narumiya S, Miyaji K, Amano H.	4. 巻 50(10)
2. 論文標題 Thromboxane prostanoid signaling in macrophages attenuates lymphedema and facilitates lymphangiogenesis in mice : TP signaling and lymphangiogenesis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 7981-7993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-023-08620-0	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤義也、美島利昭、細野加奈子、畑中公、馬嶋正隆、成宮周、天野英樹
2. 発表標題 2次性リンパ浮腫における内因性トロンボキサンの役割
3. 学会等名 第45回リンパ学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細野加奈子、美島利昭、伊藤義也、山下敦、田邊美奈、長田真由子、古江明子、畑中公、馬嶋正隆、成宮周、天野英樹
2. 発表標題 2次性リンパ浮腫におけるマクロファージトロンボキサンA2受容体シグナルの役割
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細野加奈子、美島利昭、伊藤義也、畑中公、宮地鑑、馬嶋正隆、成宮周、天野英樹
2. 発表標題 トロンボキサンA2受容体シグナルは、リンパ管新生を制御し続発性リンパ浮腫を改善する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細野加奈子, 美島 利昭, 伊藤 義也, 畑中 公, 宮地 鑑, 馬嶋正隆, 成宮 周, 天野英樹
2. 発表標題 2次性リンパ浮腫における内因性トロンボキサンの役割
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細野 加奈子、美島 利昭、伊藤 義也、畑中 公、宮地 鑑、馬嶋 正隆、成宮 周、天野 英樹
2. 発表標題 2次性リンパ浮腫におけるリンパ管新生を制御するトロンボキサンA2受容体シグナルの役割
3. 学会等名 第145回日本薬理学会年関東部会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	伊藤 義也 (ITO YOSHIYA) (40203187)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

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
---------	---------