

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5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790187

研究課題名（和文）血管・リンパ管吻合の形成に関する分子解剖学的研究

研究課題名（英文）Studies on the molecular mechanisms to regulate the connection between blood vessels and lymphatic vessels

研究代表者

丁 国 (Guo Ding)

神戸大学・医学研究科・グローバルCOE研究員

研究者番号：00514697

研究成果の概要（和文）：生理的血管・リンパ管吻合部位である静脈角の形成及びPlcg2^{-/-}マウスで見られる血管・リンパ管の異常吻合の形成について解析を行った。静脈角の弁は血管内皮とリンパ管内皮の二層の内皮細胞からなることを見出した。また、Plcg2^{-/-}マウスで見られる血管・リンパ管の異常吻合は発生の段階でランダムに形成されることと、吻合部位においてリンパ管内皮細胞が血管内に糸状偽足を伸ばすことを見出した。さらに、血小板がリンパ管内皮細胞の増殖及び遊走の抑制することと糸状偽足のリトラクションを引き起こすことを見出した。これらにより、血小板がリンパ管伸長の段階において血管内に伸長してきたリンパ管内皮細胞を認識し、その増殖及び遊走の抑制、糸状偽足のリトラクションを引き起こすことで末梢組織での血管とリンパ管の分離を制御する新しい機構のモデルを提唱した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the formation of venous angles that the physiology connection site between blood vessels and lymphatic vessels. Also we analyzed the abnormal blood-lymph connection in Plcg2^{-/-} mice. Valves in venous angle were consist with blood endothelial cells and lymphatic endothelial cells (LECs) two layers cells. We detected the abnormal blood-lymph connection were randomly present in Plcg2^{-/-} and LEC extends filopodia to blood vessels at connection site. In addition, platelets inhibit proliferation and migration of LECs. Taken together, We proposed new molecular mechanisms: During lymphatic development, Platelets regulate the separation between blood and lymphatic vessel by inhibiting of proliferation and migration, inducing of retraction of lymphatic endothelial cells which encounter to blood vessels during lymphatic sprouting in the peripheral tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は毛細血管領域で盲端から始まり毛細血管から漏出した組織液、タンパク質、脂質、細胞などを吸収し、集合リンパ管を經由して頸部の静脈角から血管系に戻す役割を果たしている。このことで、血液の量や組成を一定に保ち、脂質代謝や全身における迅速な免疫応答に重要な役割を果たしている。静脈角はリンパ管系から血管系への生理的開口部であり、リンパ管が血管系を補う機能を発揮するために極めて重要な解剖学的構造である。

静脈角は、内頸静脈と鎖骨下静脈の合流点にリンパ管が入り込んだ構造であり、その部位には血液の逆流を防止するための弁が存在している。一世紀前の研究で、発生過程にあるヒト胎児の頸部でリンパ管は血管と吻合しており、吻合部位に二層の内皮細胞からなる弁があることが報告されていた。しかしながら、リンパ管内皮細胞に特異的な分子が発見されたのは最近であり、静脈角の具体的な分子解剖学的特徴は明らかにされていない。我々は予備実験で胎生 14.5 日目のマウス胎仔の頸部にて、リンパ管が静脈に向けて二つの開口構造を取っていることと、吻合部位の弁が二層の内皮細胞からなることを確認した。

さらに、血球系細胞の重要なシグナル分子である $P1cg2$ 欠損 ($P1cg2^{-/-}$) マウスの末梢組織において、リンパ管内に血液細胞が存在することを見出した。以前から、 $P1cg2$ の上流シグナル分子である Syk や SLP-76 ノックアウトマウスの解析において、末梢組織中で血管・リンパ管の異常吻合が生じることが報告されていたが、切片標本で解析されており異常吻合の頻度は明らかでなかった。我々が $P1cg2^{-/-}$ マウス背部皮膚のフラットマウント標本で解析したところ、これらの異常吻合の頻度は高くなく (0~2 箇所/解析した標本)、異常吻合が同定されないリンパ管内にも血液細胞が流入していることを明らかにした。

2. 研究の目的

静脈角はリンパ管系と血管系の生理的吻合部位であり、二つの脈管系が独自の機能を果たすために重要な構造として弁を備えている。この構造は一世紀前の研究で報告されていたが、我々はこれまでに静脈角の分子レベルでの特徴の一端を見出しており、本研究でその形成過程について分子解剖学的に明

らかにする。さらに、 $P1cg2$ 欠損 ($P1cg2^{-/-}$) マウスにおいて、静脈角形成の異常を示唆する所見を得ており、末梢組織でみられる血管・リンパ管異常吻合とともに分子解剖学的に解析し、野生型マウスにおける生理的吻合部位の静脈角との違いを明らかにする。

3. 研究の方法

マウス胎生期における静脈角形成過程を、免疫組織化学的手法で解析した。リンパ管内に血液細胞が見られる $P1cg2^{-/-}$ マウスにおいて、リンパ管への血液流入部位を同定した。次に、末梢組織で見られた血管・リンパ管の異常吻合部位の構造を解析した。さらに、リンパ管内皮細胞における血小板の役割について解析した。

(1) 胎仔における静脈角形成過程の免疫組織化学的解析

静脈角の構造を 3 次元的に解析するために、冠状面に沿ってマウス胎仔のビブラトーム切片 (数 100 μ m 厚) を作製の後、血管・リンパ管・接着分子・細胞外マトリックスに特異的なマーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学的手法で蛍光三重染色を行った後に組織を透明化し、共焦点レーザー顕微鏡で連続断層撮影した。

(2) $P1cg2^{-/-}$ マウス胎仔におけるリンパ管への血液流入部位の同定

リンパ管内皮細胞特異的なマーカーである抗 Podoplanin 抗体を蛍光ラベルし、胎仔の卵黄囊静脈から血管内へ注入し、吻合部位のリンパ管が抗体により認識されることで同定した。また、成体マウスにおいてリンパ管造影を行い、血液流入部位を同定した。

(3) $P1cg2^{-/-}$ マウスにおける血管・リンパ管の異常吻合部位の解析

$P1cg2^{-/-}$ マウスの胎生期皮膚のホールマウント標本を用いて免疫組織化学的手法で血管・リンパ管の異常吻合部位の構造を解析した。また、生理的吻合部位である静脈角の構造と比較した。

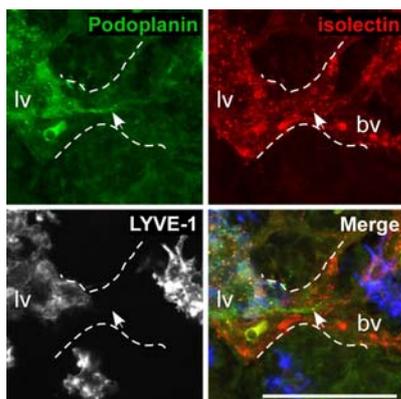
(4) リンパ管内皮細胞における血小板の役割 実験管内で、マウスのリンパ管内皮細胞を用いて、増殖、遊走などにおける血小板の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 静脈角の弁は二層の内皮細胞により構成されているが、静脈側はPECAM-1(+)/LYVE-1(-)/Podoplanin(-)の内皮細胞で、リンパ管側はPECAM-1(+)/LYVE-1(+)/Podoplanin(+)の内皮細胞からなっていることを見出した。静脈角の弁は、集合リンパ管の弁と同じ integrin α 陽性でもある。一方、胎生期 14 日目の Plcg2 欠損マウスにおいて静脈角の弁が野生型より短いことを見出したが、野生型でも低頻度で確認されたことで表現系だとは考えにくい。

(2) 血管造影のより、Plcg2^{-/-}に見られた血管・リンパ管の異常吻合は末梢組織においてランダムに存在することを見出した。これらは、血小板の活性がリンパ管の発生段階において、血管との異常吻合の形成を防ぐのに必須であることが示唆された。

(3) 血管・リンパ管異常吻合部位においてリンパ管内皮細胞は Podoplanin 陽性の糸状偽足を血管内に出していることを見出した(図1、矢印)。

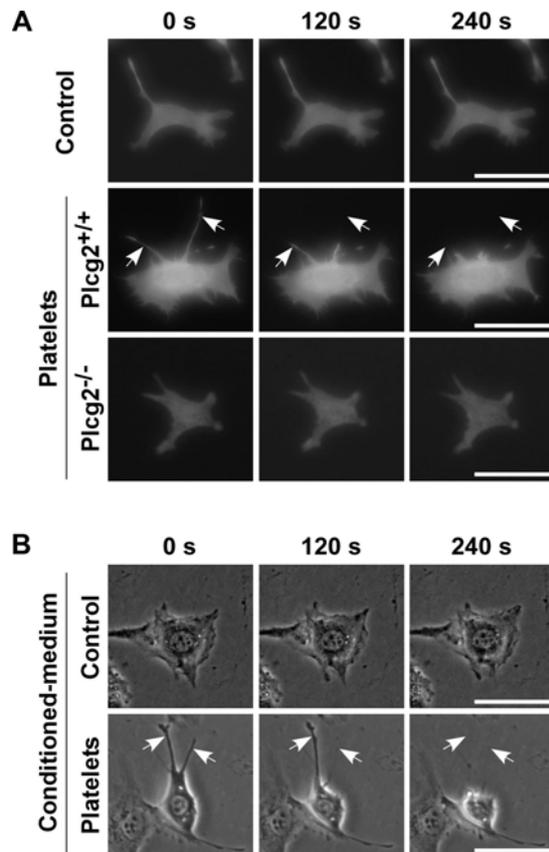


(図1)

(4) 野生型血小板はリンパ管内皮細胞の増殖と遊走を抑制した。また、血小板がリンパ管内皮細胞のリトラクションを引き起こすことを見出した(図2A)。さらに、顆粒因子を含む血小板活性化液でも血小板と同様な抑制効果と細胞のリトラクションを引き起こすことを見出した。これらにより、血小板由来の顆粒因子がリンパ管内皮細胞の挙動を変えられることが示唆された(図2B)。詳細な因子の同定については今後の更なる解析が必要である。

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)



(図2)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2012, *in press* 査読有
- ② Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J. Biol. Chem.* 285: 24494-24507. 2010 査読有
- ③ Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M,

Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, Ding G, Noda M, Murata Y, Tanaka Y, Masuko S, Suda T, Meno C, Côté JF, Nagasawa T, Fukui Y. DOCK180 Is a Rac Activator That Regulates Cardiovascular Development by Acting Downstream of CXCR4. *Circ Res.* 29: 107(9):1102-1105. 2010 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① Guo Ding. Platelets contribute to the separation between blood vessels and lymphatic vessels during lymphatic sprouting. Gordon Research Conferences (Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease). 2012年3月、Ventura Beach Marriott in Ventura CA United States.
- ② 丁国 Platelets contribute to the separation between blood vessels and lymphatic vessels during lymphatic sprouting 第19回日本血管物医学会学術集会2011年12月、東京ステーションコンファレンス
- ③ Guo Ding. Platelets contribute to the separation between blood vessels and lymphatic vessels during lymphatic sprouting. The Second Pacific Symposium on Vascular Biology. 2011年11月、Shilla Hetel, jeju, Korea.
- ④ 丁国 リンパ管の独自性を守る血小板 第2回リンパ学に関する松本カンファレンス
2011年8月、松本市浅間温泉
- ⑤ 丁国 Mechanisms of keeping apart blood and lymphatic vascular compartment 第18回日本血管生物医学会2010年12月、梅田スカイビル(大阪)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/vascul/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丁国 (Guo Ding)

神戸大学・医学研究科・グローバルCOE
研究員

研究者番号：00514697