

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860633

研究課題名(和文) M-CSF誘発性リンパ管新生刺激因子VEGF-C, D産生の細胞内シグナル解析

研究課題名(英文) Intracellular signal analysis of M-CSF-induced lymphangiogenesis stimulating factor VEGF-C, -D production

研究代表者

小林 誠 (Kobayashi, Makoto)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10644809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管新生は主にリンパ管に発現するvascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR3)にそのリガンドの VEGF-C, VEGF-D が結合して起きる。これまでマクロファージや骨格筋等のVEGF-C, VEGF-D 産生が報告されている。本研究ではM-CSFに着目しVEGF-C, D産生誘導を検討した。結果はM-CSF投与によりマウスマクロファージからはVEGF-C, D産生誘導はみられなかったが、M-CSFをマウスに投与し各臓器におけるVEGF-C, Dの発現レベルを確認したところ、骨格筋、横隔膜、心筋にて有意に発現上昇がみられた。

研究成果の概要(英文)：Lymphangiogenesis occurs in binding to VEGFR3 mainly expressed in lymphatic vessels of their ligand, VEGF-C or VEGF-D. It has been reported that macrophages and skeletal muscle is source of VEGF-C, -D production. In the present study, we examined whether M-CSF induce the VEGF-C, -D production. VEGF-C, D production induced from mouse macrophages was not observed by administration M-CSF. But in skeletal muscle, diaphragm, and myocardium, we confirmed that the expression levels of VEGF-C, -D were significantly higher.

研究分野：リンパ管新生

キーワード：M-CSF VEGF-C VEGF-D リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

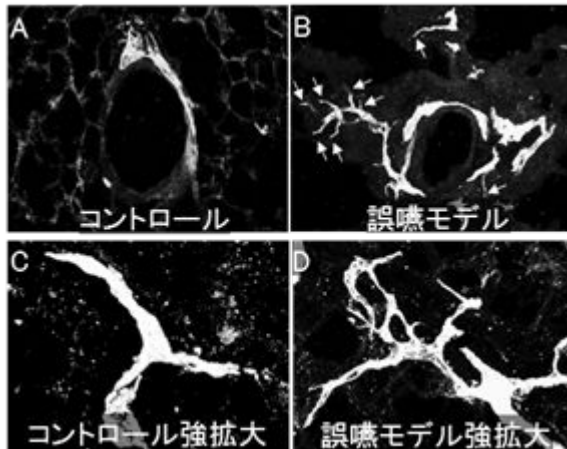
血管新生は主に vascular endothelial growth factor (VEGF: 血管上皮成長因子)-A により、リンパ管新生は VEGF-C、VEGF-D により促進されることが明らかとなっている。

リンパ管は LECs(lymphatic endothelial cells: リンパ管内皮細胞)より形成され、vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR3: 血管上皮成長因子受容体 3)が特異的に発現している。リンパ管新生に必要な LECs の遊走や萌芽は、VEGFR3 のリガンドである VEGF-C や VEGF-D が結合すると起こる (Alitalo; nature medicine.2011,17 (11)1371-80)。

リンパ管はさまざまな抗原や、活性化された抗原提示細胞をリンパ節へ運び、リンパ節からの免疫応答細胞を血中に放出する。またリンパ管は不要なリンパ液や間質液の排液の役割を担っているが、機能不全になると組織中へリンパ液の蓄積が起こり、免疫機能の低下や、リンパ浮腫として知られる組織の腫脹をもたらす。リンパ浮腫の動物モデルにおいてリンパ節移植と VEGF-C を投与したところ、リンパ管新生に伴うリンパ浮腫の著明な改善が見られた (Lähteenvuo, M. et al; Circulation.2011 123, 613-20)。

慢性炎症性疾患にリンパ管機能不全による免疫機能不全が関与すると報告されている。クローン病では、リンパ管周囲で肉芽腫の形成や脂肪沈着がおこり、それがリンパ管からの炎症細胞輸送を阻害している可能性がある (von der Weid et al; Curr.Opin.Gastroenterol.2011,27,335-341)。

我々が作成した通常型誤嚥性肺炎マウスモデルでは気道及び肺に異常な形態のリンパ管の増生が見られた (図参照)。異型なリンパ管では免疫細胞がリンパ管内へそしてリンパ節へ移動できず免疫機能が低下し、間質液の排液機能も低下し、慢性炎症が持続し悪循環を生じていると考えた (Nihei, Okazaki et al; J Pathol. 2015 Mar;235(4):632-45 当時は投稿中)。



我々は以前 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) が骨格

筋を刺激して VEGF-A 産生を誘導して悪性腫瘍の血管新生を促進し (Okazaki et al; J. Immunol.2005,174;7531-38) M-CSF が骨格筋細胞内シグナル伝達経路の PI3K / Akt、及び ERK/MAPK 経路を介して VEGF-A 産生を誘導すると報告した (Okazaki et al; Am J Pathol 2007 171 1093-1103)。

2. 研究の目的

マクロファージや骨格筋などが VEGF-C, VEGF-D を産生すると報告されているがその産生を誘導してくるサイトカインは不明である。そこで今回、われわれは M-CSF に着目し、マクロファージ・骨格筋における M-CSF 誘導性の VEGF-C, VEGF-D の産生、その誘導に関与するシグナル伝達、そしてマウス疾患モデルで M-CSF 誘導性のリンパ管新生亢進が病態を悪化させるか検討した。

3. 研究の方法

(1) M-CSF 添加によるマクロファージ、骨格筋細胞株からの VEGF-C, VEGF-D 産性の評価

M-CSF によるマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 からの VEGF-C, VEGF-D 産性誘導
マウスマクロファージの細胞株である RAW264.7 に M-CSF 100 ng/ml を添加し、24、48、72、96、120 時間後に上清と細胞を回収し。上清中の VEGF-C, VEGF-D のタンパク量を ELISA 法で、mRNA の発現量を定量的 RT-PCR で測定し培養液のみのコントロールと比較する。

M-CSF 添加による C2C12 からの VEGF-C, VEGF-D 産性誘導

筋芽細胞株である C2C12 を無血清培地で分化させ、myotube にしたのち M-CSF で刺激し上記と同様の測定を行う。

(2) M-CSF 誘導性 VEGF-C, VEGF-D のリンパ管内皮の増殖・細胞死・tube formation への影響の解析

VEGF-C, VEGF-D のリンパ管内皮の増殖への影響

上記の M-CSF 刺激で得られた培養上清 (高濃度の VEGF-C, と -D を含有) とリンパ管上皮細胞を 72、96、120 時間培養し、各々の時点でリンパ管内皮細胞の数を water-soluble tetrazolium (WST) assay で定量化しコントロール培養上清群と比較する。

VEGF-C, VEGF-D のリンパ管内皮の細胞死への影響

上記の M-CSF 刺激で得られた培養上清 (高濃度の VEGF-C, と -D を含有) とリンパ管上皮細胞を 72 時間培養した後、過酸化水素 (H2O2) を加え、H2O2 により誘導される細胞死からどれだけ保護されるか、細胞数を WST assay で定量化しコントロール培養上清群と比較する。

VEGF-C, VEGF-D のリンパ管内皮の tube

formation への影響

上記の M-CSF 刺激で得られた培養上清（高濃度の VEGF-C, と -D を含有）でリンパ管上皮細胞を培養し tube formation への影響を顕微鏡で 2 4 時間毎に観察しコントロール培養上清群と比較する。

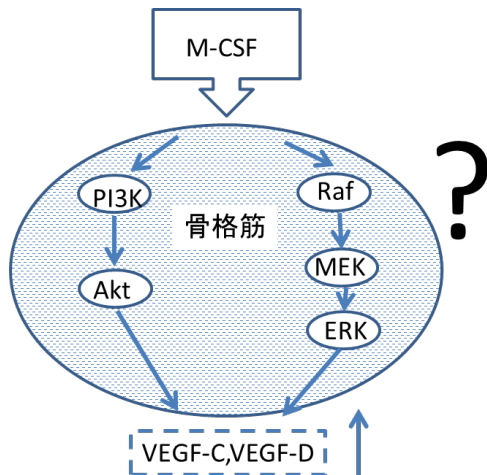
(3)M-CSF 誘導性 VEGF-C,VEGF-D 産生の細胞内シグナル伝達解析

Akt 阻害剤添加による VEGF-C,VEGF-D 産生への影響

マクロファージ細胞株 RAW264.7 及び無血清培地で分化させ myotube にした筋芽細胞株の C2C12 を Akt 阻害剤の LY294002 及び M-CSF と共培養し、24,48,72,96,120 時間後に培養上清を回収する。ELISA 法で VEGF-C, -D 濃度を計測し M-CSF 添加培養群、培養液のみのコントロール群、Akt 阻害剤添加培養群、M-CSF、Akt 阻害剤添加培養群の 4 群を比較する。

ERK 阻害剤添加による VEGF-C,VEGF-D 産生への影響

上記と同様の実験を ERK 阻害剤の PD98059 を添加して行う。



(4)M-CSF 投与マウスにおける VEGF-C, と VEGF-D の発現と局在組織の評価

In vivo の実験で以前マウスに M-CSF を投与したところ 5 日間連続投与後に最も VEGF-A の血中濃度が上昇していた。同様に最大 5 日間連続で M-CSF を投与し 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日投与群を作成し末梢血を回収し血清中の VEGF-C と -D の上昇を ELISA 法で計測する。また、末梢血中で最大濃度の日に肺、呼吸筋（横隔膜）、骨格筋（前脛骨筋）、心筋、単球系細胞、腎臓、脾臓、肝臓、小腸、大腸等を取り出し mRNA を抽出し VEGF-C と -D の定量的 RT-PCR につけ、in vivo でどの組織が M-CSF 誘導性に VEGF-C と -D を産生するのか同定する。

(5)通常型誤嚥性肺炎マウスモデルにおける M-CSF のリンパ管新生増強効果

誤嚥性肺炎モデルは麻酔をかけたマウスに生食に溶解し塩酸で PH1.6 にしたペプシン(2 mg/ml)を 25ml、と生食に溶解した LPS(2.5

mg/ml) 20ml を週に 5 日、4 週連続点鼻して作成する。M-CSF は 200 μ g/kg を週 5 日筋肉内注射する。4 週後に殺し心臓からカニユーラを挿入し 1% 濃度のパラホルムアルデヒドで 2 分間還流後肺を摘出し 30% スクロース液中で震盪し包埋する。凍結切片をリンパ管マーカーの抗 VEGFR-3 抗体で免疫染色しリンパ管の肺に占める割合を Image J 画像ソフトウェアで定量化する。また症状の推移を体重変動、死亡率、酸素飽和度モニターで評価する。

4. 研究成果

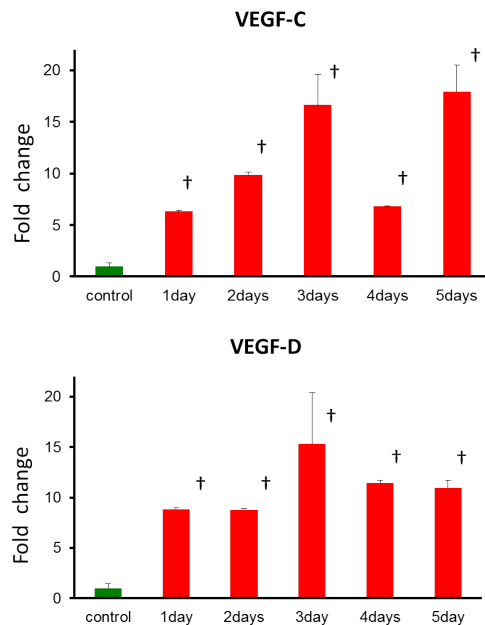
(1)M-CSF 添加によるマクロファージ、骨格筋細胞株からの VEGF-C,VEGF-D 産性の評価

マウスマクロファージの細胞株である RAW264.7 に M-CSF 100 ng/ml を添加し、24、48、72、96、120 時間後に mRNA の発現量を定量的 RT-PCR で測定したところ、コントロール群と比較して VEGF-C と VEGF-D に有意な上昇はみられなかった。そのため(2)(3)の実験の予定を変更とし、(4)の実験を行った。

(4)M-CSF 投与マウスにおける VEGF-C, と VEGF-D の発現と局在組織の評価

M-CSF 投与により骨格筋（下図）横隔膜、心筋にて有意に VEGF-C,VEGF-D の発現上昇がみられた。それぞれ最大となる日数は異なっていた。

また ELISA 法でも血清中の VEGF-C は有意に上昇がみられた。



今後の予定としては in vitro の実験では細胞株を変えて（マウス細胞からラット細胞への変更）、(1)の実験を同様の手順で行う。

M-CSF 誘導性の VEGF-C,D の発現上昇が見られる場合、阻害剤などを用いてシグナル解析を予定する。

In vivo の実験ではマウスの検体数を増やし再検討を行う。また炎症疾患モデルを作成し M-CSF 投与による、疾患への影響を検討する。

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)

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

小林 誠 (Kobayashi, Makoto)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：10644809

(2)研究分担者

岡崎 達馬 (Okazaki, Tatsuma)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：40396479

(4)研究協力者

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生
二瓶 真由美 (Nihei, Mayumi)