

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460253

研究課題名(和文) 生理的リンパ管・静脈吻合の形成機構と機能的意義

研究課題名(英文) Developmental mechanism and functional significance of physiological lymphovenous anastomosis.

研究代表者

平島 正則 (Hirashima, Masanori)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40383757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生理的リンパ管・静脈吻合の形成機構と機能的意義、ならびに末梢組織中の血管・リンパ管吻合形成による重度浮腫の改善効果とリンパ管形成に果たす役割について解析した。生理的リンパ管・静脈吻合の形成がAspp1によって制御されていること、胎仔の発生と生存維持に必須であること、その異常はリンパ管・血管吻合を非侵襲的に作製しても改善されないことを明らかにした。新規ガイダンス分子 Semaphorin 3Gは生理的リンパ管・静脈吻合の形成には不要であるが、Nrp2/PlexinD1受容体複合体を介してリンパ管内皮細胞に反発シグナルを与えて分布を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the developmental mechanism and functional significance of physiological lymphovenous anastomosis, and whether lymphovenous anastomosis in peripheral tissues improves severe embryonic edema caused by the loss of physiological lymphovenous anastomosis. We found that the formation of physiological lymphovenous anastomosis is regulated by Aspp1, that it is essential for fetal development and survival, and that the abnormality caused by its loss is not improved by lymphovenous anastomosis in peripheral tissues. Although the novel guidance molecule Semaphorin 3G is dispensable for formation of physiological lymphovenous anastomosis, we found that it regulates lymphatic vascular distribution by providing repulsion signals to lymphatic endothelial cells via Nrp2/PlexinD1 receptor complex.

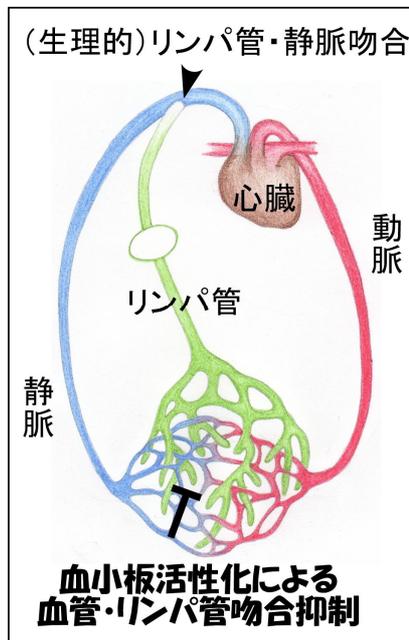
研究分野：血管生物学

キーワード：マウス 遺伝子変異 発生 胎生期浮腫 リンパ管

1. 研究開始当初の背景

血管系は血液を循環させて末梢組織でガスや栄養素・老廃物の交換を促進する。リンパ管系は末梢組織で盲端から余剰の組織間液・タンパク・脂質・免疫細胞などを取り込んで運搬し、静脈角の生理的リンパ管・静脈吻合部位を介してリンパを血管系に還流する。血管系とリンパ管系がお互いに独自のネットワークを形成し、限定された場所だけで吻合することは、脈管系の統合的機能において重要である。近年の研究で、末梢組織中で血管・リンパ管の吻合を抑制する機構に血小板活性化が関わっていることが明らかになり、脈管学と血液学の接点として注目を集めている(図1)。一方で、生理的リンパ管・静脈吻合部位の形成機構については不明であった。

図1. 血管とリンパ管の吻合



われわれは、内皮細胞特異的に発現する新規分子として Aspp1 (ankyrin-repeats-, SH3-domain- and proline-rich-region-containing protein) を同定し、Aspp1 ノックアウト(Aspp1<sup>-/-</sup>)マウスが胎生期リンパ管形成の遅延による頂部浮腫を示すことを報告した。この時点で解析した Aspp1<sup>-/-</sup>マウスにおいては、リンパ管が徐々に形成されるとともに胎生期浮腫は消失し、マウスは成体まで正常に発育した。しかしながら、C57BL/6 遺伝子背景へ戻し交配したところ、頂部以外にも重度の浮腫を呈するものが現れ、成体までの生存率も低下した。重度の浮腫を呈する Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔では、頸部リンパ管の著明な拡張が認められ、生理的リンパ管・静脈吻合の形成不全が示唆された。

また、血小板活性化シグナルに重要な CLEC-2 受容体あるいはホスホリパーゼ C 2 のノックアウト (Plcg2<sup>-/-</sup>) マウスを解析し、血小板活性化不全状態では末梢組織中に血

管とリンパ管の異常吻合がランダムに形成されリンパ管内に赤血球が認められることが分かってきた。このような異常にもかかわらず、Plcg2<sup>-/-</sup>マウスは成体まで発育することができる。つまり、Plcg2<sup>-/-</sup>マウスを用いることによって、体液調節の恒常性維持機構を過度に損なうことなく、末梢組織中に血管・リンパ管吻合を作製すること(非侵襲的血管・リンパ管吻合形成)が可能である。

2. 研究の目的

遺伝子改変マウスモデルを用いて、生理的リンパ管・静脈吻合の形成機構と機能的意義ならびに末梢組織中の血管・リンパ管吻合形成による重度浮腫の改善効果とリンパ管形成に果たす役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)野生型マウスと Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔における生理的リンパ管・静脈吻合形成の解析

胎生 10.5 ~ 12.5 日目の野生型マウスおよび Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔を採取して、血管およびリンパ管内皮細胞のマーカー (PECAM-1, Prox1, VEGFR3 など) でホルムマウント染色した。Benzyl alcohol/Benzyl benzoate (BABB) 混合液で透明化した後に、共焦点レーザー顕微鏡で頸部静脈周囲のリンパ管形成を三次元的に解析した。

胎生 14.5 ~ 16.5 日目の野生型マウスおよび Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔を採取して、冠状断した後に、血管およびリンパ管内皮細胞のマーカー (PECAM-1, Prox1, Lyve-1 など) や弁特異的なマーカーであるインテグリン 9 でホルムマウント染色した。BABB 混合液で透明化した後に、共焦点レーザー顕微鏡で生理的リンパ管・静脈吻合形成部位と吻合弁の有無を三次元的に解析した。

(2)Aspp1<sup>-/-</sup>マウスの生理的リンパ管・静脈吻合形成と浮腫の程度・生存率の統計学的解析

胎生 15.5 日目以降の Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔には、頸部リンパ管の大きさは正常で軽度の浮腫をきたす群と頸部リンパ管の著明な拡張を伴い重度の浮腫をきたす群が存在する。これら 2 群の内、前者は成体まで発育し、後者は胎生致死となると予想されたため、それらの関連を解析した。

(3)Plcg2<sup>-/-</sup>マウスの非侵襲的血管・リンパ管吻合形成を用いて、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスの生理的リンパ管・静脈吻合不全を代償させる解析

Plcg2<sup>-/-</sup>マウスを用いることによって、体液調節の恒常性維持機構を過度に損なうことなく、末梢組織中に非侵襲的血管・リンパ管吻合形成することが可能である。Aspp1<sup>+/-</sup>マウスと Plcg2<sup>+/-</sup>マウスの交配で得た Aspp1<sup>+/-</sup>; Plcg2<sup>+/-</sup>マウスの雌雄を交配して Aspp1<sup>-/-</sup>; Plcg2<sup>-/-</sup>マウスを作製した。末梢組織でリンパを静脈に流すことによって、浮腫が劇的に改

善し生存率を高めることに繋がる可能性について解析した。胎生 14.5 日目の胎仔において皮膚や静脈角における血管とリンパ管を解析するために、それぞれの内皮細胞に特異的なマーカー (PECAM-1, Prox1, Lyve-1 など) でホルマウント染色して、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

(4)Semaphorin 3G (Sema3G) の生理的リンパ管・静脈吻合の形成に果たす役割とリンパ管形成における役割の解析

胎生 15.5 日目において新規ガイドインス因子 Sema3G<sup>-/-</sup>マウス胎仔を採取して、血管およびリンパ管内皮細胞のマーカー (PECAM-1, Prox1, Lyve-1 など) でホルマウント染色した。BABB 混合液で透明化した後に、共焦点レーザー顕微鏡で生理的リンパ管・静脈吻合形成部位と吻合弁の有無を三次元的に解析した。また、標本作製時に得られる胎仔皮膚を採取して、血管およびリンパ管内皮細胞のマーカー (PECAM-1, VEGFR3 など) や平滑筋細胞のマーカーである  $\alpha$ -平滑筋アクチンでホルマウント染色し、フラットマウント標本作製して共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1)

胎生 11.5 日目には頸部に Prox1 陽性リンパ管内皮細胞を多数認めたが、野生型と Aspp1<sup>-/-</sup>型の間で数の差異は認められなかった。つまり、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスにおいて、リンパ管内皮細胞の分化は正常だった。初期リンパ管が形成される部位において、Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔にはリンパ管内皮細胞で構成される島様構造が多数認められ、管腔形成過程で融合異常が生じていることが明らかになった。

野生型および軽度の浮腫を呈する Aspp1<sup>-/-</sup>マウスでは Prox1 陽性細胞が集積する弁を認めただのに対して、重度の浮腫を呈する Aspp1<sup>-/-</sup>マウスではリンパ管・静脈吻合弁の欠損と頸部リンパ管の著明な拡張が明らかになった。

(2)Aspp1<sup>+/-</sup>マウスと Aspp1<sup>-/-</sup>マウスの交配で得られたマウス数

解析時期	全体生存	+/-生存	-/-生存	-/-生存の表現型		-/-死亡
				軽度の浮腫	重度の浮腫	
E13.5	9	6	3	2	1	0
E14.5	58	23	35	21	14	0
E15.5	2h7	15	10	6	4	2
E16.5	49	28	19	10	9	2
E17.5	4	2	1	0	1	1
E18.5	48	24	13	11	2	11
P21	108	73	35	ND	ND	ND

E:胎生、P:出生後、ND:算出せず

解析時点で死亡している Aspp1<sup>+/-</sup>マウスはいなかった。Aspp1<sup>+/-</sup>マウスと Aspp1<sup>-/-</sup>マウスを交配した場合、Aspp1<sup>+/-</sup>マウスと Aspp1<sup>-/-</sup>マウスをそれぞれ 50%ずつ得ることが期待される。Aspp1<sup>+/-</sup>マウスに致死例はみられなかったため、Aspp1<sup>-/-</sup>マウス生存数を Aspp1<sup>+/-</sup>マウス生存数で割った値が Aspp1<sup>-/-</sup>マウス生存率に相当すると算出できる。胎生 18.5 日目および出生後 21 日目での Aspp1<sup>-/-</sup>マウス生存率は、それぞれ 54% (13/24) および 48% (35/73) であった。

一方で、胎生 15.5 日目および胎生 16.5 日目の Aspp1<sup>-/-</sup>マウスで全体 (軽度の浮腫+重度の浮腫+死亡) 数に対する軽度の浮腫を示した数の割合がそれぞれ 50% (6/12) と 48% (10/21) だった。これらの結果から、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスの約 50%において、生理的リンパ管・静脈吻合が形成されず頸部リンパ管の著明な拡張を伴う重度の浮腫を示して致死となることが明らかになった。これまでは生理的リンパ管・静脈吻合形成の機能的意義は明らかにされていなかったが、本研究結果によって胎仔の発生と生存維持に必須であることが明らかになった。

(3)Aspp1<sup>+/-</sup>;Plcg2<sup>+/-</sup>マウスの雌雄を交配して得られる胎仔を胎生 14.5 日目と胎生 16.5 日目に採取した。胎生 14.5 日目において Aspp1<sup>-/-</sup>;Plcg2<sup>-/-</sup>マウスの外観はそれぞれの欠損マウスを合わせたものであったが、胎生 16.5 日目には採取できた 3 匹すべてが子宮内で死亡していた。Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔にはリンパ管内皮細胞で構成される島様構造が多数認められ、Plcg2<sup>-/-</sup>マウス胎仔にはリンパ管内に赤血球の存在が認められた。Aspp1<sup>-/-</sup>;Plcg2<sup>-/-</sup>マウス胎仔にはその両方の異常が認められた。これらの結果から、胎生期において末梢組織内にリンパ管・血管吻合を作製しても、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスの病態は改善するどころか致死となることが明らかになった。

(4)Sema3G<sup>-/-</sup>マウスの生理的リンパ管・静脈吻合部位を解析したが、異常は認めなかった。一方で、Sema3G<sup>-/-</sup>マウスの胎仔皮膚においてリンパ管が動脈と異常に近接してランダムなリンパ管網が形成されない表現型を見出した。このことから Sema3G がこれまでに報告例のないリンパ管の分布を制御する因子である可能性が見えたため、さらに解析を進めた。Sema シグナルを伝達する膜受容体 PlexinD1 を欠損するマウスでも同様の表現型が見られること、PlexinD1 は Sema3G に直接結合する受容体 Nrp2 と複合体を形成してシグナルを伝えることを明らかにした。Sema3G は動脈内皮細胞特異的に発現する分子であり、PlexinD1 陽性リンパ管内皮細胞が動脈上を遊走した後で、動脈から離れてランダムに分布してリンパ管網を形成する際に作用する反発分子であることが明らかになった。

これらの結果は Sema3G/Nrp2/PlexinD1 シグナル経路がこれまでに報告例のない反発シグナルを与えてリンパ管分布を制御するという発見につながった。発生学的知見として重要であるのみならず、リンパ管分布を抑制することによってがんのリンパ節転移や移植片拒絶反応などの病態を制御できる可能性がある。

#### 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)

[雑誌論文](計2件)

Liu X, Uemura A, Fukushima Y, Yoshida Y, Hirashima M. Semaphorin 3G provides a repulsive guidance cue to lymphatic endothelial cells via Neuropilin-2/PlexinD1. Cell Rep, 査読有, 17, 2016, 2299 - 2311  
DOI: 10.1016/j.celrep.2016.11.008.

Otowa Y, Moriwaki K, Sano K, Shirakabe M, Yonemura S, Shibuya M, Rossant J, Suda T, Kakeji Y, Hirashima M. Flt1/VEGFR1 heterozygosity causes transient embryonic edema. Sci Rep, 査読有, 6, 2016, 27186  
DOI: 10.1038/srep27186.

[学会発表](計5件)

平島正則、リンパ管パターンニングに関わる Semaphorin/Plexin シグナル、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017.3.29、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

Liu X, Uemura A, Fukushima Y, Yoshida Y, Hirashima M. Semaphorin 3G provides a repulsive guidance cue from arteries to Plexin D1<sup>+</sup> lymphatic endothelial cells in mouse embryonic skin. 第 24 回日本血管生物医学会学術集会、2016.12.9、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

平島正則、リンパ管パターンニングに関わる Semaphorin/Plexin シグナル、第 40 回日本リンパ学会総会、2016.6.25、東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

平島正則、Platelet activation blocks misconnection of lymphatic to blood vessels in mouse peripheral tissues by promoting lymphatic endothelial cell retraction via TGF-β signals. 第 89 回日本薬理学会年会、2016.3.9、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

平島正則、体液調節異常と胎生期浮腫をきたす遺伝子変異マウスの解析、第 38 回日本リンパ学会総会、2014.6.21、北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール(東京都港区)

[その他]

研究代表者研究室ホームページ

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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平島 正則 (HIRASHIMA, Masanori)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：40383757

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

劉 歆儀 (LIU, Xinyi)  
音羽 泰則 (OTOWA, Yasunori)  
向 健太 (MUKAI, Kenta)