

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460362

研究課題名(和文)炎症部位でのリンパ管新生におけるCLEC-2の役割を解明する

研究課題名(英文)The roles of CLEC-2 in lymphangiogenesis at the sites of inflammation

研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：00432154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症部位でのリンパ管新生におけるCLEC-2の役割を検討するため、3% Dextran Sulfate Sodium (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスを作成し検討した。CLEC-2の発現は、抗CLEC-2抗体を腹腔内投与する手法を用いて完全に抑制した。大腸炎の病像、炎症の程度、大腸重量、炎症部位のリンパ管密度はCLEC-2発現の有無による差異は認められなかった。炎症部位の血管密度はCLEC-2発現抑制マウスで有意に低下していた。炎症部位に於ける血管密度とリンパ管密度にCLEC-2発現の有無で差異が認められることから、炎症部位での脈管新生にCLEC-2が何らかの役割を担うことが予想される。

研究成果の概要(英文)：The role of cellular CLEC-2 in lymphangiogenesis at the site of inflammation was investigated. In this study, 3% Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced enterocolitis mice were used. CLEC-2 expression was completely terminated by injection of anti-CLEC-2 antibody intraperitoneally. There was no significant difference in clinical manifestations, severity of inflammation, gut weight, or density of lymphatic vessels at the site of inflammation in the presence or absence of CLEC-2. Density of blood vessels at the site of inflammation was significantly decreased. Since the density of blood vessels was decreased while that of lymphatic vessels was not in cellular CLEC-2 terminated mice, it is obvious that CLEC-2 plays a role in angiogenesis at the site of inflammation.

研究分野：内科学

キーワード：CLEC-2 血管新生 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は新規血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)を同定した(文献1)。また、その生体内リガンドの一つとして、リンパ管内皮上に発現するポドプラニン(Plg)を2007年に世界で最初に同定し、報告した(文献2)。ポドプラニンは癌細胞に発現し血小板を活性化して癌転移を促進するため、抗転移薬の標的として有望視されていたが、この2分子の結合抑制で血行性転移が著減することを示した(文献3)。ポドプラニンは脈管系においてはリンパ管内皮特異的に発現する。CLEC-2欠損マウス胎仔を解析したところ、リンパ管と血管が異常な吻合を形成してリンパ管内に血液が認められ、リンパ機能不全による全身性の浮腫も著明であった。これらのことから、CLEC-2に依存する血小板活性化が胎生期のリンパ管・血管分離に不可欠であることがわかった。さらにリンパ管内皮のポドプラニンと結合したCLEC-2により活性化された血小板が、TGF-β等を放出し、リンパ管内皮の遊走や増殖を抑制し系状仮足退縮を促進することでリンパ管と血管の吻合を抑制するという機序も見出した(文献4,文献5,未発表)。これらのことから、血小板 CLEC-2 はリンパ管新生に重要な役割を担っている事が明らかとなった。リンパ管新生は胎生期だけでなく、成体の炎症部位にも起きている。しかしその詳細は解明されていない。

(2) リンパ管新生は胎生期のみならず、成体においてはアトピー性皮膚炎や喘息等の炎症性疾患の病巣で惹起され、新生リンパ管の演じるドレナージ機能は炎症の終息に必要となる。CLEC-2は血小板膜上で同定された受容体であるが、炎症組織においてはマクロファージ(Mφ)にも発現している。これまでの知見と併せ、これらの細胞上に発現するCLEC-2が、炎症巣でのリンパ管新生を介して炎症反応の調節に関わっている可能性があると考え今回の検討を行った。

2. 研究の目的

- (1) CLEC-2は炎症巣でのリンパ管新生にどのような役割を演じているのか検討する。
- (2) CLEC-2の有無が炎症の程度や治癒までの期間に影響を与えるか複数の炎症モデルで検討する。
- (3) そのメカニズムを解明する。
- (4) CLEC-2を標的とした抗炎症作用の可能性を探る。

3. 研究の方法

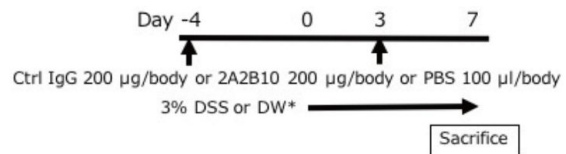
(1) 炎症モデル動物として、3% Dextran Sulfate Sodium (DSS)を飲水に添加し自由飲水により大腸炎を惹起する潰瘍性大腸炎モデルマウスを作成した。

(2) 抗 CLEC-2抗体(2A2B10抗体)を腹

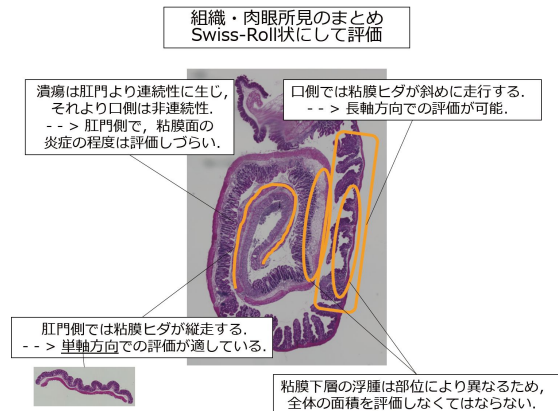
腔内投与することにより、マウス細胞表面のCLEC-2発現を完全に抑制し(文献6)、CLEC-2発現の有無による臨床所見、血算、大腸重量、病理組織所見、の差異について献灯した。

4. 研究成果

(1) 礎検討としてモデルマウス作成の条件検討を行った。マウスは8週齢のC57/BL6を用いた。飲水期間は9日間とすると全身状態不良のマウスが多く発生する事から7日間とした。1ケージに3匹飼育すると咬傷が多発することから1ケージ1匹飼育とした。抗体投与は文献6に準じた。



組織標本はSwiss-Roll状とし口側と肛門側より1cmの部位で評価した。

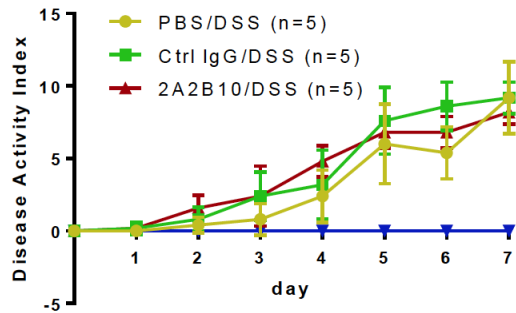


PBS投与大腸炎マウス(PBS/DSS)、コントロールIgG投与大腸炎マウス(Ctrl IgG/DSS)、2A2B10抗体投与大腸炎マウス(2A2B10/DSS)、2A2B10抗体投与マウス(2A2B10/DW)を作成し上記4項目を比較した。

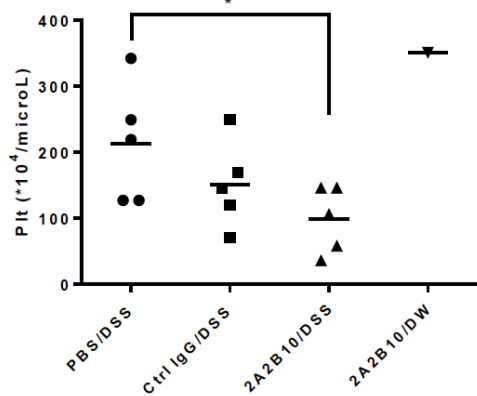
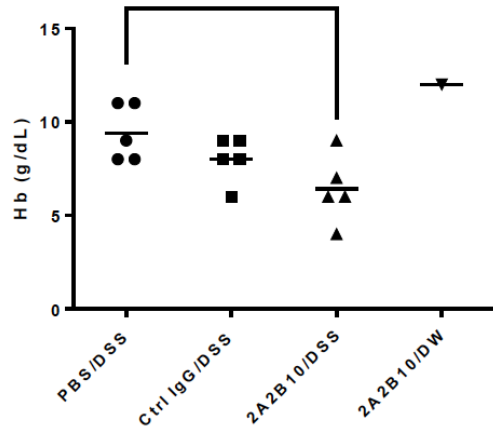
(2) 臨床所見: いずれの群も7日目時点で約10%の体重減少が見られた。血便の程度や軟便の性状に明らかな差異は認められなかった。これらの所見を元にして下記のDisease activity indexを指標に比較したが有意な差異は認められなかった。

Disease activity index

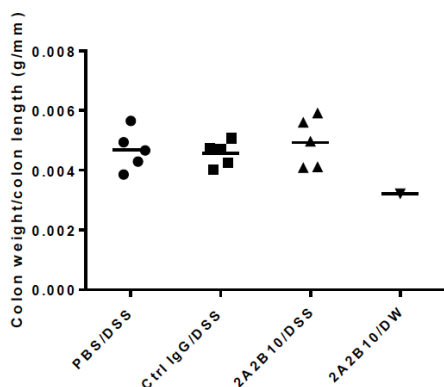
Score	Rectal bleeding	Stool consistency	Weight loss
0	Normal	Normal	None
1			1-5%
2	Slight bleeding	Loose stools	5-10%
3			10-20%
4	Gross bleeding	Watery diarrhea	>20%



(3) 血算：白血球数は有意差はみられなかったが、ヘモグロビン値と血小板数は 2A2B10 投与マウス出有意に低値隣った。

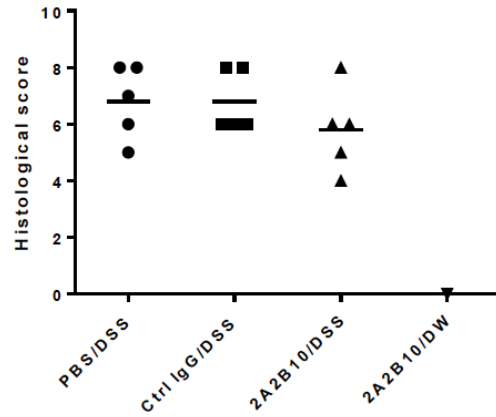


(4) 大腸重量：大腸炎モデルマウスでは浮腫により単位長さあたりの従量が増加していたが、有意差は認められなかった。

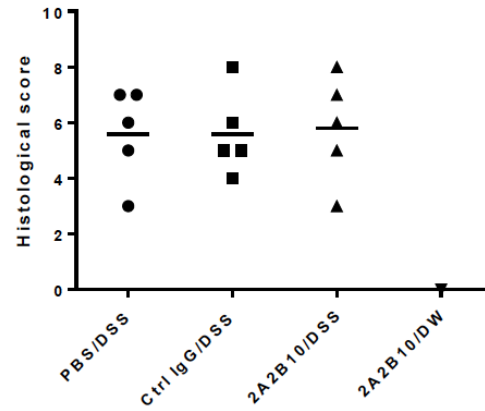


(5) 病理組織所見：炎症の程度、杯細胞の減少、潰瘍長から算出する Histological score を用いた。有意な差異は認められなかった。

肛門側 1 c m

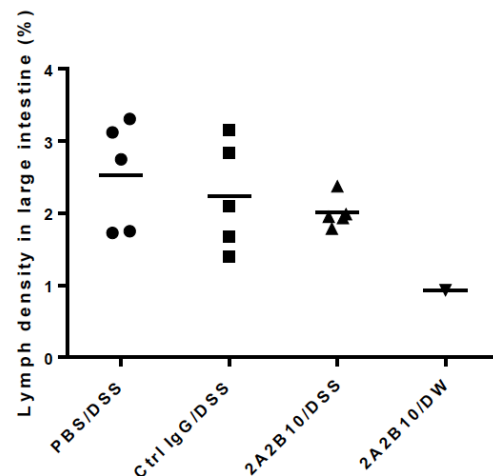


口側

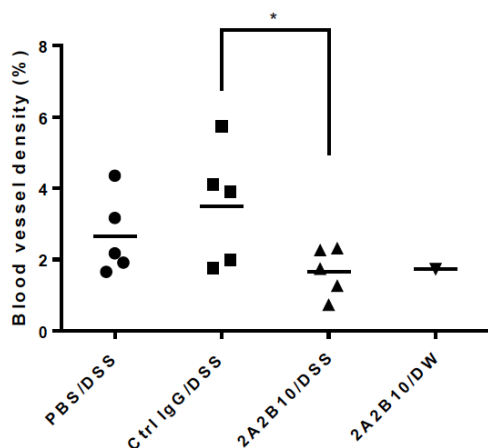


最後にリンパ管密度と血管密度についても免疫染色を行い評価した。血管は CD31、リンパ管は Lyve-1 を染色し、管腔構造の面石を ImageJ で算出した。予想に反しリンパ管密度は CLEC-2 の発現の有無にかかわらず有意差は認められなかった。血管密度は 2A2B10 抗体投与群で有意に低くなっていた。

リンパ管密度 (口側)



血管密度 (口側)



肛門側の検体は脈管が乏しく評価不能であった。

(6)まとめ:大腸炎モデルでは、CLEC-2発現の有無による疾患活動性や組織学的な炎症の程度や、浮腫を示す単位あたりの重量の差異は認められなかった。ヘモグロビン値はCLEC-2で有意に低値だったが、組織学的に有意な差異が認められないことから2A210抗体によるCLEC-2発現抑制マウスにみられる粘膜易出血性が影響した可能性がある。Ctrl IgG/DSSと比較して2A2B10/DSSでは血管密度が有意に減少する一方、リンパ管密度は減少していないことから、炎症部位での脈管形成にCLEC-2が何らかの役割を担っている可能性は否定できない。

<引用文献>

Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y et al., Blood 107:542-9, 2006

Suzuki-Inoue K, Inoue O, Hirashima M, Ozaki Y et al., Journal of Biological Chemistry 282:25993-6001, 2007

Kato Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y et al., Cancer Science 99:54-61, 2008

Suzuki-Inoue K, Inoue O, Hirashima M, Ozaki Y et.al., Journal of Biological Chemistry 285:24494-507, 2010

Osada M, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Hirashima M, Ozaki Y et.al., Journal of Biological Chemistry 287:22241-52, 2012

Shirai T, Inoue O, Suzuki-Inoue K et.al., Journal of Thrombosis and Haemostasis 15:513-25, 2017

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 00432154

(2)研究分担者

井上 克枝 (INOUE-SUZUKI, Katsue)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 10324211

尾崎由基男 (OZAKI, Yukio)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号: 30134539

(3)連携研究者

なし:

(4)研究協力者

大竹 志門 (OOTAKE, Shimon)