

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15417

研究課題名（和文）リンパ管新生阻害因子による炎症調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of negative regulator for lymphangiogenesis during inflammation

研究代表者

加藤 大祐（Kato, Daisuke）

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70887364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：近年、炎症の収束にリンパ管が重要な働きをする事が明らかになってきた。炎症時にリンパ管新生を促進する因子についてはVEGF-Cを含め多数報告されてきたが、リンパ管新生を抑制する因子については分かっていなかった。

申請者らは炎症時にリンパ管新生を阻害する因子を探索し、細胞外マトリクスの1つであるTenascin-Cが炎症早期のリンパ管新生を抑制することを発見した。Tenascin-Cはインテグリンを介したp38 MAPKのリン酸化を誘導し、リンパ管内皮細胞の増殖の抑制、アポトーシスの誘導に関わることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症時のリンパ管新生は、さらに炎症性疾患の治療標的として注目を浴びている。リンパ管新生のnegative regulatorについては分かっていなかったが、Tenascin-Cがnegative regulatorとして働くことがわかった。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become clear that lymphatic vessels play an important role in the resolution of inflammation. Lymphangiogenic factors, including VEGF-C, have been reported, but little is known about the factors that inhibit lymphangiogenesis during inflammation. The applicant searched for a negative regulator of lymphangiogenesis during inflammation, and found that Tenascin-C, an extracellular matrix protein, inhibits lymphangiogenesis in the early stage of inflammation. Tenascin-C bound to integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and induced phosphorylation of p38 MAPK, thereby suppressing proliferation and promoting apoptosis of lymphatic endothelial cells.

研究分野：病理

キーワード：Tenascin-C リンパ管 negative regulator 炎症 インテグリン アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

炎症は、感染症や組織の損傷、その他の外部刺激に応答して生体の恒常性を維持する複雑な生物学的プロセスである。近年、炎症制御の新しい機構としてリンパ管新生が注目を浴びている。炎症が起きている組織ではリンパ管は炎症細胞や組織液を炎症が起きている組織から回収することで、炎症の収束に関わる。VEGF-C およびその受容体である VEGFR-3 はリンパ管内皮細胞の増殖を強力に促進する因子であり、リンパ管新生の制御因子として知られている。炎症モデルマウスに VEGF-C を投与するとリンパ管新生が促進され炎症性疾患が改善する、あるいは VEGFR3 を阻害するとリンパ管新生が抑制され炎症性疾患が悪化するなど、リンパ管新生の制御の重要性が報告されている。このようにリンパ管新生を促進する因子(リンパ管新生促進因子)についてはよく研究されているが、炎症時のリンパ管新生の負の制御因子(リンパ管新生抑制因子)についてはほとんど知られていない。炎症過程におけるリンパ管形成の負の制御機構をより深く理解することは、新たな研究分野の開拓につながり、炎症性疾患の新たな治療戦略への示唆を与えるものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症組織でリンパ管新生を抑制する因子を同定するとともに、リンパ管新生抑制因子が炎症制御に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

In vivo のモデルとして尾部リンパ浮腫モデルマウスを使用する。またヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (LECs) を in vitro の解析に用いる。

## 4. 研究成果

リンパ管新生阻害因子を探索するため、尻尾の表皮を剥離して作成する尾部リンパ浮腫モデルマウスを用いて、リンパ管新生と炎症の関わりを経時的に評価した。その結果、表皮剥離後 14 日まではリンパ管新生はほとんど見られなかったが、剥離後 28 日の時点では多数のリンパ管が見られた。このことから、リンパ管新生阻害因子が存在するのであれば、表皮剥離後 14 日の時点で高発現していると推測した。そこでリンパ浮腫モデルの microarray data set(表皮剥離後 14 日時点でのサンプル)を用いて、網羅的に解析を行うと細胞外マトリクスタンパクの 1 つであるテネイシン-C(TNC)が高発現しており、リンパ管新生阻害因子の候補として同定した。

TNC は炎症早期に一過性に高発現するが、尾部リンパ浮腫モデルマウスでも剥離後 14 日目までは TNC が高発現(免疫染色・ELISA で確認)していたが、その後は発現が減少していた。また TNC が発現している領域では新生リンパ管は見られず、TNC 発現が低い病変では新生リンパ管が多数見られた。これらのことから TNC が時間的・空間的にリンパ管新生を負に制御している可能性が示唆された。

次に TNC-KO マウスを用いて、リンパ浮腫モデルを作成し、リンパ管新生と炎症の関係を調べた。WT と比較して TNC-KO マウスではリンパ管新生が亢進していた。また TNC-KO マウスでは組織へ浸潤する炎症細胞が減少し、リンパ浮腫も軽減していた。さらにリンパ管のドレナージ機能(組織液および炎症細胞の)も TNC-KO マウスで改善していた。これらのことから TNC は炎症におけるリンパ管新生の negative regulator であると考えられた。

TNC-KO マウスに外因性の TNC を投与し、リンパ管新生と炎症の関係を調べた。予想通り TNC 投与群ではリンパ管新生が抑制され、さらにリンパ浮腫が増悪し、組織へ浸潤する炎症細胞も増加していた。これらの結果から、TNC がリンパ管新生の negative regulator として作用し、炎症の制御に関わることが示された。

腹膜炎モデルマウスを用いた検討でも、TNC-KO マウスでリンパ管新生が増加していた。一方で、心臓、皮膚、腸管など正常の組織では WT と TNC-KO のリンパ管形成に差は見られず、TNC によるリンパ管への作用は病的組織に限られることが分かった。

次に、皮膚リンパ管内皮細胞(LECs)を用いて、TNC が LECs に及ぼす影響を in vitro で検討した。TNC は LECs の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。さらに TNC は LECs の管腔形成能や sprouting も抑制した。これらのことから TNC は in vitro でも LECs へ負に作用することがわかった。次にこのメカニズムについて検討を行った。TNC 投与でアポトーシス経路の 1 つとして知られる、p38 MAPK および ATF-2 のリン酸化が誘導されることが分かった。p38 MAPK 阻害剤を用いると、TNC による負の作用が減弱したことから、p38 MAPK のリン酸化が key pathway であると考えられた。さらに p38 MAPK のリン酸化には TGF- 受容体および TAK1 経路が必要であった。

以上の結果から、炎症時に TNC はリンパ管新生の negative regulator として、リンパ管新生を抑制し、炎症反応を持続させる働きがあることが分かった。さらに TNC は LECs の TGF シグナルを介した p38 MAPK のリン酸化を誘導し、増殖抑制やアポトーシスを引き起こすことで負に作用することが分かった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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