

要旨

【背景】

プロスタグランジン (PG) は、細胞膜に存在するアラキドン酸がホスホリパーゼ A₂ によって細胞質内に遊離されて産生される。アラキドン酸にシクロオキシゲナーゼ (COX) が作用すると、プロスタグランジン H₂ (PGH₂) が合成され、さらに PGE₂をはじめとする各 PG やトロンボキサン (TX) が合成酵素の活性に伴い合成される。

リンパ管新生は、間質液の排泄や代謝・免疫能の恒常性維持など様々な病態において近年、注目されている。炎症巣のリンパ管新生がプロスタグランジン (PG) E₂ で増強されることが知られてきているが、他の PG の役割については不明な点が多い。

そこで本研究では、マウスの腹腔内に炎症惹起物質を投与し、腹膜炎マウスを作成し、腹腔内の間質液の排泄に重要とされる横隔膜上のリンパ管に着目し、このリンパ管新生のメカニズムについて検討した。実験 1 としてシクロオキシゲナーゼ (COX-2) と膜結合型 PGE 合成酵素-1 (mPGES-1) に着目し、腹膜炎時のリンパ管新生の役割について検討した。さらに実験 2 として同様のモデルを用いてトロンボキサン(TX)受容体 (TP) シグナルに着目し、リンパ管新生における TXS-TP シグナリングの役割について検討した。

【方法】

7 週令 C57BL/6 マウスの腹腔内に大腸菌由来の LPS (25 μ g/mouse)を隔日投与し腹膜炎を作成した。横隔膜上のリンパ管を、抗 LYVE-1 抗体を用いて免疫組織学的に評価した。また、組織の遺伝子発現量を real time PCR 法を用いて検討した。さらに、実験 1 では mPGES-1 ノックアウト (KO) マウスを、実験 2 では TPKO マウスを用いて同様に検討を行った。

【結果および考察】

《実験 1》

野生型マウスにおいて、LPS を腹腔内に投与すると、経時的に横隔膜リンパ管の有意な新生を認められた。また、横隔膜組織の real time PCR 法による遺伝子発現量を調べると、リンパ管新生因子である VEGFR-3 や、VEGF-C、VEGF-D の発現の上昇が認められた。さらに、COX-2 や mPGES-1 の発現量も上昇した。そこで、COX-2 阻害薬であるセレコキシブの経口投与を行って腹膜炎を惹起させ同様に検討したところ、セレコキシブ投与群でリンパ管新生は有意に低下し、リンパ管新生因子についても遺伝子発現量の低下を認めた。これらの結果から、リンパ管新生は COX-2 およびその下流に存在する PG が関与していることが考えられた。

そこで、COX-2 と共に上昇が認められた、mPGES-1 に着目しその KO マウスで同様に腹膜炎モデルを作成し検討を行った。mPGES-1 KO マウスにおいて、リンパ管新生は有意に抑制されており、リンパ管新生因子にも低下が認められた。

次に、COX-2 と mPGES-1 が発現する細胞について検討した。免疫組織学的検討において、マクロファージのマーカーである CD11b と T 細胞のマーカーである CD3 ϵ を発現する細胞はそれぞれ COX-2 と mPGES-1 を共発現することが分かった。また、マクロファージと T 細胞に VEGF-C と VEGF-D の発現も認められた。

最後に、リンパ管新生の機能的な評価を行った。マウスの腹腔に FITC-デキストランを投与すると横隔膜のリンパ管を経由し、胸腔内のリンパ節に色素がドレナージされることが確認された。そこで、一定時間放置した後に腹腔内の残色素の蛍光強度を測定すると、野生型マウスの腹膜炎モデルでは、リンパ管を介したドレナージ作用が増強する一方で、KO マウスではドレナージ効果が減弱することが分かった。

以上の結果から、COX-2 由来の mPGES-1 はマクロファージや T 細胞を介して VEGF-C や VEGF-D を発現し、リンパ管新生を増強させていることが示唆された。

《実験 2》

一方、野生型腹膜炎マウスでは、横隔膜組織の real time PCR 法においてトロンボキサン合成酵素 (TXS) の発現も経時的に増加していることが分かった。そこで、実験 2 では TPKO マウスを使用し、リンパ管新生における TXS-TP シグナリングの役割について検討した。

始めに、選択的トロンボキサン A2 合成酵素阻害薬及び、トロンボキサン A2 受容体阻害薬を経口投与した腹膜炎マウスを作成し、リンパ管新生を評価した。薬剤の投与により、それぞれのマウスでリンパ管新生が抑制された。これらのことから、TXS-TP シグナリングはリンパ管新生に関与していることが示唆された。

そこで、TPKO マウスを用いて腹膜炎を惹起させ同様に検討を行うと、VEGF-C/D の発現減弱をともなうリンパ管新生の抑制を認めた。リンパ管新生の機能的な評価を行うために、実験 1 と同様にしてマウスの腹腔に FITC-デキストランを投与し、一定時間放置した後に腹腔内の残色素の蛍光強度を測定した。野生型マウスの腹膜炎モデルでは、リンパ管を介したドレナージ作用が増強する一方で、KO マウスではドレナージ効果が減弱することが分かった。

次に、TXS-TP シグナリングに関与する細胞種について検討した。TP 受容体は T リンパ球に存在することが知られていること、また、リポソームによりマクロファージを除去するとリンパ管新生が抑制されることから、マクロファージもリンパ管新生に寄与していることが考えられ、マクロファージと T 細胞に着目して以降の実験を行った。

野生型腹膜炎モデルマウスの横隔膜上には CD3 ϵ 陽性細胞 (T 細胞) と CD11b 陽性細胞 (マクロファージ) の集積が顕著に認められる一方で、TPKO マウスでは細胞の集積が有意に低下することが分かった。

免疫組織学的検討で、CD11b 陽性細胞と CD3 ϵ 陽性細胞に TP と VEGF-C/D の発現が確認された。そこで、マウスの腹腔から採取したマクロファージと、脾臓から採取した T 細胞に TP アゴニスト (U46619) の刺激を加えると、マクロファージからは VEGF-C と VEGF-D の発現が、T 細胞からは VEGF-C の発現が認められた。同様の細胞実験を、TPKO マウスを用いて行うとそれぞれの細胞における VEGF-C や VEGF-D の発現は抑制された。以上の結果からマクロファージと T リンパ球が TP 受容体を介して、リンパ管新生を増強させていることが示唆された。

最後に、リンパ管新生が骨髄由来の細胞によって増強されるかどうか、を検討するため骨髄移植モデルマウスを作成した。野生型マウスの骨髄を移植したマウスと、TPKO マウスの骨髄を移植したマウスで腹膜炎時の横隔膜上のリンパ管面積を定量すると、TPKO マウスの骨髄を移植し

たモデルで有意にリンパ管新生が抑制されることが分かった。以上の結果から骨髄から誘導されたマクロファージや T 細胞がリンパ管新生を主に増強させていることが明らかとなった。

【結論と展望】エンドトキシン誘発性の腹膜炎モデルにおいて、mPGES1 や TXS-TP シグナリングはリンパ管新生において重要であることが示唆され、リンパ管新生が関与する病態の治療標的となることが考えられた。