

学位論文要旨

氏名 津留世里



論文題目

RAMP1 signaling in immune cells regulates inflammation-associated lymphangiogenesis

(免疫細胞における RAMP1 シグナルの腹膜炎時リンパ管新生制御に果たす役割について)

指導教授承認印

岡本浩司



RAMP1 signaling in immune cells regulates inflammation-associated lymphangiogenesis
(免疫細胞における RAMP1 シグナルの腹膜炎時リンパ管新生制御に果たす役割について)

氏名 津留 世里

(以下要旨本文)

【背景】悪性腫瘍手術後や放射線治療後に発生するリンパ浮腫や炎症性腹水貯留は難治性で患者の QOL を損ねる。この病態にはリンパ管新生の抑制やリンパ管ドレナージ機能の障害などが関与している。リンパ管新生には組織間質のマクロファージやリンパ球などの免疫細胞の集積が関与しており、近年、神経系と免疫系が共通のリガンドや受容体を介してクロストークすることが注目されている。知覚神経から遊離される神経ペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、受容体活性調節蛋白 1 (RAMP1) を介して作用を発揮する。我々はこれまでに RAMP1 が集積免疫細胞に発現し、リンパ管新生を増強して創傷治癒を促進することを見出した。横隔膜のリンパ管は非常に発達しており、腹水を縦隔リンパ節に運ぶ主なドレナージルートであるが、RAMP1 シグナルが炎症時の横隔膜組織でのリンパ管新生に果たす役割とその制御機構は未だ解明されていない。

【目的】カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の受容体サブユニットである RAMP1 の炎症組織におけるリンパ管新生に果たす役割を解明することを目的とした。

【方法】7-10 週令の RAMP1 欠損マウス (*Ramp1*^{-/-}) とその野生型マウス (WT) を用い、大腸菌由来の LPS (1 μ g/g of body weight) を腹腔内に隔日投与して腹膜炎モデルマウスを作成した。横隔膜組織上のリンパ管の発達は抗 LYVE-1 抗体を用いて免疫組織学的に評価した。ならびに集積細胞数を免疫組織学的に計測した。また、横隔膜組織と脊髄後根神経節の遺伝子発現量を real time PCR 法を用いて検討した。T 細胞の関与を評価するため、抗 CD4 抗体を用いて細胞除去処置を施した。脾臓からリンパ球を、骨髄からマクロファージを分離し、CGRP で刺激した。リンパ管ドレナージ機能は腹腔内投与した FITC 蛍光強度の測定により評価した。

【結果】

Ramp1^{-/-}マウスでリンパ管新生とリンパ管新生因子が減弱した

横隔膜のリンパ管を Lyve-1 で免疫染色し、その面積を比較したところ、LPS 投与前には WT と *Ramp1*^{-/-}間に有意差を認めなかったが、Day 7 では有意に *Ramp1*^{-/-}マウスでのリンパ管新生が抑制された。リンパ管内皮マーカーである Lyve-1, VEGFR3, Prox1 またリンパ管新生因子である VEGF-C, VEGF-D の mRNA レベルも *Ramp1*^{-/-}で発現が減弱し

た。このことから RAMP-1 シグナルがリンパ管新生を誘導することが示された。

脊髄後根神経節と横隔膜での RAMP1 の発現

LPS投与前の脊髄後根神経節でのpro-CGRP と CGRPの発現量に差はなく、*Ramp1*^{-/-} マウスの脊髄後根神経節でのRAMP1の発現はWTと比較して著明に低かったことから *Ramp1*^{-/-} マウスはCGRPシグナルを評価するのに適していることを確認した。次に横隔膜でのRAMP1の局在を調べたところ、RAMP1はCD4陽性細胞であるヘルパーT細胞とCD11b陽性細胞であるマクロファージに発現していたが、LYVE-1陽性細胞である新生リンパ管上には認められなかった。またT細胞、マクロファージともにリンパ管新生因子VEGF-C, VEGF-Dを発現していた。このことからCGRP/RAMP1シグナルは免疫細胞に作用しており、リンパ管内皮細胞には直接的に作用していない可能性が考えられた。

T細胞とマクロファージの横隔膜への集積

T細胞とマクロファージが炎症時の横隔膜のリンパ管新生に関与していることがわかったため両者の数をカウントした。T細胞、マクロファージ数ともにWTでも *Ramp1*^{-/-} マウスでもDay0と比較してDay3で著明に増加した。Day3でのWTでのT細胞の集積は *Ramp1*^{-/-} マウスと比較して有意に増加していた。一方マクロファージの数は *Ramp1*^{-/-} マウスで増加する傾向にあった。横隔膜組織の2重免疫染色から、CD4⁺細胞はVEGF-CとVEGF-Dを発現しており、同様のことがCD11b⁺細胞でも示された。T細胞、マクロファージともにリンパ管新生因子を発現しており、RAMP1シグナルと免疫細胞がリンパ管新生において重要な役割を果たしていることが示された。

T細胞の果たす役割

T細胞の関与に関してさらに詳しく調べるために抗CD4抗体を用いてT細胞を除去したところ、WTマウスでリンパ管新生やリンパ管新生因子が有意に抑制された。一方 *Ramp1*^{-/-} マウスではcontrol IgG投与群と比較して有意な差は認めなかった。さらに脾臓からCD4⁺細胞を分離し、CGRPで刺激してリンパ管新生因子の発現を調べると、野生型T細胞ではVEGF-CならびにVEGF-DのmRNA発現は増強したが、RAMP1^{-/-}細胞では減弱した。この結果からもT細胞はRAMP1シグナルに依存してリンパ管新生因子を産生し、リンパ管新生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

マクロファージの果たす役割と性質

Ramp1^{-/-} マウスで過剰に集積したマクロファージがリンパ管新生を抑制したことが示された。この結果はRAMP1の欠損がマクロファージの表現型に影響した可能性を示している。横隔膜組織でのマクロファージのprofileをreal-time PCRで調べたところ、*Ramp1*^{-/-} マウスでは炎症性マクロファージ profiles であるTNF α の発現が増加しており、修復性マクロファージ profiles であるMRは低下していた。*Ramp1*^{-/-} マウ

スでは CCL2, CCL5 を含むケモカインの発現が増加していることから、RAMP1 シグナルがケモカインの放出を減少させることにより炎症性マクロファージが減少し、修復性マクロファージが増加する可能性が示された。加えて培養骨髄由来マクロファージに CGRP 刺激を行ったところ野生型細胞では TNF α の発現が低下し、*Ramp1*^{-/-} 細胞では変化を認めなかった。一方 MR の発現は RAMP1^{-/-}と比較して増加した。VEGF-C の発現は WT で増加しており、RAMP1 シグナルは修復性マクロファージを集積し、VEGF-C を介してリンパ管新生を増強することが示された。

機能評価

横隔膜のリンパ管のドレナージ機能を比較するため、FITC デキストランを腹腔内に注入し、腹腔内に残存した FITC デキストラン量を評価した。WT マウスではコントロール群と比較して残存 FITC 量は著明に低下し、その低下は *Ramp1*^{-/-} マウスでは生じなかった。横隔膜のリンパ液は縦隔リンパ節にドレナージされるため、縦隔リンパ節を採取して FITC デキストラン量を測定した。WT マウスでは *Ramp1*^{-/-} マウスと比較して FITC 量が多かった。このことから RAMP1 シグナルが腹膜炎時の横隔膜のリンパ管ドレナージ機能を改善することが示唆された。

【考察】 CGRP は RAMP1 シグナルを通じて免疫細胞に作用し、抗炎症作用を示す。CGRP/RAMP1 シグナルが様々な疾患モデルで血管新生を促進することは報告されているが、リンパ管新生に関する報告は少ない。今回 RAMP1 シグナルが免疫細胞に作用し、炎症時の横隔膜のリンパ管新生を制御していると仮定し検証を行った。RAMP1 遺伝子を欠損させることによって、LPS 誘発腹膜炎時の横隔膜組織で VEGF-C と VEGF-D の発現が減少し、リンパ管新生が抑制された。これには CD4⁺ T 細胞と炎症性マクロファージの横隔膜組織への集積の減少が関連していた。さらに RAMP1^{-/-} マウスで腹水ドレナージ機能が減弱していた。これらのことから免疫細胞の RAMP1 シグナルがリンパ管新生を促進し、腹水ドレナージ機能を増強することが示された。

炎症時の横隔膜組織には CD4⁺ T 細胞が集積しており、CD4⁺ T 細胞を除去することにより WT マウスではリンパ管新生が抑制されたが *Ramp1*^{-/-} マウスではそれ以上抑制されなかった In Vitro では CD4⁺ T 細胞の VEGF-C と VEGF-D の発現が RAMP1 依存的に増加した。これらのことから、CD4⁺ T 細胞の RAMP1 シグナルが VEGF-C と VEGF-D の発現を増加させることにより炎症性リンパ管新生に関与していることが示された。CGRP 受容体の活性化がアデニル酸シクラーゼを活性化させ、内皮細胞、血管平滑筋、炎症性細胞に cAMP が蓄積し、VEGF の発現が増加する。CGRP 受容体は血管内皮細胞と炎症性細胞の両方で VEGF 発現を増加させることにより血管新生とリンパ管新生を引き起こす。どちらの RAMP1 シグナルが免疫細胞のリンパ管新生因子を増強しているのかについてはさらなる検証が必要である。

T細胞に加えてマクロファージもリンパ管新生で重要な役割を担っていると考えられているが、今回 RAMP1^{-/-}マウスの横隔膜に過剰に集積したマクロファージはリンパ管新生を増強させなかった。これは RAMP1 シグナルが炎症性マクロファージの過剰な集積を抑制し、修復性のマクロファージがリンパ管新生に寄与していることを示唆している。*in vitro* では RAMP1 シグナルは VEGF-C の発現を増強したことからマクロファージの RAMP1 シグナルは VEGF-C を介して修復性マクロファージを誘導し、リンパ管の形成を促進することが示された。

横隔膜のリンパ管の機能は腹水をドレナージすることである。横隔膜のリンパ管新生が機能的に活性化すると、肝疾患などの病態時に腹水を減少させることができる可能性がある。本研究から RAMP1 シグナルに依存した炎症性の横隔膜のリンパ管新生は腹水ドレナージと縦隔リンパ節への輸送を増加させた。RAMP1 シグナルに対するアゴニストが将来的に腹膜炎を有する患者の治療に応用される可能性が示された。

【結論】 腹膜炎において、CGRP が免疫細胞の RAMP1 受容体に作用して横隔膜リンパ管新生を促進し、炎症調節に関与していることが示された。