

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 服部 響子



論 文 題 目

「Lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor  
receptor 1 signaling contributes to the progression of endometriosis in mice」

(子宮内膜症における血管内皮増殖因子受容体 1 シグナルによる  
リンパ管新生の役割解明)

指 導 教 授 承 認 印

海 野 信 也



# Lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling contributes to the progression of endometriosis in mice

(子宮内膜症における血管内皮増殖因子受容体 1 シグナルによる  
リンパ管新生の役割解明)

氏 名 服 部 響 子

( 以 下 要 旨 本 文 )

## 【背景】

子宮内膜症は生殖年齢女性の 5～10%が罹患し、不妊症、月経困難症、早産、また卵巣癌などの原因となり、女性の QOL を著しく損なう疾患であるが、原因について十分に解明されていない。子宮内膜症の発症には血管新生は不可欠であり、代表的な血管新生増強因子である血管内皮増殖因子 (VEGF-A) を含む VEGF ファミリーは異所性子宮内膜症の進展に寄与する。われわれは、マウス異所性子宮内膜症モデルを用いて、VEGF-A の受容体である血管内皮増殖因子 1 型受容体 (VEGFR1) シグナルが血管新生増強作用を介して子宮内膜症を進展させることを見いだした。

一方で、リンパ管新生 (既存の血管からの新しいリンパ管の成長) が子宮内膜症病変で起こること、また VEGF-C および VEGF-D を含むリンパ管新生増強因子発現が腹膜病変で増加していることが報告されている。これらの知見は、新生リンパ管が子宮外性子宮内膜症の病態に関与している可能性を示唆しているが、リンパ管新生が子宮内膜症病変の成立と進行に寄与するメカニズムはまだ完全には解明されていない。

## 【目的】

そこで、本研究では子宮内膜症進展に果たすリンパ管新生の役割と、リンパ管新生制御に VEGFR1 シグナルが関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

実験動物には 9 週令の雌性 VEGFR1 TK 欠損マウス ( $TK^{-/-}$ ) マウスおよび野生型 C57BL/6 (WT) マウスを用いた。宿主の両側卵巣を摘出 1 週間後、ドナーマウスの子宮片を宿主マウスの両側腹膜壁に移植して異所性子宮内膜症モデルを作成した (ドナー→宿

主)。宿主には卵巣摘出後から 1 週間ごとにエストラジオールジプロピオン酸塩を投与した。

移植後 0 日目、7 日目、14 日目、および 21 日目に麻酔下で移植内膜組織を摘出し、移植片面積を評価した。移植片内リンパ管の発達や集積免疫細胞数を免疫組織学的に評価し、また移植片の遺伝子発現量を real time PCR 法を用いて測定した。

培養骨髄由来マクロファージ、および線維芽細胞 (L929 細胞株) を用いてリンパ管新生増強因子産生について検討した。リンパ管ドレナージ機能は移植片内に投与した蛍光色素 FITC デキストランの蛍光強度を測定して評価した。

## 【結果】

### リンパ管新生の子宮内膜症進展に果たす役割

WT→WT マウスの移植片の大きさは移植後 14 日目に最大となった。移植片を抗 LYVE-1 抗体で染色し、リンパ管密度 (LVD) とリンパ管面積 (LVA%) を計測すると、14 日目にピークを迎えた。また LYVE-1 および VEGFR3 (Flt4) 発現レベルは、子宮内膜移植後に増加し、14 日目および 21 日目に最大に達した。これらの結果に基づき、その後の実験では 14 日目のリンパ管新生を評価した。

WT→WT マウスに VEGFR3 キナーゼ阻害剤である MAZ51 を投与すると、移植片サイズは減少し、LVD と LVA%が減少した。また LYVE-1 および Prox-1 mRNA 発現も減少した。これらの結果から、VEGFR3 シグナルを介したリンパ管新生が子宮内膜移植片の成長に寄与していることが示唆された。

### VEGFR1 シグナルの子宮内膜症進展とリンパ管新生に果たす役割

移植後 14 日目の移植片面積およびリンパ管新生 (LVD、LVA%) は WT→WT マウスでは 0 日目に比べて有意に大きくなったが、 $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスでは変化は見られなかった。リンパ管内皮マーカーである LYVE-1、Prox-1 および VEGFR3 の mRNA 発現は WT→WT マウスでは 14 日目に 0 日目よりも高かったが、 $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスではこれらの増加が有意に抑制された。また VEGFR1、VEGF-A の mRNA についても同様であった。これらの結果よりリンパ管新生は VEGFR1 シグナルに依存して誘導されることが示唆された。また移植片の免疫二重染色では VEGFR1 は LYVE-1 とは共染しなかった。このことから、VEGFR1 シグナル伝達はリンパ管内皮に直接作用してリンパ管内皮を増殖させてリンパ管新生を増強するのではないことを示している。

### リンパ管新生におけるマクロファージと線維芽細胞の役割

リンパ管新生増強因子 VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現量は、WT→WT マウスでは移植後 14 日目に 0 日目よりも高かったが、 $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスではその増加が抑制された。VEGF-C と VEGF-D は免疫蛍光染色で CD11b+細胞（マクロファージ）、S100A4+細胞（線維芽細胞）両者に発現した。これらの結果から、VEGFR1 シグナル伝達はマクロファージおよび線維芽細胞から VEGF-C および VEGF-D を産生して移植片のリンパ管形成に参与することが示唆された。

また移植片中の CD11b+細胞と S100A4+細胞数は  $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスでは WT→WT マウスより減少した。移植片におけるケモカイン発現を測定すると、WT→WT では、14 日目に CCL2 と SDF-1 の発現が亢進し、 $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスでは低下した。これらの結果より、マクロファージや線維芽細胞が VEGFR1 依存的に移植片に集積することが示唆された。

#### VEGFR1 シグナルの培養マクロファージおよび線維芽細胞におけるリンパ管新生因子産生作用

骨髄由来の培養マクロファージと培養線維芽細胞を VEGFR1 の特異的アゴニストである胎盤増殖因子 (PlGF) で刺激し、VEGF-C と VEGF-D の mRNA 発現レベルを調べた。PlGF は WT マクロファージにおいて VEGFR1 発現を誘導したが、 $TK^{-/-}$  マクロファージにおいては誘導しなかった。PlGF によって誘導された WT マクロファージにおける VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現レベルは、 $TK^{-/-}$  マクロファージにおけるそれよりも有意に増加した。

また培養線維芽細胞 (L929 細胞) では、PlGF が VEGFR1、VEGF-C、VEGF-D の mRNA 発現レベルを上昇させ、VEGFR1 中和抗体で処理することでこれらの上昇は有意に抑制された。このことから、マクロファージや線維芽細胞は VEGFR1 に依存して VEGF-C と VEGF-D を in vitro で産生していることが示唆された。

#### 子宮内膜移植片からのリンパドレナージ 機能

WT→WT マウスと  $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスの移植片におけるリンパ管のドレナージ機能を比較するために、一方の子宮内膜移植片に FITC デキストランを注入した。注入後 3 時間後に、注入したインプラントに対する同側の傍大動脈リンパ節を切除し、リンパ節内の残留 FITC デキストラン量を測定した。WT→WT マウスの蛍光強度は  $TK^{-/-}$ → $TK^{-/-}$  マウスの蛍光強度よりも高かった。このことから VEGFR1 シグナル伝達が、子宮内膜移植片から間質液を排出する際のリンパ管の機能を改善することが示唆された。



## 【考察】

本研究では、リンパ管新生の子宮内膜症の成長に果たす役割と、子宮内膜移植片組織における VEGFR1 シグナル伝達のリンパ管新生への関与を検討した。今回の結果から、VEGFR3 阻害によるリンパ管新生の抑制は子宮内膜症進展を抑制した。*TK<sup>-/-</sup>*マウスでは、子宮内膜症およびリンパ管新生の抑制に関連して VEGF-C および VEGF-D 発現が減少した。またマクロファージや線維芽細胞が、VEGFR1 シグナル依存的に VEGF-C と VEGF-D を産生して子宮内膜移植片におけるリンパ管新生を促進した。これらの結果から、VEGFR1 シグナル遮断は、子宮内膜症の治療的戦略となりうることが示唆された。

子宮内膜病変におけるリンパ管新生は、免疫機能と関連する。本研究では、CD11b<sup>+</sup>マクロファージが子宮内膜移植片に VEGFR1 シグナルに依存して集積した。マクロファージはリンパ管新生において重要な役割を果たすが、本研究においても CD11b<sup>+</sup>マクロファージが子宮内膜組織において VEGF-C および VEGF-D を発現した。さらに *in vitro* 実験により、培養骨髄マクロファージが VEGF-C および VEGF-D 発現を VEGFR1 依存的に増強することが明らかになった。これらの結果は、マクロファージにおける VEGFR1 シグナル伝達が、VEGF-C および VEGF-D 産生を増加して、リンパ管新生を促進することに寄与していることを示唆している。最近、われわれは本モデルにおいてマクロファージおよび線維芽細胞が VEGF-A を産生することを見いだした。VEGFR1 のリガンドである VEGF-A はマクロファージ走化性作用があり、VEGFR1 にはマクロファージを局所炎症部位に集積させる作用がある。従って VEGF-A が VEGFR1 発現マクロファージを子宮内膜移植片に動員したものと推察される。また、マクロファージの集積にはケモカインである CCL2 も関与することを示した。

マクロファージに加えて、線維芽細胞もリンパ管新生に寄与している。本研究では線維芽細胞に特異的なマーカーである S100A4 陽性細胞が、移植片で VEGF-C と VEGF-D を発現していることを見いだした。われわれは、移植片組織での VEGFR1 陽性細胞が S100A4 を発現することを報告したが、本研究では、培養線維芽細胞が VEGFR1 シグナルに依存して VEGF-C および VEGF-D を産生することを見いだした。また線維芽細胞の集積はケモカイン SDF-1 によって誘導された。

マクロファージおよび線維芽細胞とは対照的に、子宮内膜移植片のリンパ内皮細胞は VEGFR1 を発現しなかった。このことは、リンパ管新生は VEGFR1 シグナルのリンパ管内皮細胞に対する直接作用ではなく、移植片の間質組織に集積したマクロファージお

よび線維芽細胞が関わっていることを示唆する。また VEGFR3 阻害剤がリンパ管新生と移植片の成長を抑制したことから、子宮内膜移植片におけるリンパ管新生には VEGFR3 シグナル伝達の関与が示唆される。

リンパ系は間質液輸送を調節している。今回の研究では、VEGFR1 シグナル伝達が、移植片内の新生リンパ管を介して、間質液を傍大動脈リンパ節へドレナージする機能に関与していることが示された。子宮内膜移植片からの間質液ドレナージ機能の促進は、子宮内膜症進展と関連していたことから、新たに形成されたリンパ管はドレナージ機能を亢進することにより子宮内膜症を進展させる可能性が示唆された。子宮内膜症において VEGFR1 シグナルはリンパ管新生を制御することで病変の進展に寄与することが示された。

#### 【結論】

VEGFR1 シグナルはリンパ管新生を制御することで子宮内膜症病変の進展に寄与することが示された。