

論文内容の要旨

論文提出者氏名 丸山 悠子

論文題目

The Effect of Podoplanin Inhibition on Lymphangiogenesis under Pathological Conditions.

論文内容の要旨

角膜は通常血管・リンパ管の欠如した透明組織であるが、角膜移植等の炎症期には血管、リンパ管を角膜実質内に新生する。共著者の丸山らの報告で角膜の炎症期リンパ管新生には、マクロファージが関与しており、角膜内に新生したリンパ管の維持はマクロファージの存在に依存していることが明らかになっている。本論文では Lipopolysaccharide (LPS) 刺激によるマクロファージではリンパ管内皮細胞特異的マーカーである podoplanin が強く発現しており、またいくつかの炎症性サイトカイン刺激に反応して podoplanin が上昇することが報告されている。しかしながら、podoplanin がマクロファージやリンパ管新生の際に果たす役割の詳細は分かっていない。本論文では podoplanin の中和抗体 (PMab-1, NZ-1) を用い、角膜炎症、角膜移植時のリンパ管新生と拒絶反応、マクロファージによる炎症を抑制できるかどうか検討を行った。

まず角膜縫合モデルで角膜のリンパ管新生、マクロファージの浸潤について検討した。生後 8-10 週の C57BL/6 マウスの角膜実質に縫合処置し、当日、術後 1, 2, 3, 5 日目に PMab-1 100 μ g/50 μ l、PBS 50 μ l の静脈注射を行った。角膜縫合後 7 日目に角膜を摘出し、抗 LYVE-1 抗体(リンパ管内皮マーカー)と抗 F4/80 抗体(マクロファージマーカー)を用いて免疫組織化学染色を施行した。新生したリンパ管に被覆された面積を Image J software で解析し、角膜全体に占めるリンパ管の割合を算出した。また、1mm²あたりのマクロファージの数を計算し浸潤したマクロファージを算出した。リンパ管新生は PMab-1 投与群で、PBS 投与後に比べて有意に抑制された (P=0.0095)。またマクロファージの浸潤も PMab-1 投与群で PBS 投与後に比べて有意に抑制された (P=0.0023)。

次に角膜移植モデルで PMab-1 投与により拒絶反応を抑制できるかどうか検討した。生後 8-10 週の雄のマウスを使用し、レシピエントは BALB/c、ドナーは C57BL/6 を使用した。当日、術後 3, 5, 7 日目に PMab-1 150 μ g/100 μ l、PBS 100 μ l の結膜下注射を行い、角膜移植後 56 日目まで経過観察を行った。コントロール群では 40%しか移植片が生着しなかったのに対して、PMab-1 投与群では 85%の移植片が生着した (P=0.0259)。組織学的には PMab-1 投与群ではコントロール群と比べてマクロファージの浸潤が抑制されていた (P=0.0286)。PMab-1 により浸潤するマクロファージ (抗原提示細胞) の細胞数が減少したことで、リンパ管新生が抑制され拒絶反応の抑制に関与したものと考えられた。

また、耳の創傷治癒モデルについてもリンパ管新生について検討した。生後 8-10 週の雄の C57BL/6 マウスの耳を 2mm トレパンで全層切除し、当日、術後 1, 2, 3, 5 日目に PMab-1 100 μ g/50 μ l、PBS 50 μ l の静脈注射を行った。全層切除後 7 日目に耳を摘出し、角膜同様、抗 LYVE-1 抗体(リンパ管内皮マーカー)を用いて免疫組織化学染色を施行した。リンパ管新生は PMab-1 投与群で、PBS 投与群に比べて有意に抑制された (P=0.0040)。また耳の厚みを検討したところ、PMab-1 投与群で PBS 投与群に比べて有意に厚くなっていた (P=0.0023)。またリンパ管ドレナージモデルでは、1 μ l のインディアンインクを皮内に注射し、5 分後に撮影を行いリンパ流路について検討した。PMab-1 投与によりリンパ液流量が減少し、リンパ管が一部拡張してリンパ流路に影響を及ぼし、このために耳の治癒過程の際に組織がリンパ浮腫を起こし、耳の厚みが厚くなったと考えられた。

続いて炎症時に惹起されるマクロファージが podoplanin を発現しているのか、また PMab-1 により発現が抑制されるかどうかを in vitro で検討した。生後 8-10 週の雄の C57/BL6 マウスの腹腔内にチオグリコレートを投与し、誘導した腹腔内細胞 (peritoneal exudates cell、以下 PEC。丸山和一らは 99%以上がマクロファージであることを報告している) を用いて薬剤刺激試験を行った。PEC を LPS 単独、Interferon gamma (IFN- γ) 単独、LPS+IFN- γ で刺激後、PMab-1 投与群と非投与群で 24 時間培養し、Western blot にて podoplanin の発現を解析した。さらに培養上清を採取し、ELISA にて TNF- α を測定した。Podoplanin の発現は LPS 単独刺激で上昇し、PMab-1 投与で抑制された。一方、培養上清中の TNF- α の分泌レベルは LPS 単独刺激後では PMab-1 投与群ではコントロール群に比べ、有意に低下していた (PMab-1 100 μ g/ml で P<0.03) が、LPS+IFN- γ 刺激後の TNF- α の分泌レベルは LPS 単独刺激後に比較して高く、PMab-1 の投与でも TNF- α の分泌は抑制出来なかった。これにより LPS により惹起される炎症は PMab-1 で抑制できることが分かった。

そこで我々は LPS 刺激による PMab-1 の炎症抑制経路を検討するため、PEC を LPS で刺激後 24 時間培養し、Western blot にて NF- κ B、MAPK (p38, ERK, SAPK/JNK) 経路に関わるタンパク発現を解析した。その結果、PMab-1 は NF- κ B、MAPK 経路の両方を抑制することで、マクロファージによる炎症反応を抑制する可能性があることが分かった。

最後に podoplanin 中和抗体がヒトリンパ管内皮細胞 (LEC) に直接的に働くかどうかを検証するために行った tube formation assay (in vitro におけるリンパ管新生モデル) では、LEC を 24 ウェルプレートが confluent になるまで培養し、NZ-1 刺激後 24 時間培養し、形成された管腔の長さの合計を Image J software で解析した。NZ-1 の投与により、LEC によるリンパ管の形成が濃度依存的に抑制され、podoplanin がマクロファージ同様 LEC にも直接作用することが分かった。

以上の結果から、podoplanin 中和抗体により炎症期の角膜・皮膚におけるマクロファージの浸潤、リンパ管新生を抑制することを示した。この知見は角膜・皮膚以外の疾患も含めて抗腫瘍治療など新たな候補薬剤発見につながる可能性があると期待される。