

Title	Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation
Sub Title	アンジオポエチン-1はLYVE-1陽性リンパ管の形成を促進する
Author	森定, 徹
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.17-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0017

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation

(アンジオポエチン-1はLYVE-1陽性リンパ管の形成を促進する)

森 定 徹

内容の要旨

悪性腫瘍のリンパ行性転移やリンパ浮腫などの病態の解明のためにリンパ管形成の分子機構を理解することは重要であるが、近年までリンパ管を同定する特異的な抗体などの研究材料が存在しなかったため、リンパ管形成については未知の部分が多かった。一方、血管形成においては、既にVEGFやAngiopoietin等の複数の血管新生関連分子が階層性、相互性を持って作用していることが詳細に解析されており、特にAngiopoietin-1 (Ang-1) とその受容体Tie2のシグナルは、胎生期の血管構造の成熟過程に重要な機構であることがわかっている。しかしながら現在までのところ、リンパ管形成におけるAng-1シグナルに関する検討は充分になされていない。そこで本研究では、リンパ管の同定とリンパ管内皮細胞の単離のために新たにリンパ管内皮細胞に特異的に発現する分子LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) に対するモノクローナル抗体を作成し、この抗LYVE-1抗体を用いてAng-1のリンパ管形成における機能について検討を行った。

まず、マウスLYVE-1の細胞外ドメイン蛋白を抗原としてラットに免疫を行い、ハイブリドーマの選別から抗LYVE-1モノクローナル抗体を確立した。そしてこの抗体がリンパ管内皮細胞に対して免疫組織化学染色のみならずフローサイトメトリー (FACS) による解析にも有用であることを確認した。

次に、マウス胎児組織から得られた細胞を、作成した抗LYVE-1抗体と血管内皮・血液細胞の細胞表面分子に対する抗体で多重蛍光染色し、FACSを用いてリンパ管内皮細胞を単離、純化した。純化したリンパ管内皮細胞のRT-PCRによる遺伝子発現解析にて、リンパ管内皮細胞に受容体Tie2が発現していることを見出した。さらに、FACSによる経時的な解析により、リンパ管内皮細胞におけるTie2の発現強度が胎児発生段階により変化していることを見出した。

このリンパ管内皮細胞を支持細胞 (OP9細胞) の存在下で共培養する系を確立し、外因性にAng-1を添加したところ、リンパ管内皮細胞のコロニー形成は有意に促進された。さらにマウス角膜を用いた *in vivo* の実験にて、角膜内に埋包したAng-1がLYVE-1陽性のリンパ管新生を誘導することを見出した。

以上より、今回作成した抗LYVE-1抗体を用いてリンパ管内皮細胞の単離に成功し、Tie2受容体が血管内皮細胞と同様にリンパ管内皮細胞にも発現し、Ang-1がリンパ管内皮細胞に作用してリンパ管形成を促進することが明らかとなった。リンパ管内皮細胞におけるTie2の発現は発生段階や臓器により異なることから、リンパ管形成におけるAng-1/Tie2シグナルは時間的・空間的に制御されていると考えられた。

論文審査の要旨

悪性腫瘍や慢性炎症などの病態に関与する血管新生ならびにリンパ管形成の分子機構を理解することは重要であるが、リンパ管の分子基盤についてはいまだ詳細に解明されていない。一方、血管新生のプロセスは複数の分子により制御されていることが知られており、その一つであるAngiopoietin (Ang) は受容体Tie2を介して発生期の血管再構築の過程に重要な働きを持つことが明らかにされている。そこで本研究ではまず、リンパ管内皮細胞に特異的な膜表面分子LYVE-1に対するモノクローナル抗体を作成し、免疫組織化学染色およびフローサイトメトリーにてこの抗体の特異性を確認した。次いでこの抗体を用いてマウス胎児組織からリンパ管内皮細胞を単離し、支持細胞 (OP9細胞) との共培養の系を確立した。さらにこの系においてAng-1がリンパ管内皮細胞のコロニー形成を促進すること、またマウス角膜法の実験においてAng-1がリンパ管新生を惹起することを明らかにした。

審査ではまず、この抗LYVE-1抗体のリンパ管内皮細胞への特異性に関する質問があった。これに対し、ウェスタンブロットングによる特異性の確認は現在検討中であるが、今回の実験の組織化学的検討において、本抗体が血管とは明らかに異なるリンパ管に特異的に反応することを確認しているとの回答がなされた。次に共培養実験で用いている支持細胞のOP9細胞はどのような役割を持つのかという質問があり、OP9細胞自体が内因性にVEGF-Cなどのリンパ管新生因子を発現していることを確認しているため、それらとAng-1が協調的に作用した結果を評価しているのであろうとの回答がなされた。また、マウス角膜法の実験に関して、角膜のリンパ管新生には角膜内に存在する他の細胞成分の関与はないかとの質問があり、これに対し、実際、角膜のリンパ管新生にマクロファージなどの血球細胞が関与するという報告が散見されており、角膜内に介在する細胞の役割についても検討する必要があるとの回答がなされた。さらにリンパ管形成についてVEGF-CとAng-1ほどの程度の相互性を持って寄与するのかという質問があり、それに対してはいまだ確たる論拠は無いこと、ただし、同じ脈管である血管の発生のメカニズムから類推してリンパ管形成にも複数の分子による階層的な制御機構が存在するとの回答がなされた。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、解析が不十分であったリンパ管形成の分子機構についてその一端を明らかにすることで、さらなるリンパ管形成のメカニズムの解明に繋がる可能性を示したという点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 青木 大輔
産婦人科学 吉村 泰典 病理学 岡田 保典
病理学 坂元 亨字

学力確認担当者:

審査委員長: 吉村 泰典

試問日: 平成18年1月14日