

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Treatment with YIGSR peptide ameliorates mouse tail lymphedema by 67 kDa laminin receptor(67LR)-dependent cell-cell adhesion

ラミニンペプチド YIGSR は 67kDa ラミニンレセプター依存性の細胞間接着を促しマウス尾リンパ浮腫を改善する

日本医科大学大学院医学研究科 形成再建再生医学分野
大学院生 栄 由貴

Biochemistry and Biophysics Reports Volume 35, 2023 Jul 20:35:101514 掲載

DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101514

がん罹患率の増加に伴い、外科的加療に伴うリンパ節郭清や放射線治療後に生じる続発性（二次性）リンパ浮腫は、世界的に増加している。弾性ストッキングなど保存的治療からリンパ管静脈吻合など外科的治療まで治療法はあるものの、著効する治療法は確立されていない。リンパ浮腫は、整容面で心理的な苦痛を生じるだけでなく、歩行にも支障を来たすなど、生活の質(QOL)の低下を引き起こすため、リンパ浮腫発症早期の病態を解明し、発症予防や早期治療が必要とされる。

申請者はマウス尾のリンパ浮腫モデルによるリンパ浮腫発生過程において、細胞外基質の主要な構成成分であるラミニンペプチドの局在が変化し、その早期ではラミニン受容体 67 kDa Laminin Receptor(67LR)が顕著に増加していることを初めて観察した。そこで、ラミニンペプチド YIGSR-NH₂がリンパ管新生に適した微小環境の再構築に寄与すると仮定し、マウス尾リンパ浮腫モデルにおける YIGSR-NH₂の効果を検討した。

マウス(ICR, 8 週齢, 雌)の尾の基部から 2cm 遠位に 2mm 幅で環状切開し、皮膚を全層で切除、両側を走る尾静脈の左右のリンパ管を焼灼し、リンパ浮腫モデルを作成した。その直後から連続 3 日間、YIGSR-NH₂(3.86mM)を腹腔内注射し、対照として生理食塩水(500μl)を同様に腹腔内注射した。尾の直径を経時的(day0, 2, 7, 14, 21, 28, 35)に測定し両者を比較した。マウスの尾の組織切片をラミニンの免疫染色、HE 染色、マッソントリクローム染色、透過型電子顕微鏡観察で解析した。また、組織切片の 67LR や細胞接着・炎症にも関与する TGFβ, EndMT (内皮間葉転換) が誘導された際に観察される間葉系細胞マーカー SM22α, β-カテニンなどの遺伝子発現解析を行った。さらに、67LR の阻害剤として MLC5(100μg/ml)を同様に投与した実験も追加し、YIGSR-NH₂投与群、対照群と比較した。

対照群と比較し、YIGSR-NH₂投与群では尾の直径が27%有意に小さくリンパ浮腫が抑制されており、表皮の厚みも有意に薄くなっていた(day7: $p<0.03$, day14: $p<0.05$)。阻害剤であるMLuC5投与群ではリンパ浮腫は増悪・遷延化していた($p<0.05$)。電子顕微鏡像ではYIGSR-NH₂投与群ではケラチノサイト間の細胞間接着は強固であり、基底膜もその構造が維持されていたが、対照群では細胞間隙が拡大し(細胞間接着の喪失)、毛包や基底膜の構造も損傷を受け、広範囲に炎症が波及している像を呈していた。

YIGSR-NH₂がリンパ浮腫を改善させる機序として、細胞間の接着を強固に(基底膜バリア機能の破綻を抑制)するとともに、TGFβ1、TGFβ2の遺伝子発現量を有意に減少($p<0.05$)させることで過剰な炎症を抑え、適切な創傷治癒を促したと推察した。

リンパ浮腫発症過程では、血管やリンパ管の拡張が著しい部位にラミニンが集積し、それに呼応して67LRが急激に高発現しているように観察された。おそらくラミニンは組織に炎症や損傷が起きるとその部位に集積し、67LRを介して創傷治癒の足場となるような作用があると考えられ、投与したラミニンペプチドYIGSRリガンドは高発現した67LRと選択的な相互作用をして、基底膜バリア機能を早期に回復し、浮腫改善を顕著に加速したと思われる。これらから、67LRの高選択的活性化が擬似的な接触を種々の細胞に感知・誘導させ、細胞間接着をより強固にするように細胞周期を変化させたと予想した。67LRは、細胞間接着という物理的な刺激を感知するメカノセンサーとして働く可能性が示唆された。

YIGSR-NH₂はマウス尾のリンパ浮腫モデルにおいて有意にリンパ浮腫を改善した。YIGSRは67LR活性化を介してTGFβの抑制、細胞間接着を高めることに寄与した。YIGSR-67LRはリンパ浮腫にとどまらず、ラミニンの関与が指摘される水疱やびらん(類天疱瘡)、脳浮腫、脳腫瘍の予防・治療戦略としても標的になる可能性があると考えられた。今後は慢性期のリンパ浮腫に対する評価及びより詳細なメカニズム解明も必要であると考えられた。

二次審査においては、対照群においても術後4週でリンパ浮腫が自然改善している理由に関する質問に対し、創傷部位でリンパ管新生が生じリンパ管同士が再吻合している可能性が示された。YIGSRが直接細胞の接着を強めている可能性以外に、過剰な炎症を抑えられることで二次的に接着を強めている可能性はあるか、という質問に対しては炎症の定量は行っていないが、先に炎症が抑えられた結果として細胞の接着が壊されずに維持されている可能性があることが説明された。どのような浮腫に効果があるかの質問に対しては、細胞同士の接着が緩むことで生じる浮腫、バリア機構が働く場所をラミニンが補強できる可能性があるという回答された。YIGSRリガンドはお茶に含まれている成分とのことであるが、お茶を飲むことで浮腫が改善する可能性があるのか、という質問に対しては、すでに耳介浮腫に対する効果を示唆する論文があることが報告された。以上より、本研究は臨床的発展性のある、新規性のある研究であり、学位論文として価値あるものと認定した。