

リンパ管と血管の分離を保障する血小板の作用機序

神戸大学大学院医学研究科 血管生物学分野

平島 正則

1. 緒言

リンパ管は末梢組織で血管と分離したネットワークを形成・維持して、体液調節・免疫応答・脂質代謝などの恒常性維持に重要な役割を果たしている。近年の研究で、リンパ管と血管の分離には、リンパ管内皮細胞の膜タンパクPodoplaninによって血小板がCLEC-2/Syk/Slp-76/ホスホリパーゼC γ 2 (Plcg2) 経路依存的に活性化されることが重要であるとわかってきた。しかしながら、「リンパ管腔内には通常存在しない血小板が、どこでリンパ管内皮細胞と接触して活性化され、どのようにリンパ管・血管分離に働くのか」については不明な点が多い。研究代表者はリンパ管内皮細胞を認識する抗Podoplanin抗体を胎仔の血管内に注入する独自の解析法を用いて、Plcg2ノックアウト (Plcg2^{-/-}) マウス胎仔の皮膚に異常なリンパ管・血管吻合がランダムに形成されることを明らかにしてきた。胎仔期に皮膚のリンパ管は伸長して形成されることが知られている。これらのことから、リンパ管が伸長する過程でリンパ管内皮細胞の細胞膜が血管腔内へ侵入した場合に血小板が活性化されて、活性化血小板の作用でリンパ管と血管との吻合が抑制されるのではないかと考えられた。本研究では、血小板がリンパ管と血管の分離を維持している場所とそれらの分離を保障している血小板由来因子の分子実体を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 血小板とリンパ管内皮細胞の接触場所について

Plcg2^{-/-} マウスでは血小板活性化不全があり、胎仔皮膚のリンパ管内に赤血球の流入が認められる。リンパ管と血管は頸部の静脈角で生理的に吻合しているため、リンパ管内に流入した赤血球は何らかの原因で頸部から逆流した可能性がある。あるいは、Plcg2^{-/-} マウスにおいて異常なリンパ管・血管吻合が形成される部位が明らかになれば、その部位でリンパ管と血管が分離するために血小板とリンパ管内皮細胞の生理的相互作用が必要であると考えられる。これまでの研究で、Plcg2^{-/-} マウスの胎仔皮膚に異常なリンパ管・血管吻合が形成されることを示す結果を得ているが、さらに証拠を得るために解析した。

Plcg2^{-/-};Aspp1^{-/-} マウスにおける血球細胞分布

Plcg2^{-/-} マウスのリンパ管への赤血球の流入が胎仔皮膚の局所で生じていることを示す新しい証拠を得る目的で、頸部の生理的リンパ管・血管吻合の形成とリンパ管ネットワーク形成に異常をきたすAspp1^{-/-} マウスと交配した。Plcg2^{-/-};Aspp1^{-/-} マウスの頸部をリンパ管内皮細胞と血管内皮細胞のマーカーで染色した後に生理的リンパ管・血管吻合の有無を共焦点レーザー顕微鏡解析すると同時に、胎仔皮膚フラットマウント標本をリンパ管内皮細胞・血管内皮細胞・赤血球のマーカーで染色して赤血球の分布を解析した。

(2) 血小板の活性化がリンパ管内皮細胞へ及ぼす作用について

血小板がリンパ管内皮細胞と接触する機会は限定的であり、接触による即時的反応を明らかにすることが特に重要だと考えた。そこで、それらの接触で生じる血小板の活性化に起因するリンパ管内皮細胞の変化を培養内でタイムラプス解析した。

リンパ管内皮細胞に対する血小板の作用

リンパ管内皮細胞培養に血小板を添加して見られる即時的反応をタイムラプス解析した。また、あらかじめ血小板をリンパ管内皮細胞と混ぜて活性化させた活性化血小板培養上清を作製して、リンパ管内皮細胞培養に添加して見られる即時的反応をタイムラプス解析した。

(3) TGF- β がリンパ管内皮細胞へ及ぼす作用および血管との分離に対する役割について

TGF- β は血小板顆粒に多量に含まれていることが知られている。活性化血小板培養上清中のTGF- β を抑制することで、培養上清の活性を抑えることができるかどうか解析した。さらに生体内においてTGF- β 受容体シグナルの役割について解析した。

リンパ管内皮細胞に対するTGF-βの作用

リンパ管内皮細胞培養に活性化血小板培養上清を添加する際に、TGF-βシグナル阻害剤を加えてタイムラプス解析した。リンパ管内皮細胞培養にTGF-βを添加して見られる即時的反応をタイムラプス解析した。

リンパ管・血管分離に対するTGF-βの役割

リンパ管内皮細胞特異的TGF-β受容体ノックアウトマウス胎仔において、皮膚リンパ管内に赤血球が見られることを見出していた。このマウス胎仔の血管内に蛍光標識した抗Podoplanin抗体を注入して、異常なリンパ管・血管吻合部位の同定を試みた。異常吻合が存在すれば、抗体がリンパ管内に流入して内皮細胞に付着し、リンパ管が描出される。

3. 結果

Plcg2^{-/-};Aspp1^{-/-}マウスにおける血球細胞分布

胎生15.5日目にPlcg2^{-/-};Aspp1^{-/-}マウスの頸部を解析したが、生理的リンパ管・血管吻合が形成されていない。このマウス胎仔において、皮膚リンパ管に赤血球が存在していることが確認された。Aspp1欠損の異常によってリンパ管網形成に異常をきたし、リンパ管内皮細胞からなる島様構造が多数認められたが、赤血球を含むものと含まないものの両方が存在した。これらの結果は、Plcg2^{-/-};Aspp1^{-/-}マウス胎仔において見られる皮膚リンパ管への赤血球の流入は、頸部からの血液の逆流ではなくて皮膚の中で生じていることを示唆している。

リンパ管内皮細胞に対する血小板の作用

リンパ管内皮細胞培養に血小板を添加してタイムラプス解析すると、血小板の活性化に応じて速やかにリンパ管内皮細胞が退縮することが明らかになった。また、活性化血小板培養上清も同様の活性を示した。これらの結果は、血小板が活性化されて放出される顆粒内因子がリンパ管内皮細胞を退縮させることを示しており、このリンパ管内皮細胞の即時的退縮を起こすことがリンパ管・血管分離に必要であることを示唆している。

リンパ管内皮細胞に対するTGF-βの作用

リンパ管内皮細胞を退縮させる活性化血小板培養上清の活性はTGF-βシグナル阻害剤の添加によって抑えられることが明らかになった。リンパ管内皮細胞培養にTGF-βを添加すると、リンパ管内皮細胞が退縮することが明らかになった。これらの結果は、血小板が活性化されて放出される顆粒内のTGF-βがリンパ管内皮細胞を退縮させることを示しており、このリンパ管内皮細胞の即時的退縮を起こすことがリンパ管・血管分離に必要であることを示唆している。

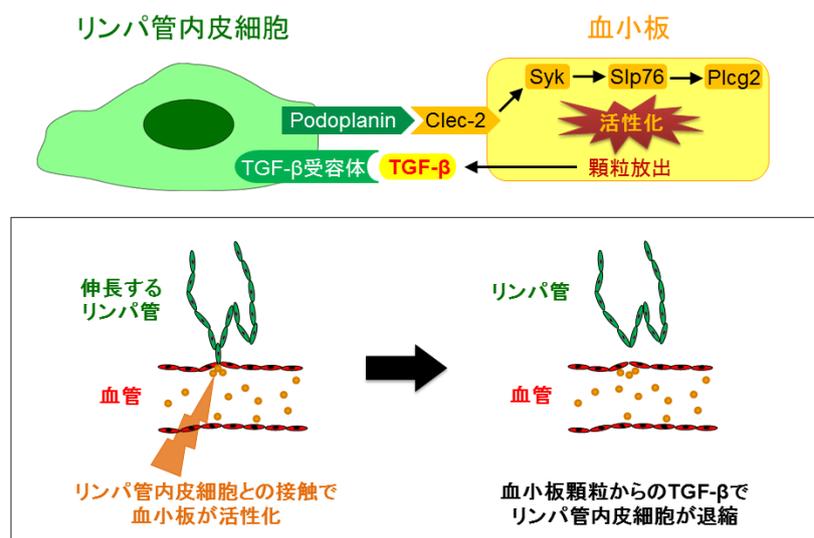
リンパ管・血管分離に対するTGF-βの役割

リンパ管内皮細胞特異的TGF-β受容体ノックアウトマウス胎仔の血管内に抗Podoplanin抗体を注入して異常なリンパ管・血管吻合部位の同定を試みたが、これまでのところ異常なリンパ管・血管吻合は同定できていない。リンパ管網形成が著しく阻害されており、注入した蛍光標識抗体の分布に制限がある可能性がある。

4. 考察

血小板が活性化すると、以下の2つの変化がもたらされる。①血小板凝集塊をつくって血管壁バリアの役割を果たす。②増殖因子・サイトカインや脂質メディエーターなど様々な因子を細胞外へ放出して近傍の細胞にシグナルを惹起する。これまでの研究で、血小板凝集塊が生理的リンパ管・静脈吻合部にある弁に付着して静脈から血液がリンパ管へ逆流することを防ぐ機構が提唱されている(文献1,2) 一方で、新生仔期においてもリンパ管と血管の分離が動的平衡状態にあることを示唆する所見(文献3)や、血小板活性化不全マウスの末梢組織内で異常なリンパ管・血管吻合部位が見つかる我々の知見(文献4と未発表データ)について、提唱されたモデルでは一切説明できない。

血小板がリンパ管と血管の分離を保障する機構



本研究の結果から、「リンパ管が皮膚において伸長する過程で、リンパ管内皮細胞が血管内の血小板を活性化させて、血小板から放出される顆粒内に存在するTGF- β がリンパ管内皮細胞の退縮を誘導することで、リンパ管と血管との吻合が抑制される機構」（上図）の存在が強く示唆される。このリンパ管・血管分離に関する新しい作用機序モデルは、これまでに説明がつかなかった知見も説明することができる。

リンパ浮腫の治療法としてリンパ管・細静脈吻合術が施術されている。リンパ管と血管の分離を保障する血小板の役割と分子機構をさらに明らかにしていくことで、非侵襲的リンパ管・細静脈吻合術の開発なども期待される。

5. 参考文献

- 1) Hess PR, Rawnsley DR, Jakus Z, Yang Y, Sweet DT, Fu J, Herzog B, Lu M, Nieswandt B, Oliver G, Makinen T, Xia L, Kahn ML. Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. *J Clin Invest.* 124(1):273-84, 2014.
- 2) Welsh JD, Kahn ML, Sweet DT. Lymphovenous hemostasis and the role of platelets in regulating lymphatic flow and lymphatic vessel maturation. *Blood.* 128(9):1169-73, 2016.
- 3) Johnson NC, Dillard ME, Baluk P, McDonald DM, Harvey NL, Frase SL, Oliver G. Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev.* 22(23):3282-91, 2008.
- 4) Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem.* 285(32):24494-507, 2010.