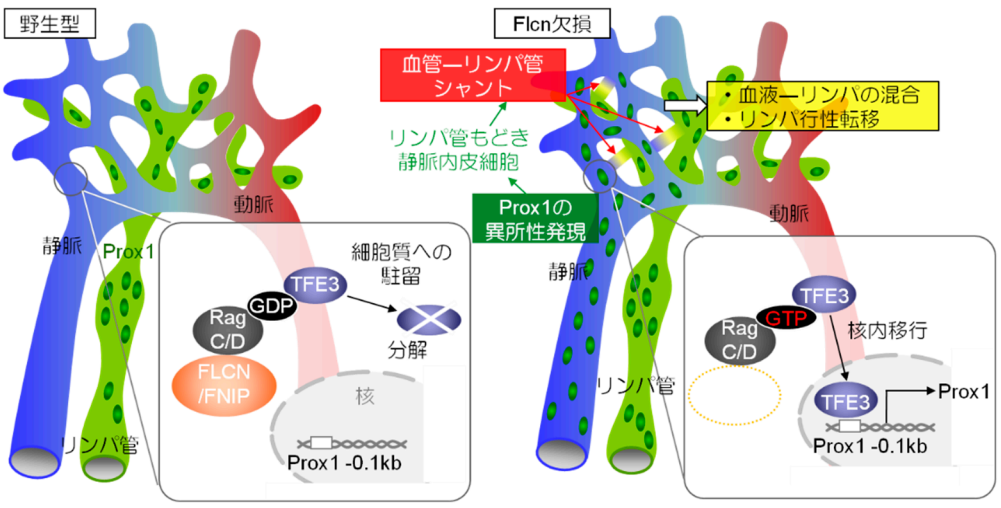
30　血管とリンパ管が独立したネットワークを構築する原理	久保田　義顯

【目的】血管とリンパ管は、別々のネットワークを全身に張り巡らせ、それぞれ独立した機能を発揮する。血管の機能としては、主に肺から取り入れた酸素を、赤血球を担体として末梢組織に運搬し、毛細血管で組織に受け渡す。一方、リンパ管は毛細血管が回収しきれなかった組織液を取り込むとともに、抗原提示細胞のリンパ節への経路、つまり免疫システムの一部として働く。血管とリンパ管は、最終合流地点である頸部の静脈角（胸管と鎖骨下静脈の吻合部位）まで一切接続すること無く、各々が独立したネットワークを形成する。血管とリンパ管、特に静脈とリンパ管の構造・組織学的特徴を比べると、ほぼ見分けがつかないほど酷似しており、両者がお互いをどのように見分け、独立性を担保しているのかは古くからの疑問として残されてきた。本研究は、放っておくと（デフォルト経路として）血管とリンパ管同志は吻合してしまうため、それを防ぐための固有の分子機構が存在するという観点からのアプローチによりその実体を同定すべく進められた。

【方法】多発性肺嚢胞、腎がん、線維毛包種などを典型的症状とする Birt-Hogg-Dubé（BHD）症候群の原因遺伝子として知られる Folliculin（Flcn）に関し、タモキシフェン誘導性血管内皮特異的 *Flcn* 欠損マウス（*Cdh5-Cre*$^{ERT2+}$*Flcn*$^{fl/fl}$）を作製するとともに、リンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 や bHLH 型転写因子 TFE3 との重複欠損マウスを作製し、その表現系を解析した。また、培養血管内皮細胞株における、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法、siRNA によるノックダウン、過剰発現の系や単一細胞 RNA シークエンスなどにより、Flcn と Prox1 とを結びつける分子経路、*Flcn* 欠損血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。

【結果】出生後のタモキシフェン誘導性血管内皮特異的 *Flcn* 欠損マウスでは、静脈とリンパ管との異常吻合による静脈への血球の充満が見られた。また、Flcn が Prox1 の発現量を負に制御しており、血管内皮細胞においてこの制御が破綻すると、血管がリンパ管を接続すべき同志であると認識してしまうことを、*Prox1* とのダブルノックアウトにより見出した。メカニズムとしては、ChIP-seq において、Flcn によって核内移行が制御される TFE3 が Prox1 の E-box 配列を 2 個含む新規エンハンサー領域に結合することを見出した。また、培養血管内皮細胞株における、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法、siRNA によるノックダウン、過剰発現の系により、Flcn と Prox1 の間を媒介するのが TFE3 であることを確認した。さらには、*TFE3* の欠損マウスの交配により、*in vivo* でもこの経路がワークしていることが示された。さらには、単一細胞 RNA シークエンスにより、Flcn が静脈内皮において欠損すると『リンパ管もどき静脈内皮細胞』、つまりリンパ管内皮マーカーの発現が静脈内皮細胞とリンパ管内皮細胞の中間に位置する細胞ポピュレーションが生じ、これが全身いたるところで発生することが、*Flcn* 欠損マウスにおける血管－リンパ管吻合の原因であると考えられた。

血管とリンパ管の分離が維持される仕組み



30. 血管とリンパ管が独立したネットワークを構築する原理

久保田　義顕

慶應義塾大学 医学部 解剖学教室

Key words：リンパ管，Flcn，Prox1，Tfe3，血管

緒　言

血管とリンパ管は、別々のネットワークを全身に張り巡らせ、それぞれ独立した機能を発揮する。血管の機能としては、主に肺から取り入れた酸素を、赤血球を担体として末梢組織に運搬し、毛細血管で組織に受け渡す。一方、リンパ管は毛細血管が回収しきれなかった組織液を取り込むとともに、抗原提示細胞のリンパ節への経路、つまり免疫システムの一部として働く。血管とリンパ管は、最終合流地点である頸部の静脈角（胸管と鎖骨下静脈の吻合部位）まで一切接続すること無く、各々が独立したネットワークを形成する。リンパ管の存在が初めて記載されたのは、350 年前にさかのぼる。それ以降、上記の組織液回収、免疫システムの一部としての機能に焦点が当てられ、特に免疫学の分野において精力的に研究される中、その形態学的な解析については比較的表面的なものに限定されてきた。これは、血管とリンパ管、特に静脈とリンパ管の構造・組織学的特徴を比べると、ほぼ見分けがつかないほど酷似しており、約 15 年前のリンパ管内皮細胞特異的マーカー（Prox1、VEGFR3 など）の発見まで、厳格に区別されてこなかったという経緯がある。古くから中枢神経系にリンパ管は存在しないことが教科書的な定説であったが、実際には脳（正確には髄膜）に存在することがわずか 5 年前に示された［1］のは、上記の経緯を端的に示す一例である。ここ 15 年の間で、血管、リンパ管形成に共通する分子機構、それぞれ固有の分子機構が数多く発見され、この分野は飛躍的に進歩を遂げた。しかしながら、大きな疑問点が残されている。それは、血管とリンパ管の両者がお互いをどのように見分け、独立性を担保しているのかである［2］。

生体内では、臓器によって程度差はあるが、血管とリンパ管とも絶えずリモデリング（新生・退縮）が行われており、時々刻々と変化する環境変化、身体の成長・老化に適応している。例えば、毛包や腸絨毛など、ターンオーバーの活発な組織では、血管・リンパ管のリモデリングも活発である。また、創傷治癒などの組織修復過程や腫瘍組織において、その血管・リンパ管リモデリングの重要度は増す。外傷や炎症で失われた組織が、元通りに修復されるときには、間葉系の組織（例：皮膚における真皮）に血管、リンパ管ネットワークが再構築されるというプロセスが必須である。これら急速に進行する血管・リンパ管リモデリング、特に増生の過程において、新たな枝分かれを作るべく既存の血管、リンパ管から生じたそれぞれの内皮細胞が、お互いを速やかに見分け、間違いなく同志とのみ連結するが、これは、実は不思議な現象であると言える。血管新生・リンパ管新生それぞれに固有の分子機構が存在し、その使い分けで両者が分け隔てられるということになるが、それだけでは両者の厳密な分離は完遂できないと考えられる。本研究では発想を転換し、むしろ放っておくと（デフォルト経路として）血管とリンパ管同志は吻合してしまうため、それを防ぐための固有の分子機構が存在するという観点からのアプローチにより進められた。具体的には、多発性肺嚢胞、腎がん、線維毛包種などを典型的症状とする Birt-Hogg-Dubé（BHD）症候群の原因遺伝子として知られる Folliculin（Flcn）に関し、血管内皮細胞特異的欠損マウスを作製したところ、血管とリンパ管の異常吻合により致死となるという表現型を足掛かりとし、血管内皮細胞における Flcn シグナル経路の詳細、そして、上記表現型の基盤となる細胞動態、遺伝子発現プロファイルを解析することで、血管・リンパ管の独立性を担保する分子機構の全容を明らかにした［3］。

方法および結果

1. Flcn は静脈とリンパ管内皮細胞の可塑性を制御する “gate keeper”として機能する

本研究は、先述の *Flcn* 欠損マウスの表現型を足掛かりとして行われた。まず、この表現型、つまり静脈への血球の充満は出生後のタモキシフェン誘導性血管内皮特異的 *Flcn* 欠損マウス（$Cdh5\text{-}Cre^{ERT2+}Flcn^{fl/fl}$）でも見られた（図 1）。また、Flcn がリンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 の発現量を負に制御しており（図 2）、血管内皮細胞においてこの制御が破綻すると、血管がリンパ管を接続すべき同志であると認識してしまうことを、*Prox1* とのダブルノックアウト（$Cdh5\text{-}Cre^{ERT2+}Flcn^{fl/fl}Prox1^{fl/fl}$）により見出した。メカニズムとしては、ChIP-seq において、Flcn によって核内移行が制御される bHLH 型転写因子 TFE3 が Prox1 の新規エンハンサー領域（E-box 配列を 2 個含む）に結合することを見出した。また、培養血管内皮細胞株における、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法、siRNA によるノックダウン、過剰発現の系により、Flcn と Prox1 の間を媒介するのが TFE3 であることを確認した。さらには、*TFE3* の欠損マウスの交配（$Cdh5\text{-}Cre^{ERT2+}Flcn^{fl/fl}Tfe3^{-/-}$）により、*in vivo* でもこの経路がワークしていることが示された。

2. Flcn が静脈内皮細胞において欠失すると『リンパ管もどき静脈内皮細胞』が生じる

Flcn 欠損マウスにおいては、リンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 が、通常発現することのない静脈内皮細胞に異所性に発現する。この細胞ポピュレーションの characterization が静脈－リンパ管異常吻合のキーであるのは確実であるため、単一細胞 RNA シークエンス（東京大学新領域創成科学研究科の鈴木穣教授との共同研究）により、遺伝子発現のプロファイリング、血管内皮細胞の heterogeneity の観点からの位置づけを検討したところ、『リンパ管もどき静脈内皮細胞』、つまりリンパ管内皮マーカー（VEGFR3、Podoplanin、LYVE1 など）の発現が静脈内皮細胞とリンパ管内皮細胞の中間に位置するポピュレーションであることを見いだした。この『リンパ管もどき静脈内皮細胞』は野生型マウスでもごく限られた特定の箇所で見られる。静脈角のリンパ静脈弁の静脈側内皮、シュレム管内皮がそれにあたる。いずれも静脈内皮でありながら、リンパ管内皮と連続しており、リンパ管内皮と親和性が高く、分化段階で言う移行期の細胞であると言える。この『リンパ管もどき静脈内皮細胞』は *Flcn* 欠損マウスでは、全身いたるところで発生することが、*Flcn* 欠損マウスにおける血管－リンパ管吻合の原因であると考えられた。

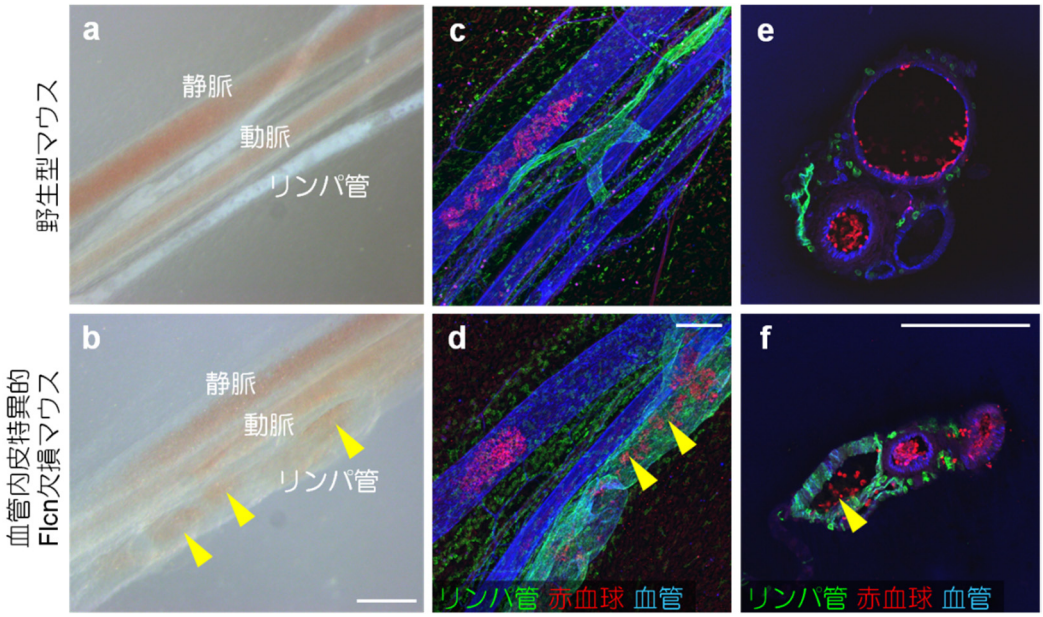


図1. 血管内皮特異的*Flcn*欠損マウスにおける血管―リンパ管異常吻合

野生型（a、c、e）および血管内皮特異的*Flcn*欠損マウス（b、d、f）における腸間膜画像。血管内皮特異的*Flcn*欠損マウスでは血管とリンパ管が異常吻合し、リンパ管内に赤血球が流れている（矢頭）。スケールバー：200 μm。

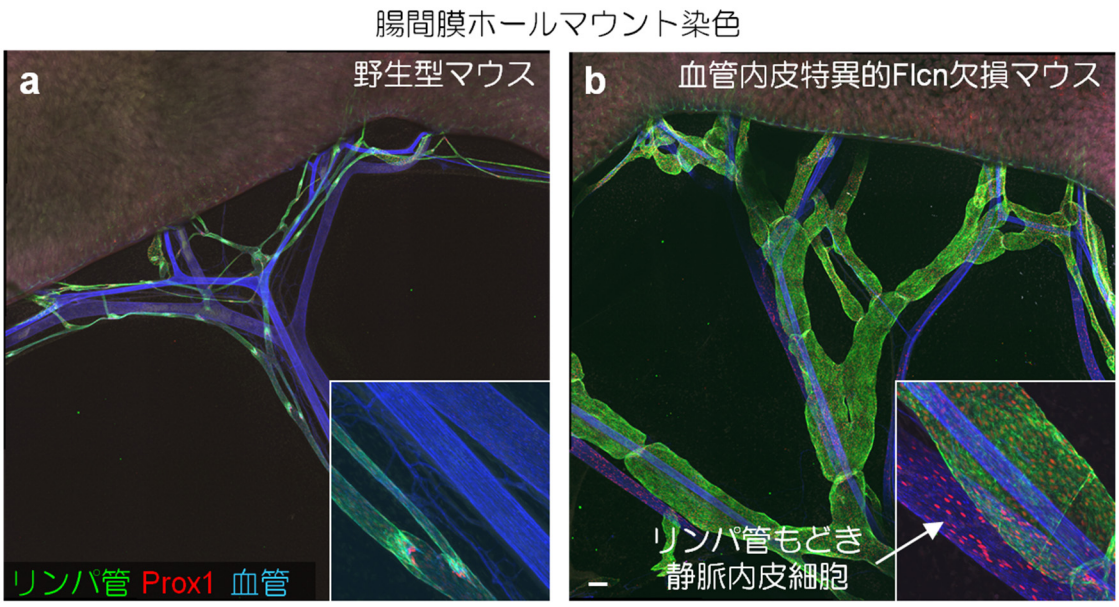


図2. Flcn欠失により生じる『リンパ管もどき静脈内皮細胞』

（a、b）腸管膜ホールマウント染色画像。血管内皮特異的*Flcn*欠損マウスでは静脈にProx1が発現し、「リンパ管もどき静脈内皮細胞」が生じる。スケールバー：200 μ m。

考　察

本研究は、『血管とリンパ管が各々独立してネットワークを構築する』という、広く知られたごく当たり前の事実でありながら、そのプロセスのメカニズムが長年不明となっている生命現象に切り込み、その分子機構を明らかにした。そして、放っておくと血管とリンパ管同士が吻合してしまうため、それを防ぐ分子基盤が存在するということを意味する。生体内における二つの異なる構造物が、最終分化後も積極的にお互いを別物と認識し、合交わらない分子機構があるというコンセプトは、血管以外のシステムにおいても存在すると考えられ、他の分野への波及効果も有すると考える。臨床的側面からは、がん転移、リンパ浮腫などの病態解明、治療への発展性を秘める。リンパ浮腫は大きく 2 つに分類される。一つは原因不明の「特発性リンパ浮腫」であり、もう一つは、がんの外科治療などの後遺症として起こる「続発性リンパ浮腫」である。社会的に特に問題になっているのは後者であり、リンパ節郭清の結果、リンパの還流機能が低下し上肢・下肢に深刻な浮腫（むくみ）が生じる。現在のところ、治療法として運動療法や弾性ストッキングなどの理学療法、鏡視下リンパ管－静脈吻合術が挙げられるが、熟練のマイクロサージャリー（微小外科）の技術を以てしても治療効果が十分とは言い難い。局所で薬剤的に静脈－リンパ管シャント（吻合）を創出できれば、リンパ浮腫の画期的治療になると考える。これを踏まえ、本研究のさらなる展開として、Flcn シグナルにおける適切な分子標的を効果的に制御する薬剤が同定され、臨床試験を経て、想定通り大きな副作用が無く、治療の現場に広く活用されることとなれば、がんサバイバーの GOL 向上を通して、人類全体の健康福祉に大きく貢献できるものと考えている。

共同研究者

本研究の主な共同研究者は、慶應義塾大学医学部の田井育江講師、楠本大博士、佐谷秀行教授、横浜市立大学の蓮見由紀子博士、古屋充子博士、熊本大学の馬場理也博士、佐藤賢文博士、東京大学新領域創成科学研究科の鈴木穣教授である。

文　献

1) Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature. 2015 Jul 16;523(7560):337-41. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26030524　doi: 10.1038/nature14432.

2) Augustin HG, Koh GY. Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. Science. 2017 Aug 25;357(6353):eaal2379. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28775214 doi: 10.1126/science.aal2379.

3) Tai-Nagara I, Hasumi Y, Kusumoto D, Hasumi H, Okabe K, Ando T, Matsuzaki F, Itoh F, Saya H, Liu C, Li W, Mukouyama YS, Marston Linehan W, Liu X, Hirashima M, Suzuki Y, Funasaki S, Satou Y, Furuya M, Baba M, Kubota Y.Blood and lymphatic systems are segregated by the FLCN tumor suppressor. Nat Commun. 2020 Dec 9;11(1):6314. PMID: 33298956 doi: 10.1038/s41467-020-20156-6.