

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	松 井 周 平
論文審査担当者	主 査 菅 野 祐 幸 副 査 多 田 剛 ・ 田 淵 克 彦
論文題目	Endogenous calcitonin gene-related peptide deficiency exacerbates postoperative lymphedema by suppressing lymphatic capillary formation and M2 macrophage accumulation (内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチドの欠乏は、リンパ管形成と M2 マクロファージ集積を抑制することで、術後リンパ浮腫を悪化させる)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景と目的】</p> <p>リンパ浮腫は外科治療や放射線治療などの後遺症として発症し、慢性的に経過して患者の QOL を著しく低下させる病態である。我々は、リンパ管形成の分子メカニズムの解明が、リンパ浮腫の新しい治療法につながると考えた。</p> <p>カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、カルシトニン遺伝子の選択的スプライシングにより産生されるペプチドである。中枢、末梢神経系に広く分布し、主に感覚神経から分泌される。CGRP は主に神経伝達因子や血管拡張因子として捉えられてきたが、近年、血管形成促進、炎症やアポトーシス調節といった多彩な生理作用が報告されている。CGRP はカルシトニン、アドレノメデュリン、インターメディンなどが属するカルシトニンスーパーファミリーの一員である。これらは、7 回膜貫通 G タンパク質共役受容体、カルシトニン受容体様受容体 (CLR) を共有する。CLR のリガンドに対する親和性は 3 つの受容体活性調節タンパク (RAMP1-3) によって決定される。</p> <p>Kurashige らは RAMP1 ノックアウトマウスを用いた創傷治療モデルにおいて、RAMP1 発現マクロファージがリンパ管形成に重要な役割を果たすことを報告した。しかしながら、CGRP は RAMP1/CLR 複合体のみではなく、RAMP2/CLR、RAMP3/CLR 複合体にも結合する。さらに、RAMP1/CLR 複合体には、他のカルシトニンスーパーファミリーも結合するため、CGRP がリンパ管形成に直接的に関与するかは不明である。</p> <p>本研究では CGRP ノックアウトマウス (CGRP<sup>-/-</sup>) を用い、リンパ浮腫における CGRP の病態生理学的意義を検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>8~10 週齢雄の①野生型マウス (WT) と CGRP<sup>-/-</sup>、②マンノシル化クロドロネート (MCLS) を尾静脈投与した WT と CGRP<sup>-/-</sup>、③浸透圧ポンプを用いて CGRP を投与した WT および CGRP<sup>-/-</sup> を用いた。尻尾の皮膚と皮下組織を 3mm 幅で全周性に搔破し、大きな血管やリンパ管の損傷を避けながら、術後リンパ浮腫モデルを作成した。尻尾直径の変化を測定し、リンパ浮腫の発生と消退を評価した。①では 10 日目 (day10) に、尻尾の皮下にインドシアニングリーンを投与し、造影写真を撮影してリンパ管の形態を評価した。①と②では免疫染色を行い、リンパ管と血管形成、マクロファージ動員の程度と極性、CGRP 発現を評価した。さらに、①と②ではリアルタイム PCR を行い、リンパ管形成因子、リンパ管マーカー、サイトカイン、マクロファージマーカーなどの遺伝子発現を評価した。免疫染色とリアルタイム PCR は、①ではモデル導入前 (day0)、day10、day20、②では day10 において行った。</p>

### 【結果】

- ① CGRP-/-ではWTと比較して浮腫が増悪した。両者の浮腫の差はday10で最大となった。CGRP-/-では整った蜂の巣状のリンパ管が観察できなかった。day10でリンパ管形成がCGRP-/-でWTに劣った。一方、血管形成に差はなかった。CGRP-/-ではリンパ管形成因子およびリンパ管マーカーの遺伝子発現が低下していた一方で、炎症促進性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。CGRP-/-ではM2マクロファージマーカーの遺伝子発現が低下していた。免疫染色でもM2マクロファージ動員が低下していた。
- ② MCLsを投与してM2マクロファージを枯渇させた。MCLsを投与したWTではM2マクロファージの遺伝子発現が低下し、免疫染色でもM2マクロファージ動員が低下した。MCLsを投与したWTではリンパ浮腫が増悪し、リンパ管形成が抑制され、リンパ管形成因子の遺伝子発現が低下していた。
- ③ CGRP-/-に対してCGRPを投与したところリンパ浮腫が改善した。

### 【結論】

CGRP欠乏によって、M2マクロファージの動員とリンパ管形成シグナルが抑制される結果、術後リンパ浮腫の消退に必要なリンパ管形成が阻害され、浮腫が増悪することを明らかとした。CGRPは術後リンパ浮腫に対する新しい治療標的になると考えられる。