

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 674 号	氏名	川島隆史
審査委員会委員		主査氏名	馱阿勉 
		副査氏名	藤木 穂 
		副査氏名	加来 信太 
<p>論文題目 Morphological and biochemical changes of lymphatic vessels in the soleus muscle of mice after hindlimb unloading (後肢免荷によるマウスヒラメ筋内リンパ管の組織学および生化学的变化)</p> <p>論文掲載雑誌名 MUSCLE & NERVE</p> <p>論文要旨 背景 リンパ管, 毛細血管は代謝産物のクリアランスや酸素の供給を担い, 代謝活動が高い骨格筋において重要な役割を果たしていると考えられるが, 筋肉内のリンパ管の分布については不明な部分が多い. 筋肉の廃用性萎縮に伴うリンパ管, 毛細血管の分布の変化を検索し, 廃用性萎縮の機構を明らかにすることを目的とした。</p> <p>研究対象および方法 11 週齢雄性マウスを尾部懸垂(Tail suspension; 以下 TS)により 2 週間, 4 週間の後肢免荷したのち(以下, それぞれ 2W-TS 群, 4W-TS 群), ヒラメ筋を採取, 筋繊維横断面積, 毛細リンパ管数, 毛細血管数を測定した。リンパ管新生因子(VEGF-C/D)とそのレセプター(VEGFR-3)のタンパク量, mRNA 量を測定した。</p> <p>結果および考察 2W-TS 群, 4W-TS 群のいずれにおいてもヒラメ筋の筋横断面積は減少し, 萎縮が見られた。リンパ管数は, 2W-TS 群では減少しなかったが, 4W-TS 群では減少した。毛細血管数は, 2W-TS 群, 4W-TS 群で等しく減少がみられた。VEGF-C/D タンパク量は後肢免荷の影響を受けたなかったが, VEGF-C/D の mRNA 転写は減弱していた。VEGFR-3 は後肢免荷により発現が亢進した。 毛細血管は筋萎縮の進行に応じて減少したが, 筋萎縮による酸素需要の減少によるものであり, 毛細リンパ管は筋萎縮の進行に遅れて減少したが, 筋萎縮時に蓄積するアルブミンのクリアランスを担う必要があるためと考えられる。また, VEGF-C/D の mRNA 量や VEGFR-3 の発現の変化から, 毛細血管や毛細リンパ管の減少に VEGF 系の関与が推定される。 廃用性筋萎縮による毛細リンパ管数の減少は, 毛細血管の減少と異なった振る舞いを示したことから, リンパ管は筋萎縮の課程において血管とは異なる役割を果たしている可能性が考えられる。</p> <p>本研究は, 廃用性筋萎縮における微小循環の状態を詳細に検討することにより, 廃用性筋萎縮の病態の一部を明らかにしたものである。 このため, 審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第 674 号	氏 名	川 島 隆 史
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	馱 阿 勉	
	副査氏名	藤 木 稔	
	副査氏名	加 来 信 宏	

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

1. Title において Morphological の和語を組織学的とするのは適切か。
2. VEGF, VEGFR と癌のリンパ節転移との関係はどこまで明らかになっているか。
3. 骨格筋毛細リンパ管の分布を解剖学的に概説せよ。
4. 運動器、特に筋肉におけるリンパ管の役割についてこれまでに判明していることを説明せよ。
5. 筋肉のリンパ管に着目した経緯を説明せよ。
6. Tail suspension (TS) モデルの観察期間 4 週間の妥当性、ラットおよびマウスモデルの差異を説明せよ。
7. 定量しているのは VEGF-C/D と VEGFR-3 は主に細胞質もしくは細胞膜タンパクであるので、核内因子の定量に用いられる TBP ではなく、同じ細胞質の GAPDH や β -actin などを用いた方が適切ではないか。
8. 本研究の方法論でリンパ管数、毛細血管数は正確に計測できるのか。
9. ホモジナイズした筋肉組織の VEGFR-3 の発現が上昇していたからといって、すべてが機能していた膜タンパクであったとは限らず、細胞質内に留まっていたタンパクを計測した可能性もあるが、このデータの信頼性について説明せよ。
10. 2W-TS, 4W-TS において、それぞれ再荷重 3 日のマウスでの VEGF-C/D の mRNA とタンパク発現の解析を行わなかったのは何故か。
11. 実験群における各脈管の形状はどうだったか。
12. TS 期間 2 週から 4 週の延長は萎縮進行を招かなかつたが、この間の筋力について述べよ。
13. Fig-5 の毛細血管とリンパ管由来の VEGF-C/D 変化がないのは、VEGF-C/D の大部分が筋組織由来で占められる結果、少ない毛細血管とリンパ管由来の VEGF タンパクの変化が埋もれてしまっているためではないか。また、TS 郡で VEGFR-3 が上昇し、リガンドである VEGF は有意差をもって変化していないが、これは以下の feedback 機構があるのではないか。①VEGF-C/D の供給源が筋組織であるとする、非荷重によって筋萎縮となり VEGF が減少する。②一時的に VEGFR-3 が上昇する。③しばらくは少ない VEGF でもレセプターが増えることで対応。④4 週経過し、レセプターを増やすだけでは対応できなくなる。
14. 実験群で脈管が減少しているが、その機序はいかなるものか。
15. 4 週間-TS 後は 3 日では回復しなかつたが更なる長期的観察による回復の可能性を述べよ。
16. 筋組織、毛細血管、リンパ管の細胞株があれば、組織の微小環境において、リガンドとレセプターの関係性への理解が深まるのではないか。
17. 廃用性萎縮治療・予防に向けた研究の発展性について考察せよ。

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は 2 本線で抹消すること

学 位 論 文 要 旨

氏名 川島隆史

論 文 題 目

Morphological and biochemical changes of lymphatic vessels in the soleus muscle of mice after hindlimb unloading

(後肢免荷によるマウスヒラメ筋内リンパ管の組織学および生化学的変化)

要 旨

ア. 緒 言

リンパ管は過剰な間質液のクリアランスを担い、代謝活動が高い骨格筋で重要な役割を果たすと考えられる。しかし、代謝活動が大きく変化するトレーニングや廃用による、筋の肥大や萎縮に伴う筋内リンパ管の分布変化については不明である。そもそも、正常骨格筋内リンパ管の分布の定量的な情報も無いに等しい。一方、廃用性筋萎縮のモデルには 2 週間の尾部懸垂 (Tail suspension; 以下 TS) が一般的に用いられる。しかし本モデルには、それ以上の TS 期間を要することを示唆する報告もある。そこで本研究の目的は、TS 期間の異なる筋萎縮とリンパ管や毛細血管の分布との関係を明らかにするとともに、そのメカニズムの一端を明らかにすることである。

イ. 研究対象及び方法 (材料を含む)

11 週齢の C57BL/6 雄性マウスを、後肢免荷のために 2 週間の TS (2 W-TS) および 4 週間の TS (4 W-TS) 実施する群と、同週齢の対照群とに振り分けた。飼育終了後に各群から採取したヒラメ筋の連続横断切片に対し、HE 染色、抗 LYVE-1 抗体 (リンパ管内皮細胞マーカー)、抗 CD31 抗体 (血管内皮細胞マ

一カー)を用いた二重免疫染色を施し、筋線維横断面積や毛細リンパ管数、毛細血管数を測定した。さらに、Western Blotting および Real-Time RT-PCR により、リンパ管新生因子 (VEGF-C/D) とその受容体 (VEGFR-3) のタンパク質量および mRNA 発現量を測定した。

ウ. 結 果

両 TS 群のヒラメ筋線維横断面積は、対照群と比べて有意に小さかった。ただ、TS 期間による違いは無かった。毛細リンパ管数は、2W-TS 群と対照群とで有意な差は無かったが、この2つの群に対して4W-TS 群では有意に少なかった。なお、両 TS 群の毛細血管数は、対照群と比べて有意に少なかったが、TS 期間による違いは無かった。また、対照群と比べた 4W-TS 群の VEGF-C/D の発現は、タンパク質レベルでは差が無かったものの、mRNA レベルでは有意に少なかった。

エ. 考 察

毛細血管は筋萎縮の進行に応じて減少し、毛細リンパ管は萎縮の進行が止まった後に減少することが示唆された。毛細リンパ管は、筋萎縮時に間質領域に蓄積するアルブミンのクリアランスを担うという役割を持つといわれる。よって、筋萎縮の進行中はこの役割が大きくなるためリンパ管数は維持され、萎縮の進行が止まり、その役割が小さくなったために減少したと考える。また、リンパ管数減少のメカニズムについては更なる検証が必要であるが、他の組織と同様に VEGF-C/D が関与している可能性が示唆された。なお、2週間の TS を施行した本マウスは、再荷重3日後に筋線維の太さが回復するという報告がある。一方本研究で、4週間の TS ではその回復が認められないことが判明した。TS 期間を変えた両モデルは、少なくとも微小循環系においてはそれぞれ異なる特徴を持っており、各廃用性筋萎縮の時期に対する有効な理学療法研究にも役立つものと考ええる。

オ. 結 語 (まとめ)

廃用性筋萎縮による毛細リンパ管数の減少は、筋萎縮や毛細血管の減少に遅れて生じることが判明した。リンパ管は筋萎縮の過程において、血管とは異なる重要な役割を果たす可能性があると考ええる。