
リンパ管特異的マーカーの形態的・機能的解析

(課題番号：14207001)

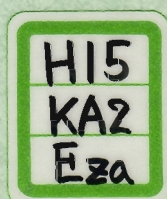
平成14年度～平成15年度科学研究費補助金

[基盤研究(A)(2)] 研究成果報告書

平成16年3月



研究代表者： 江崎 太一
(東京女子医科大学 医学部 教授)



は し が き

リンパ管は、局所の組織液のみならず脂質や巨大分子、さらには生体防御に関わるリンパ系細胞の吸収など重大な役割を担っている。また悪性腫瘍の転移経路として臨床的にもその意義は極めて大きい。とりわけ毛細リンパ管は、血管系とは全く異なる選択的吸収に関与しており、リンパ管としての機能の中核をなす。しかし、その選択的吸収のメカニズム、つまり機能特異性はおろか毛細リンパ管の組織内の微細分布すら未だに確立されていない。その最大の理由は、リンパ管を形態学的に厳格に同定・判別し、その内皮細胞の機能特異性を証明する手段が無いことによると思われる。我々は、これまでリンパ管をはじめ細静脈や毛細血管などの微小脈管群の持つ機能特異性を把握する上で、最も確実に信頼度の高い手段としてモノクローナル抗体の開発を進めてきた。そしてついに、LA102抗体というリンパ管特異的な抗体を得ることができた。本研究は、その抗体が認識するリンパ管特異的マーカーの解析のために、形態学のみならず、免疫学、炎症学の夫々の立場からエキスパートがチームを作り、マーカー蛋白分子の組織内微細分布、生化学的性状、遺伝子、アミノ酸配列、機能解析までの一連の共同研究を効率良く行ったものである。

この研究は、形態解析を基礎としたものであるが、その成果は、単にリンパ学や免疫生物学に新たな展開をもたらすのみならず、浮腫の成因や癌細胞の転移機序の理解につながるとともに、これらの病態の治療にも重大な示唆を与えるものである。

研究組織

平成14年度

- 研究代表者 : 江崎 太一 (東京女子医科大学 医学部 教授)
研究分担者 : 森川 俊一 (東京女子医科大学 医学部 助手)
研究分担者 : 松島 綱治 (東京大学大学院 医学系研究科 教授)
研究分担者 : 桑原 一彦 (熊本大学 医学部 助手)

平成15年度

- 研究代表者 : 江崎 太一 (東京女子医科大学 医学部 教授)
研究分担者 : 森川 俊一 (東京女子医科大学 医学部 助手)
研究分担者 : 松島 綱治 (東京大学大学院 医学系研究科 教授)
研究分担者 : 桑原 一彦 (熊本大学大学院 医学薬学研究部 講師)

本研究は研究分担者の他に以下の方々（敬称略）のご協力によって遂行された。
ここに心より謝意を表する。

- （研究協力者） : 松野健二郎 (獨協医科大学 医学部 教授)
 阪口 薫雄 (熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授)
 浴野 成生 (熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授)
 石川 昌 (東京大学大学院 医学系研究科 助教授)
 伊藤 利洋 (東京大学大学院 医学系研究科 院生)
 村井 政子 (東京大学大学院 医学系研究科 研究員)
 中澤 俱子 (東京女子医科大学 医学部 講師)
 出崎 順三 (愛媛大学 医学部 講師)
 D.M. McDonald (USA, UCSF 医学部 教授)
 P. Baluk (USA, UCSF 医学部 講師)

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	24,800	7,440	32,240
平成15年度	8,300	2,490	10,790
総計	33,100	9,930	43,030

研究発表

(1) 学会誌等

1. 発表者名 : S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R.K. Jain, D.M. McDonald
テーマ名 : Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.
学会誌名 : Am. J. Pathol.
巻(号)頁 : 160 (3): 985-1000
年月日 : 2002年
2. 発表者名 : J. Desaki, S. Oki, T. Ezaki
テーマ名 : Remodelling of capillary networks around muscle fibers in the extensor digitorum longus muscle of the normal aged rat.
学会誌名 : J. Electron Microsc.
巻(号)頁 : 51 (3): 183-194
年月日 : 2002年
3. 発表者名 : J. Desaki, T. Ezaki
テーマ名 : Discontinuous capillary segments in the extensor digitorum longus muscle of aged BUF/Mna rats.
学会誌名 : J. Electron Microsc.
巻(号)頁 : 51 (6): 426-439
年月日 : 2002年
4. 発表者名 : T. Nakazawa, S. Morikawa, M. Nishikawa, T. Ezaki, E. Aikawa
テーマ名 : Production of polyclonal antibodies against perivascular macrophages (Mato's FGP cells) isolated from rat brain microvessels.
学会誌名 : Acta Histochem. Cytochem
巻(号)頁 : 36 (2) : 173-178
年月日 : 2003年
5. 発表者名 : 江崎太一、森川俊一、村井政子、松野健二郎
テーマ名 : 炎症局所におけるリンパ管および微小循環系の形態的・機能的変化
報告書名 : 東京女子医科大学総合研究所紀要
巻(号)頁 : 23 : 7-8
年月日 : 2003年

6. 発表者名 : S.Fujimura, K. Kuwahara, T. Ezaki, K.Tomita, S.Hirose, N.Sakaguchi
 テーマ名 : Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice.
 学会誌名 : J. Autoimmunity
 巻(号) 頁 : 20 : 291-301
 年月日 : 2003年
7. 発表者名 : M. Murai , H. Yoneyama, T. Ezaki, M. Shigematsu, Y. Terashima, A. Harada, H. Hamada, H. Asakura, H. Ishikawa, K. Matsushima
 テーマ名 : Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction.
 学会誌名 : Nature Immunol.
 巻(号) 頁 : 4 (2) : 154-160
 年月日 : 2003年
8. 発表者名 : S. Morikawa, P. Baluk, A. Haskell, M. Mancuso, D.M. McDonald
 テーマ名 : Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.
 学会誌名 : Am. J. Pathol.
 巻(号) 頁 : 163 (5): 1801-1815
 年月日 : 2003年
9. 発表者名 : T. Ito, S. Ishikawa, T.Sato, K.Akadegawa, H.Yurino, M. Kitabatake, S. Hontsu, T. Ezaki, H. Kimura, K. Matsushima
 テーマ名 : Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 cells in the target organs in a murine model for SLE.
 学会誌名 : J. Immunol.
 巻(号) 頁 : 172:3628-3634
 年月日 : 2004年
10. 発表者名 : T. Ezaki, K. Kuwahara, S. Morikawa, K. Matsuno, N. Sakaguchi
 テーマ名 : Characterization of adjuvant-induced rat lymphangiomas as a model to study the lymph drainage from abdominal cavity.
 学会誌名 : Jap. J. Lymphology
 巻(号) 頁 : in press
 年月日 : 2004年

- 1 1. 発表者名 : S. Morikawa, K. Kuwahara, N. Sakaguchi, K. Matsushima, T. Ezaki
 テーマ名 : A new marker for lymphatic endothelial cells recognized by a monoclonal antibody.
 学会誌名 : Progress in Lymphology XIX
 巻(号)頁 : in press
 年月日 : 2004年
- 1 2. 発表者名 : 森川俊一、江崎太一
 テーマ名 : トマトレクチンを用いた血管三次元イメージング法
 雑誌名 : 生体の科学, 金原出版
 巻(号)頁 : 印刷中
 年月日 : 2004年

(2) 口頭発表

1. 発表者名 : S. Morikawa, Y. Kubota, T. Ezaki
 テーマ名 : A new approach to the microvasculare remodeling in cancers and inflamed tissues.
 学会名 : 第108回日本解剖学会総会・全国学術集会
 シンポジウム「三次元バイオイメージングの新たなる潮流」
 年月日 : 平成15年(2003年)4月1日 (福岡)
2. 発表者名 : T. Ezaki, S. Morikawa
 テーマ名 : Morphological and functional specificities of lymphatic endothelial cells.
 学会名 : 第108回日本解剖学会総会・全国学術集会
 シンポジウム「脈管新生における血管とリンパ管内皮の果たす役割」
 年月日 : 平成15年(2003年)4月1日 (福岡)
3. 発表者名 : 村井政子、米山博之、江崎太一、末松誠、石川博通、松島綱治
 テーマ名 : バイエル板は急性移植片対宿主病の発端場所である。
 学会名 : 第27回 日本リンパ学会総会
 シンポジウム「免疫担当細胞のマイグレーション - その新しい展開」
 年月日 : 平成15年6月12日 (東京)

4. 発表者名 : S. Ishikawa, T. Sato, T. Ito, K. Akadegawa, H. Yurino,
M, Kitabatake, K. Matsushima
 テーマ名 : Aberrant B1 cell trafficking in a murine for SLE: Possible roles for
auto-antibody production by B1 cells and for breakdown of central
tolerance in the thymus.
 学会名 : 12th International Symposium on Molecular Cell Biology of
Macrophages
 年月日 : 平成15年 (2003年) 6月19日 (栃木)
5. 発表者名 : S. Morikawa, K. Kuwahara, N. Sakaguchi, K. Matsushima,
T. Ezaki
 テーマ名 : A new marker for lymphatic endothelial cells recognized by a
monoclonal antibody.
 学会名 : XIXth International Congress of Lymphology
第19回国際リンパ学会
 年月日 : 平成15年 (2003年) 9月1日 (Freiburg・ドイツ)
6. 発表者名 : S. Morikawa, T. Ezaki
 テーマ名 : 創傷治癒過程における血管・リンパ管再生機序の三次元的
解析
 学会名 : 第28回 日本リンパ学会総会 兼 アジア太平洋合同
リンパ学会
シンポジウム「リンパ管新生・再生研究の新展開」
 年月日 : 平成16年 (2004年) 6月19日 (富山) 発表予定
7. 発表者名 : S. Morikawa, T. Ezaki
 テーマ名 : Three dimensional imaging of the lymphangiogenesis in
high-metastatic and low-metastatic mouse tumors.
 学会名 : 16th International Congress of The IFAA
(第16回 国際解剖学会)
シンポジウム「Lymphangiogenesises and cancer metastasis」
 年月日 : 平成16年 (2004年) 8月22日 (京都) 発表予定

(3) 出版物 : なし

研究成果

研究目的：

これまでリンパ管をはじめ細静脈や毛細血管などの微小脈管群の持つ機能特異性を把握する上で、最も確実に信頼度の高い手段としてモノクローナル抗体の開発を進めてきた。その中で、マウスのリンパ管に極めて特異性の高いモノクローナル抗体(仮称：LA102)を得た。そこで本研究では、この抗体を用いてリンパ管特異的マーカーとしてのLA102蛋白の形態的、機能的解明を目的とする。

そのために、我々が開発した多重免疫染色法と分子生物学的手法を主な研究手段として、このLA102蛋白の；

- (1) 組織内微細分布の解析と形態学的特異性の証明 (平成14、15年度)、
- (2) 免疫細胞生物学的性状の解析 (平成14、15年度)、
- (3) この蛋白をコードする遺伝子のクローニングとアミノ酸配列の決定、
(平成14、15年度)

(4) 生体内における機能、特にリンパ系細胞の回収機能の実証 (平成15年度)、
を以下のように行った。

研究計画・方法：

まず、リンパ管が豊富で、組織の丸ごと標本 (whole mount) による三次元解析の容易な材料として、マウスの耳介、腸間膜、大網、横隔膜などを用いた。リンパ系細胞のソースとして、成熟細胞をリンパ節や脾臓、未成熟な細胞を骨髄や胸腺より分離採取する。また、既存のマウスリンパ系腫瘍細胞株として、2B4, EL4, BW5147などの細胞を用いた。細胞培養のためのリンパ管内皮のソースは、アジュバントを腹腔内に投与することにより誘導した良性のリンパ管腫をコラゲナーゼ処理することにより分離したものをを用いた。また、正常状態ではほとんど検出不可能なケモカインや細胞接着因子の存在も想定し、局所に炎症を起こすことによって、その誘導を試みた。炎症刺激としては、Oyster-glycogen、バクテリア由来LPS、異系動物のリンパ球などを局所に微量注射した。

1. 組織内微細分布の解析と形態学的特異性の証明：

A) 抗原の組織内微細分布の解析；

従来のリンパ管描出法と比較しながら、多重免疫染色法により抗原の局在を検索し、光顕と免疫電顕を用いて抗原の部位特異性を解析した。

B) 三次元レベルでの位置関係の解析；

リンパ管とその関連物質(LYVE-1、5'-nucleotidase 他)、リンパ系細胞との相関や局所における個々の微小循環系(CD31、トマトレクチン標識*)の位置関係を共焦点レーザー顕微鏡を用いて把握する。

*トマトレクチン灌流による血管の描出法：

ベクター社のビオチン化またはFITC標識トマトレクチン100 µgを静脈内投与し、約5分後に心臓より固定液を灌流し、臓器を取りだし凍結切片用に凍結する(Ezaki et. al, Am J Patho., 2001)。さらに約10 µmの凍結切片を作製し蛍光抗体法または酵素抗体法で多重免疫染色を施したのち観察した。

C) リンパ管内皮細胞の培養と株化；

アジュバントで誘導した良性のリンパ管腫よりLA102標識磁性ラテックスによるポジティブ選択を行った後、リンパ管内皮細胞を単離培養し、さらに限界希釈法によって株化を行った。

2. 免疫細胞生物学的性状の解析：

A) 抗体の精製と標識〔ビオチン化および蛍光色素〕；

LA102抗体はそれを産生しているハイブリドーマ細胞を培養して培養上清を得るか、またはマウスの体内で腹水として採取した。さらに塩析後、ProteinGアフィニティーカラムにて分離精製した。LA102と同じ方法で得られたマウスの血管内皮を認識するモノクローナル抗体LA5も同時に培養上清または腹水より分離精製した。

B) 抗原蛋白の分離精製と免疫生化学的性状解析；

LA102陽性細胞株 2B4の膜成分を採取し、LA102抗体との免疫沈降後、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

C) LA102陽性リンパ系細胞の免疫学的特徴の検索；

CD抗原やその他の細胞マーカーとの二重染色により陽性細胞を特定した。

3. この蛋白をコードする遺伝子のクローニングとアミノ酸配列の決定：

A) LA102抗原蛋白の遺伝子のクローニング；

LA102陽性2B4細胞のcDNAライブラリーをpEF-BOSに組み込んでおいて、これを293T細胞に遺伝子導入することにより発現クローニングをFACSを用いて行った。

B) LA102抗原の質量解析(LC-MASS)による検索；

LA102陽性の2B4細胞の膜蛋白を抽出後、アミノ酸質量分析(LC-MASS)をした。

4. 生体内における機能、特にリンパ系細胞の回収機能の実証：

LA102抗体による機能抑制作用をリンパ管内皮細胞とリンパ系細胞の両面から検索した。局所での形態変化は、共焦点レーザー顕微鏡による三次元的画像解析を行った。

LA102抗原や、その他の分子の機能を考えるとき、リンパ管とリンパ系細胞との接着反応への関与が重要な鍵を握る。そこで、マウスTリンパ球を用いてリンパ管を含んだ組織切片上で細胞遊走・接着の阻害試験(Uwatoku et al., 2001)を行った。新鮮凍結切片上に、リンパ球他、培養細胞の浮遊液を載せて、室温で30分間約50rpmのスピードで回転培養を行った。その後、静かに細胞を洗い落とし、軽く固定後免疫染色を行い、リンパ管や細胞の同定を行った。接着阻止試験時は、切片または細胞をあらかじめLA102抗体と反応させておいて、その後接着反応を試みた。

研究結果：

本研究ではこのLA102抗体の認識するマーカー蛋白の解明のために、形態学(江崎、森川)、免疫学(桑原)、炎症学(松島)の立場から、リンパ管特異的マーカー蛋白の組織内微細分布、生化学的性状、遺伝子、アミノ酸配列、機能特異性までの研究を2カ年で推進した。研究の遂行責任、総括、成果の発表は江崎を中心として行った。

1. 組織内微細分布の解析と形態学的特異性の証明：

- A) 顕微鏡と免疫電顕による抗原の組織内微細分布の解析（江崎分担）；
LA102抗原は、リンパ管の内皮の基底側ならびに管腔側のすべての細胞膜上に存在し、特に飲み込み小包と見られる小包により強く認められた。
- B) 共焦点レーザー顕微鏡による三次元レベルでの位置関係の解析（森川分担）；
リンパ系細胞との関係や局所の微小血管系との位置関係を検索したところ、LA102抗原は血管とは全く異なる局在を示し、それがリンパ管系であることが明確となった。
- C) リンパ管内皮細胞の培養と株化（江崎分担）；
リンパ管腫より単離した内皮様細胞を継代培養し、さらにLA102抗体標識磁性ラテックスによってLA102抗原陽性内皮細胞を選択的に採取することができた。

2. 免疫細胞生物学的性状の解析：

- A) 抗体の精製と標識（江崎分担）；
腹水から大量の抗体を精製、さらに蛍光色素を標識した。また、LA102抗体はそのアイソタイプがラットIgG1, kタイプであることを確認した。
- B) LA102抗体カラムによる抗原蛋白の分離精製と免疫生化学的性状解析（松島分担）；
LA102抗原を分離精製し、抗原は約25～27kdの糖蛋白であることを確認した。
- C) 蛍光標識細胞解析装置(FACS)によるLA102抗体陽性細胞の解析（桑原分担）；
この抗原がリンパ管内皮以外ではT細胞系の膜表面に選択的に存在することが分かった。また、脳組織も陽性であった。（江崎分担）

3. LA102分子の遺伝子解析とアミノ酸配列の決定：

- A) LA102蛋白の遺伝子解析のために、LA102陽性の2B4細胞のc-DNAライブラリを作製し、遺伝子発現スクリーニング法を開発した。（桑原分担）
- B) LA102抗原の質量解析(LC-MASS)による検索；
LA102陽性の2B4細胞の膜蛋白を抽出後、アミノ酸質量分析(LC-MASS)をした結果、CD90分子に近似した分子であった。（松島分担）
- C) 現在更にこの分子の遺伝子クローニングと他の蛋白（特に細胞接着因子やケモカイン）とのホモロジーなどを検索中である。（松島・江崎分担）

4. 生体内における機能、特にリンパ系細胞の動態・回収機能の解析：

- A) 自己免疫病モデルマウスを用いた腹腔からのリンパ行性転位モデルを確立し、微小血管群とリンパ管の細胞移動に対する関与を解析した。（松島・江崎分担）
- B) Oyster-glycogenによる炎症モデルを用いて、in vitroでの細胞接着阻止実験を行ったところ、LA102抗体がリンパ管以外の組織（肝臓、胸腺皮質、リンパ節T細胞領域など）切片上で細胞の接着を抑制する傾向が見られた。（江崎分担）

C) また、アジュバントで誘導したリンパ管腫細胞株上でも、LA102抗体による細胞の組織への接着阻止が弱いながら観察された。(江崎分担)

以上より、LA102抗原分子がリンパ系細胞の移動や接着に関与する可能性が示唆された。

結果の総括と考察：

本研究では、これまでに無いリンパ管内皮に特異的な全く新しいLA102抗原が発見・解析された。この抗原は、リンパ管内皮の基底面および管腔面に局在し、分子量約25~27kdのタンパク質で、従来リンパ管に選択的とされているLYVE-1や Podoplanin などとは異なる全く新しい分子であった。LYVE-1は、リンパ管に特異的なヒアルロン酸受容体として、遺伝子解析から偶然に発見された分子であり、リンパ球系の細胞には存在は確認されていない。またPodoplaninも、腎臓の足細胞の特異的なマーカーとして発見されたが、単にリンパ管と交差性があるというだけでその意義は証明されていない。これらに対して、LA102抗原は胸管を除くほとんど全てのリンパ管内皮に特異的であるのと同時に、Tリンパ球系を中心とした、いわゆるリンパ球再循環を行う細胞群の一部にも存在することから、リンパ管の細胞回収機構やリンパ球の再循環機構の中で重要な役割を担っている可能性がある。また、膜を介する物質の輸送機構にも何らかの役割を果たしている可能性も出てきた。その分子量からするとCD9やCD90など比較的小分子との異同も注目される。現時点ではまだ、まだこの分子の免疫生物学的意義の完全解明には至っていないものの、興味深い実験が現在進行中であり結果が楽しみである。今後、この分子の機能的な側面ならびに遺伝子の全シーケンスを明らかにすべくなお検索中である。

結語ならびに謝辞

最近の血管に関する研究は、急速な進歩を遂つつあるものの、リンパ管に関してはその立ち遅れが目につく。つまり、最近ようやくリンパ管の確定方法が確立され始めたばかりで、リンパ管についての基本的な理解がされていない。その意味でも、本研究はリンパ管研究にとって新しい展開をもたらすための第一歩である。本研究の結果、これまで報告されたことの無い全く新しいリンパ管特異的分子を発見することができ、大きな収穫となった(論文投稿準備中)。以上の研究成果の一部は、第28回日本リンパ学会総会(平成16年6月19日、富山)でのシンポジウム並びに第89回国際解剖学会(平成16年8月、京都)でのシンポジウムで発表予定である。また、国際的雑誌に投稿準備中である。

最後に、この科学研究費補助金を基に本研究を遂行させていただいたことに関して、全ての関係者各位に心より感謝の意を表したい。また、本研究を遂行するに当たって、多大な協力をいただいた教室の、清水一彦、笠原弘美、久保田康子、中田和子、守屋佳恵の各氏にも御礼を申し上げたい。

平成 15 年度科学研究費補助金研究成果報告書概要

- 1.研究機関番号

3	2	6	5	3
---	---	---	---	---

 2.研究機関名 東京女子医科大学
- 3.研究種目名 基盤研究(A)(2) 4.研究期間 平成14年度～平成15年度
- 5.課題番号

1	4	2	0	7	0	0	1
---	---	---	---	---	---	---	---
- 6.研究課題名 リンパ管特異的マーカーの形態的・機能的解析

7.研究代表者

研究者番号	研究代表者氏名	所属部局名	職名
1 0 1 2 8 2 5 9	フリガナ エザキ タイチ 江崎, 太一	医学部	教授

8.研究分担者（所属機関名は、研究代表者の所属機関と異なる場合に記入すること）

研究者番号	研究分担者氏名	所属機関名・所属部局名	職名
7 0 3 3 9 0 0 0	フリガナ モリカワ シュンイチ 森川, 俊一		助手
5 0 2 2 2 4 2 7	フリガナ マツシマ コウジ 松島, 綱治	東京大学大学院・ 医学系研究科	教授
1 0 2 6 3 4 6 9	フリガナ クワハラ カズヒコ 桑原, 一彦	熊本大学大学院・ 医学薬学研究部	講師

9.研究成果の概要（当該研究期間のまとめ、600～800字、図、グラフ等の記載はしないこと）

本研究ではLA102抗体の認識するリンパ管特異的マーカーの組織内微細分布、生化学的性状、遺伝子、アミノ酸配列、機能までの解析を2カ年で推進した。

1. 組織内微細分布の解析と形態学的特異性の証明：

(1)LA102抗原は血管とは全く異なる局在を示し、リンパ管に特異的であった。(2)LA102抗原は、リンパ管の内皮の基底側ならびに管腔側のすべての細胞膜上に存在し、特に飲み込み小包と見られる小包にも強く認められた。(3) 良性のリンパ管腫よりLA102抗原陽性内皮細胞を選択的に単離し株化することができた。

2. 免疫生物学的性状の解析：

(1)LA102抗体はそのアイソタイプがラットIgG2b, κであった。(2)LA102抗体カラムにより抗原を分離精製した結果、抗原は約25～27kdの糖蛋白であった。(3) この抗原がリンパ管内皮以外では主にT細胞系の膜表面に選択的に存在した。また、脳組織も陽性であった。

3. LA102分子の遺伝子解析とアミノ酸配列の検索：

(1)LA102陽性の2B4細胞の膜蛋白を抽出後、アミノ酸質量分析(LC-MASS)をした結果、CD90分子に近似した分子であった。(2) 現在更にこの分子の遺伝子クローニングと他の蛋白（特に細胞接着因子やケモカイン）とのホモロジーなどを検索中である。

4. 生体内における機能、特にリンパ系細胞の回収機能の検索：

LA102抗体による機能抑制作用をリンパ管内皮細胞とリンパ系細胞の両面から検索した。(1) まず腹腔からの細胞の移動モデルを確立し、横隔膜ならびに大網における微小血管群とリンパ管の関与を証明した。(2) さらに炎症モデルにおいて、LA102抗体が組織切片上（肝臓、胸腺皮質、リンパ節T細胞領域など）で細胞の接着を抑制する傾向が見られた。

10.キーワード

- (1) 微小循環 (2) リンパ管 (3) 内皮細胞
 (4) モノクロナール抗体 (5) リンパ球再循環 (6) 細胞接着
 (7) レクチン受容体 (8) リンパ管新生 (裏面に続く)

11.研究発表（発表予定を含む。但し、投稿中、投稿準備中は除く。）

[雑誌論文]

著者名	論文標題			
S. Morikawa et al.	Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
Am. J. Pathol.	163 (5)	2	0 0 3	1801-1815

著者名	論文標題			
T. Nakazawa et al.	Production of polyclonal antibodies against perivascular macrophages (Mato's FGF cells) isolated from rat brain microvessels.			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
Acta Histochem. Cytochem.	36 (2)	2	0 0 3	173-178

著者名	論文標題			
S. Fujimura et al.	Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice.			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
J. Autoimmunity	20	2	0 0 3	291-301

著者名	論文標題			
M. Mural et al.	Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction.			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
Nature Immunol.	4 (2)	2	0 0 3	154-160

著者名	論文標題			
T. Ito et al.	Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 c in the target organs in a murine model for SLE.			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
J. Immunol.	172	2	0 0 4	3628-3634

著者名	論文標題			
T. Ezaki et al.	Characterization of adjuvant-induced rat lymphangiomas as a model to study the lymph drainage from abdominal cavity.			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
Jap. J. Lymphology	in press	2	0 0 4	

著者名	論文標題			
江崎太一 ら	炎症局所におけるリンパ管および微小循環系の形態的・機能的変化			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
東京女子医科大学総合研究所紀要	23	2	0 0 3	7-8

著者名	論文標題			
森川俊一 ら	トマトレクチンを用いた血管三次元イメージング法			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
生体の科学	55(3)	2	0 0 4	掲載予定

[図書]

著者名	出版社			
書名	発行年		総ページ数	

12.研究成果による工業所有権の出願・取得状況：なし

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID
FOR SCIENTIFIC RESEARCH (2003)

- 1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 3 2 6 5 3
- 2. RESEARCH INSTITUTION : Tokyo Women's Medical University
- 3. CATEGORY : Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (2)
- 4. TERM OF PROJECT : 2 0 0 2 ~ 2 0 0 3
- 5. PROJECT NUMBER : 1 4 2 0 7 0 0 1
- 6. TITLE OF PROJECT : Morphological and functional characterization of a specific marker for lymphatic vessels.

7. HEAD INVESTIGATOR :

REGISTERED NO.	NAME :	INSTITUTION, DEPARTMENT :	TITLE OF POSITION :
1 0 1 2 8 2 5 9	Ezaki, Taichi	Tokyo Women's Medical University, Anatomy & Developmental Biology	Professor

8. INVESTIGATORS :

REGISTERED NO.	NAME :	INSTITUTION, DEPARTMENT :	TITLE OF POSITION :
(1) 7 0 3 3 9 0 0 0	Morikawa, Shunichi	(same as above)	Assistant Professor
(2) 5 0 2 2 2 4 2 7	Matsushima, Kouji	Univ of Tokyo, Graduate School of Medicine, Molecular Preventive Medicine	Professor
(3) 1 0 2 6 3 4 6 9	Kuwahara, Kazuhiko	Kumamoto Univ, Graduate Sch of Med & Pharm, Immunology	Lecturer

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS :

A specific marker for mouse lymphatic vessels has been characterized morphologically and functionally using a rat monoclonal antibody, LA102. 1. Specificity of LA102 antibody and tissue distribution of its antigen : (1) LA102 recognized mouse lymphatic vessels, but not blood vessels. (2) The antigen recognized by LA102 was localized on both luminal- and basal-side cell membrane of lymphatic endothelium and was also highly condensed on the pinocytic or transport vesicle membrane. (3) LA102 positive endothelial cells were isolated from a benign lymphangioma and established as a cell line. 2. Immunobiological characterization of the LA102 antigen: (1) The isotype of LA102 antibody was rat IgG2b, κ . (2) The LA102 antigen was a glycoprotein with a molecular size of 25-27 kDa. (3) LA102 antigen was also expressed on mainly T lymphocytes and cerebral tissues. 3. Molecular and genetical characterization of LA102 antigen : (1) LC-MASS analyses revealed that LA102 antigen has a similar amino acid sequence to CD90 molecule. (2) Genetical analyses of LA102 antigen have been underway comparing with CD90 and some other related molecules (such as cell adhesion molecules and chemokines). 4. Functional characterization of LA102 antigen: (1) Several experimental models for cell migration from the peritoneal cavity have been established. The diaphragm and omentum were the main lymphatic routes from the peritoneal cavity. (2) In an inflammatory model, LA102 antibody seemed to inhibit cell binding to various tissues, such as the liver, thymus, lymph nodes. These results suggest that LA102 might play an important role in the lymphoid cell migration and some transporting mechanisms through lymphatics under both normal and pathological conditions.

10. KEY WORDS :

- | | | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------|
| (1) Microcirculation | (2) Lymphatic Vessel | (3) Endothelial Cell |
| (4) Monoclonal Antibody | (5) Lymphocyte Recirculation | (6) Cell Adhesion |
| (7) Lectin Receptor | (8) Lymphangiogenesis | (CONTINUE TO NEXT PAGE) |

11. REFERENCES :

AUTHORS, TITLE OF ARTICLE	JOURNAL, VOLUME (NUMBER) : PAGES CONCERNED, YEAR
S.Morikawa et al. , Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.	Am. J. Pathol., 163 (5) : 1801-1815, 2003
T.Nakazawa et al. , Production of polyclonal antibodies against perivascular macrophages (Mato's FGP cells) isolated from rat brain microvessels	Acta Histochem. Cytochem., 36 (2) : 173-178, 2003
S.Fujimura et al. , Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice.	J. Autoimmunity, 20 : 291-301, 2003
M. Murai et al. , Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction.	Nature Immunol., 4 (2) : 154-160, 2003
T. Ito et al. , Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 cells in the target organs in a murine model for SLE.	J. Immunol., 172 : 3628-3634, 2004
T. Ezaki et al. , Characterization of adjuvant-induced rat lymphangiomas as a model to study the lymph drainage from abdominal cavity.	Jap. J. Lymphology, : in press, 2004
T. Ezaki et al. , Morphological and functional changes in lymphatics and microcirculatory systems at local inflammatory sites. (in Japanese)	Bulletin of Medical Research Institute Tokyo Women's Medical University, 23 : 7-8, 2003
S. Morikawa et al. , Three dimensional imaging technique for blood vessels using a tomato lectin. (in Japanese)	Seitai no kagaku, 55 (3) : in press, 2004