

Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels

Antoine Louveau^{1,2}, Igor Smirnov^{1,2}, Timothy J. Keyes^{1,2}, Jacob D. Eccles^{3,4,5}, Sherin J. Rouhani^{3,4,6}, J. David Peske^{3,4,6}, Noel C. Derecki^{1,2}, David Castle⁷, James W. Mandell⁸, Kevin S. Lee^{1,2,9}, Tajie H. Harris^{1,2} & Jonathan Kipnis^{1,2,3}

One of the characteristics of the central nervous system is the lack of a classical lymphatic drainage system. Although it is now accepted that the central nervous system undergoes constant immune surveillance that takes place within the meningeal compartment^{1–3}, the mechanisms governing the entrance and exit of immune cells from the central nervous system remain poorly understood^{4–6}. In searching for T-cell gateways into and out of the meninges, we discovered functional lymphatic vessels lining the dural sinuses. These structures express all of the molecular hallmarks of lymphatic endothelial cells, are able to carry both fluid and immune cells from the cerebrospinal fluid, and are connected to the deep cervical lymph nodes. The unique location of these vessels may have impeded their discovery to date, thereby contributing to the long-held concept of the absence of lymphatic vasculature in the central nervous system. The discovery of the central nervous system lymphatic system may call for a reassessment of basic assumptions in neuroimmunology and sheds new light on the aetiology of neuroinflammatory and neurodegenerative diseases associated with immune system dysfunction.

日本語要約：中枢神経系の特徴の1つに、古典的なリンパ排水系の欠如がある。中枢神経系は常時、免疫による監視を受けており、それが行われているのは髄膜区画内であることは現在認められているが、免疫細胞の中枢神経系からの出入を支配している機序についてはほとんど分かっていない。T細胞の髄膜への出入に使われる通路を探索している際に、我々は硬膜静脈洞の内表面を覆っている、機能を備えたリンパ管を見いだした。この構造は、リンパ管内皮細胞の分子的特徴を全て発現しており、脳脊髄液から髄液と免疫細胞の両方を輸送可能で、深部にある頸部リンパ節に連結していた。これらのリンパ管は独特な位置を占めているためにこれまで発見されなかった可能性があり、このことが中枢神経系にはリンパ管構造が存在しないというずっと以前からの説の一因なのだろう。中枢神経系のリンパ管系が見つかったことで、神経免疫学における基本的な仮説の再評価が必要となるかもしれない。また、免疫系の機能障害と関連する神経炎症性疾患や神経変性疾患の病因解明に新しい見方を提供する可能性がある。

http://www.nature.com/nature/journal/v523/n7560/fp/nature14432_ja.html?lang=ja

CORRECTIONS & AMENDMENTS

CORRIGENDUM

doi:10.1038/nature16999

Corrigendum: Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels

Antoine Louveau, Igor Smirnov, Timothy J. Keyes, Jacob D. Eccles, Sherin J. Rouhani, J. David Peske, Noel C. Derecki, David Castle, James W. Mandell, Kevin S. Lee, Tajie H. Harris & Jonathan Kipnis

Nature 523, 337–341 (2015); doi:10.1038/nature14432

We would like to correct this Letter, which demonstrated the molecular characteristics and functional nature of lymphatics serving the central nervous system (CNS), by adding two reference citations, of which we became aware after publication. Foldi *et al.*¹ postulated a CNS–lymphatic link, although their findings described lymphatic vessels located at the base of the skull, which differs from the location of the vessels that we identified and functionally characterized. Andres *et al.*² presented incidental histological evidence of dural vessels in rats that, on the basis of ultrastructural features, appeared to be lymphatic. We also wish to clarify that the designation of these lymphatics as ‘CNS lymphatics’ in our Letter refers to their function of CNS/cerebrospinal fluid drainage.

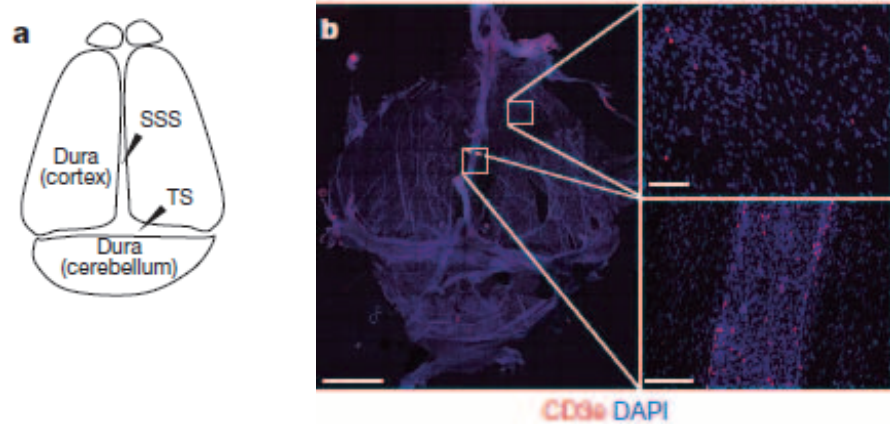
1. Foldi, M. *et al.* New contributions to the anatomical connections of the brain and the lymphatic system. *Acta Anat.* **64**, 498–505 (1966).
2. Andres, K. H., von Düring, M., Muszynski, K. & Schmidt, R. F. Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat. Embryol.* **175**, 289–301 (1987).

【Corrigendum】

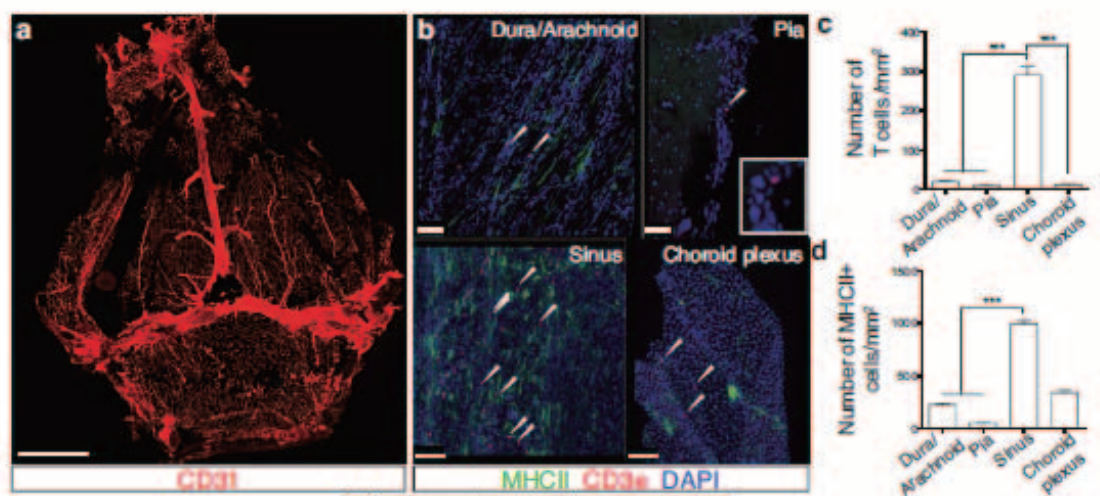
引用文献として、2本の論文を追加する。

1. Foldi らは CNS のリンパ網を主徴したが、頭蓋底に位置していると記載している点が、我々と異なる。
2. Andres らは、ラットでの実験で、硬膜静脈にリンパ管のように見える組織学的な痕跡を示している。

【Fig. 1a, b】

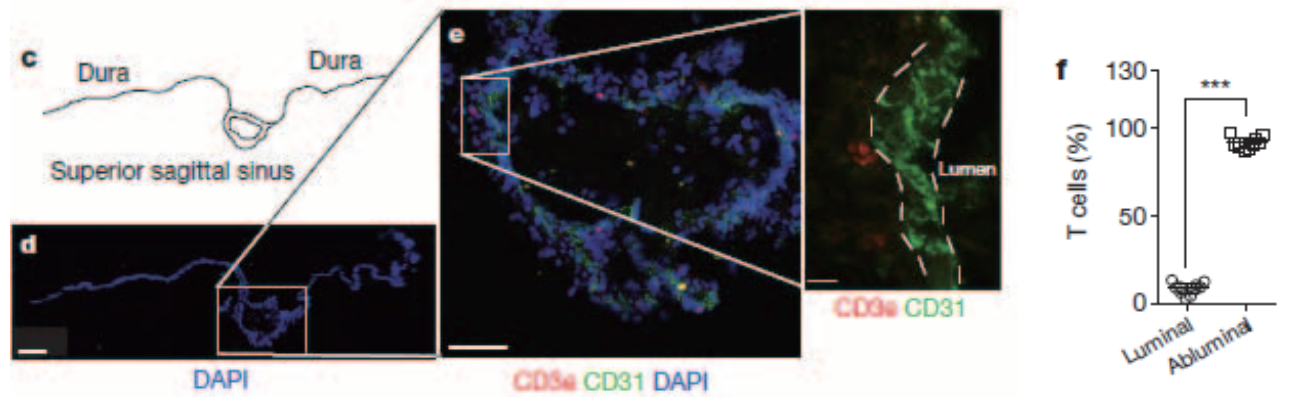


【Extended Fig. 1a-d】

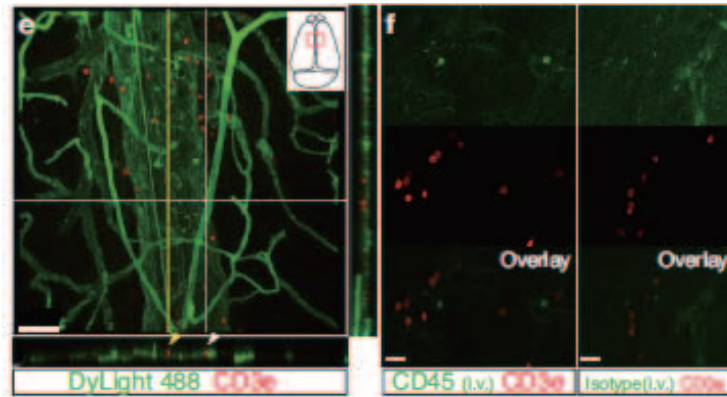


まず、マウス脳髄膜切片の全載標本を用い (Fig. 1a)、内皮細胞 (Extended Fig. 1a), T cell (Fig. 1b), Major histocompatibility complex II (MHCII) 発現細胞 (Extended Fig. 1b) の染色を行った。これらの細胞の標識により、髄膜区画のいたるところで免疫細胞が局限している部位があり、それが硬膜静脈洞に近接していることがわかった (Fig. 1b; Extended Fig. 1b-d)。

【Fig. 1c-f】



【Extended Fig. 1e,f】



DyLight488 は血管を染色
CD45 はリンパ球のマーカー
CD3e は T リンパ球のマーカー

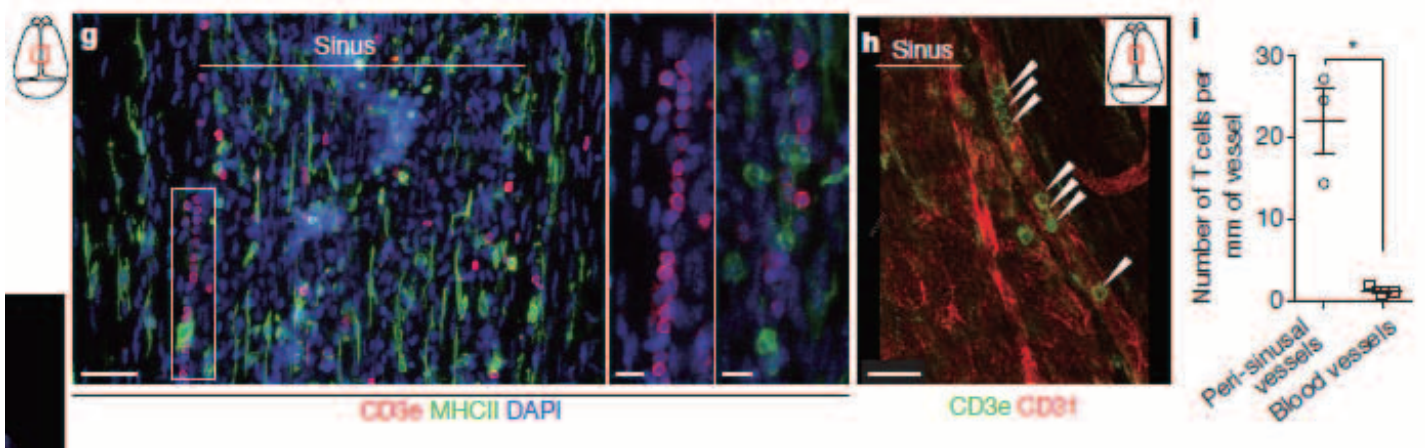
硬膜静脈洞は、脳内外の静脈から血液を内頸静脈に排出している。

(免疫細胞の検出が) 不完全な頭蓋内循環によるアーチファクトである可能性を除外するため、静脈洞付近の T 細胞の正確な局在を評価した。

硬膜の冠状断 (Fig. 1c, d) を T cell のマーカーである CD3e と内皮細胞のマーカーである CD31 で染色した。すると、静脈洞付近の T リンパ球の大部分は、反管腔側 (abluminal) にみられた (Fig. 1e)。

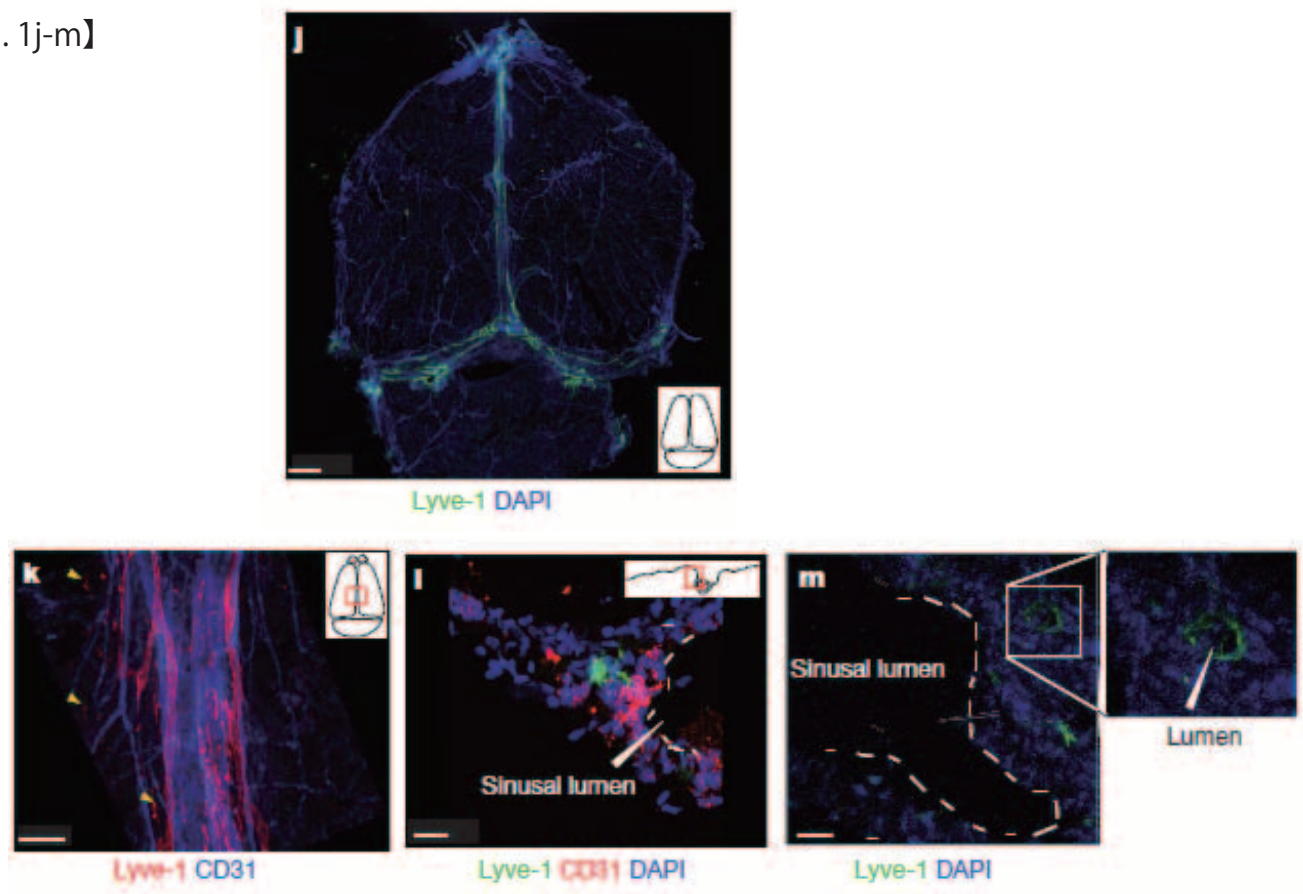
DyLight 488 や 蛍光抗 CD-45 抗体 (※リンパ球のマーカー) をマウス生前に静脈内に注入したところ、血中にあるこれらは CD3e と共局在せず、静脈洞付近の T リンパ球が反管腔側局在であることを確認した (Extended Fig. 1e,f, Fig. 1f)。

【Fig. 1g-i】

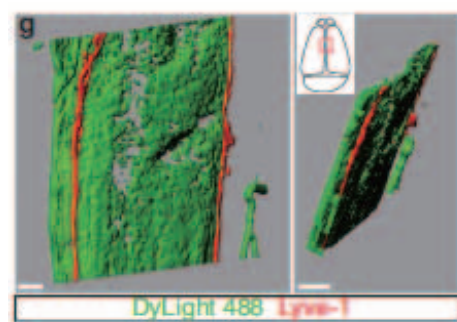


予想していなかったことに、T 細胞 (と MHCII 発現細胞) の一部は静脈洞に沿って、CD31 (※内皮細胞のマーカー) 発現細胞の中に直線状に存在しており、静脈洞周囲の脈管には特有の機能があることが示唆された (Fig. 1g-i)。

【Fig. 1j-m】



【Extended Fig. 1g】



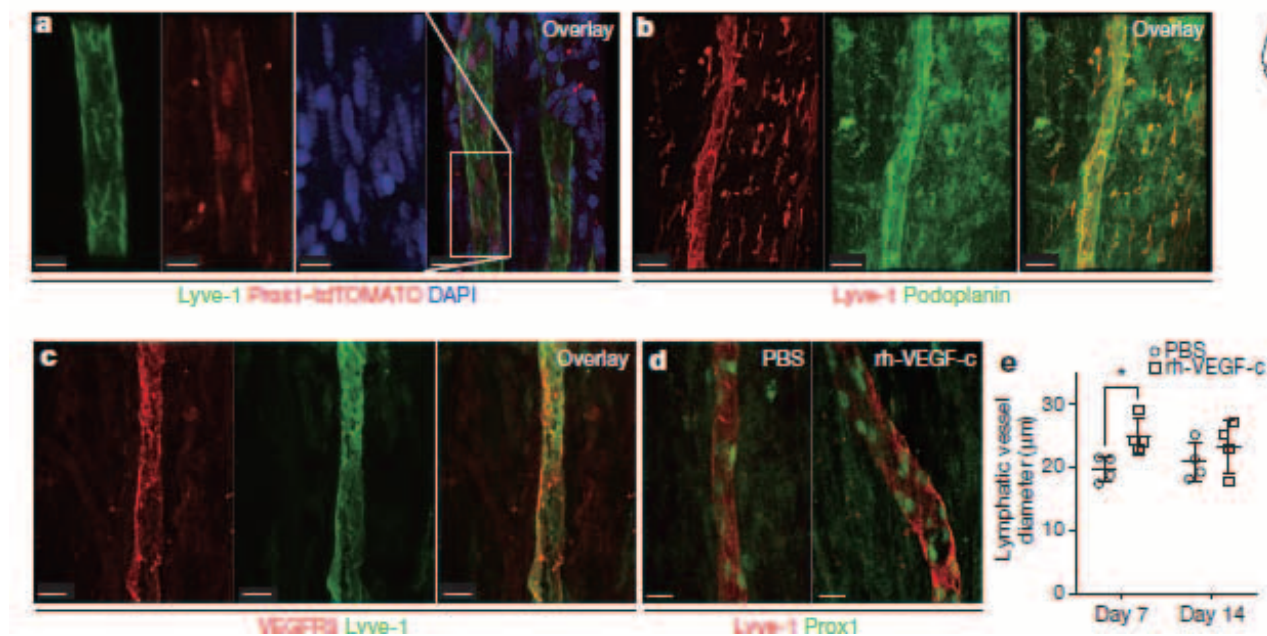
さらに、静脈洞周囲の脈管をリンパ内皮細胞 (lymphatic endothelial cells; LEC) に関連したマーカーで評価した。成体マウスの髄膜の全載標本を LEC のマーカー Lyve-1 で染色した。

硬膜静脈洞に平行に走行する、Lyve-1 を発現した脈管が 2-3 個見つかった (Fig. 1j,k)。

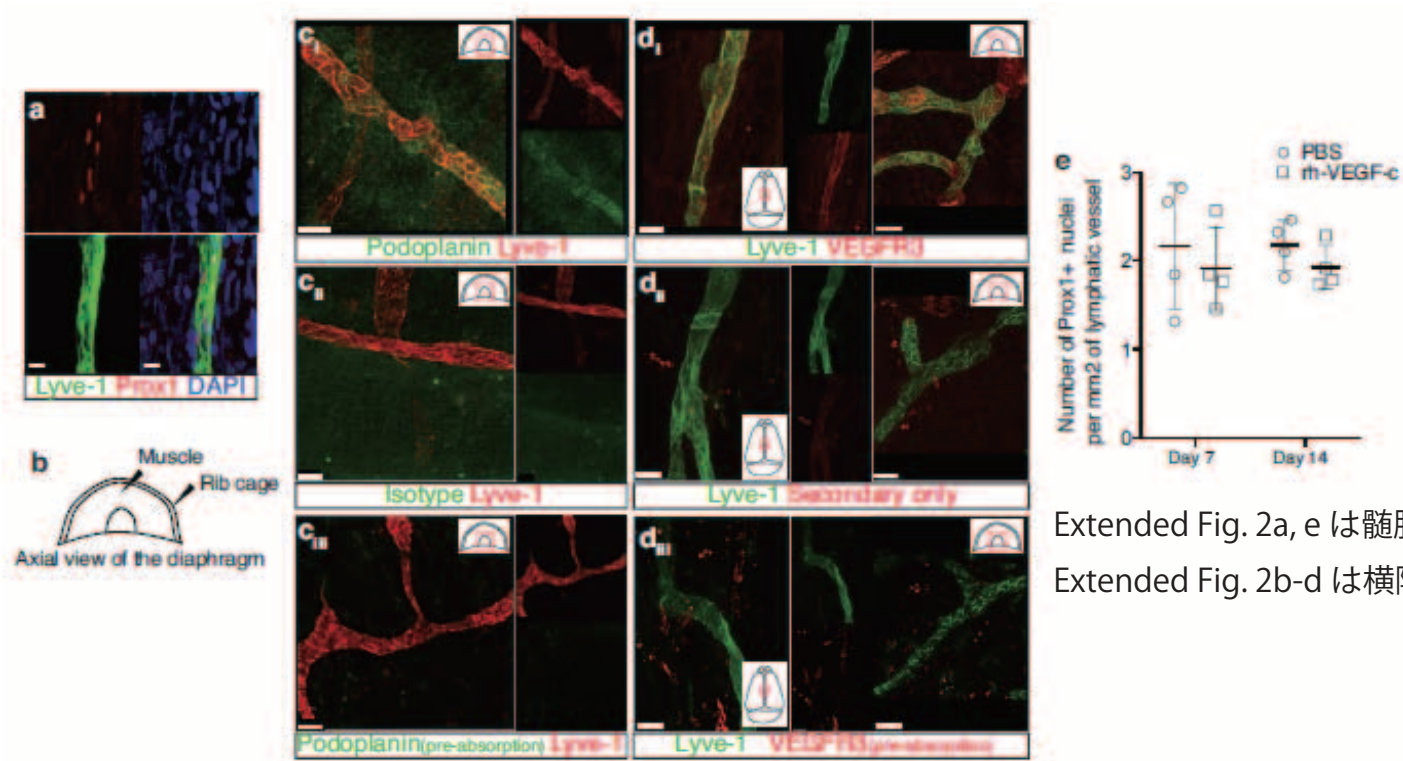
Lyve-1 と内皮細胞のマーカー CD31 で標識した冠状断の解析では、Lyve-1 の脈管は静脈洞に隣接し (Fig. 1l)、静脈洞とは全く別個の管腔であることを示していた (Fig. 1m)。

DyLight488 lectin をマウス生前に経静脈投与すると、lyve-1 陽性の脈管は、心循環系には属していないことが確認された (Extended Fig. 1g)。

【Fig. 2 a-e】



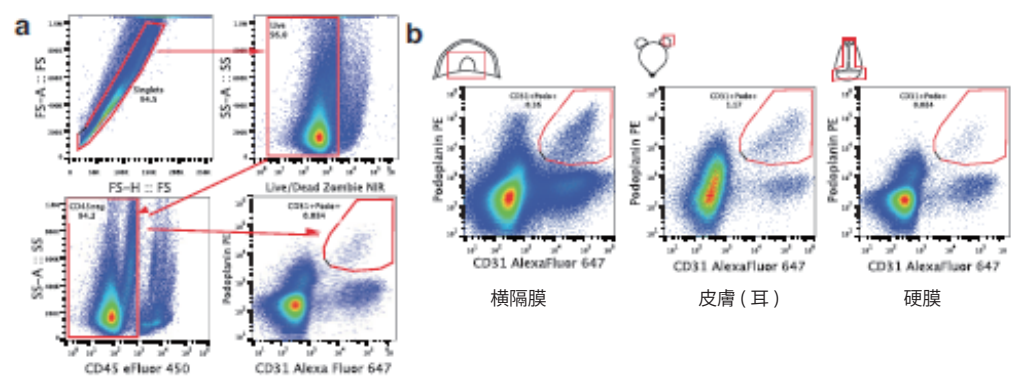
【Extended Fig. 2】



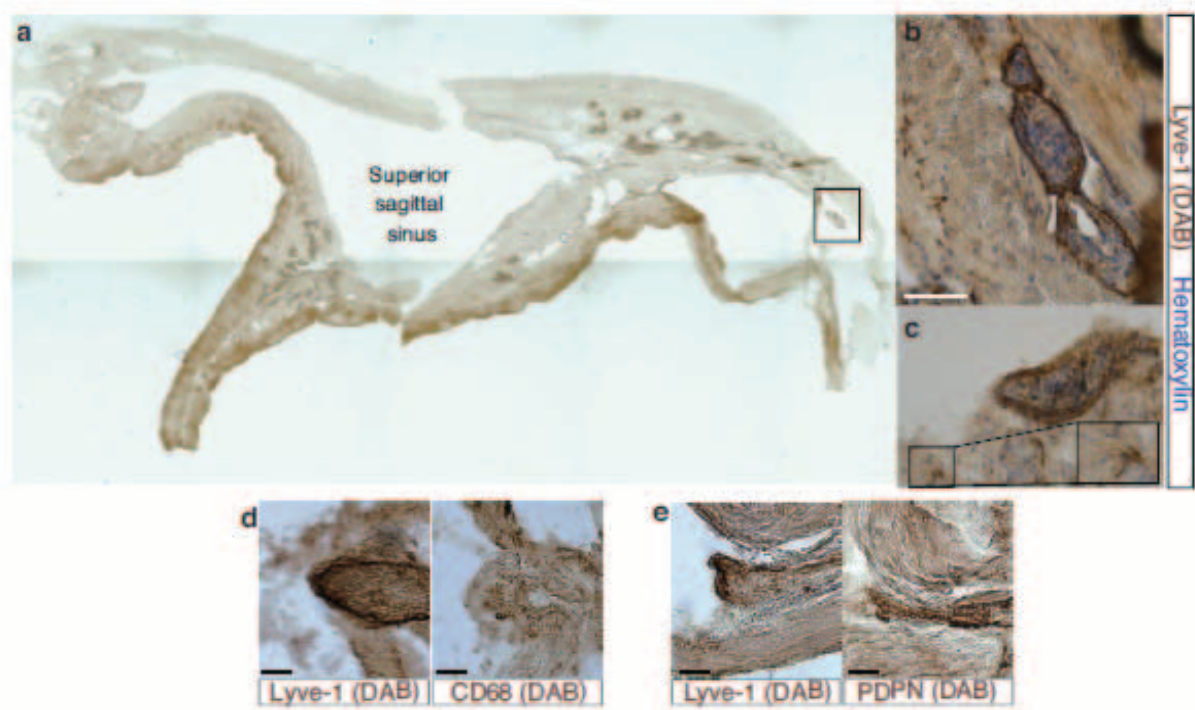
Extended Fig. 2a, e は髄膜
Extended Fig. 2b-d は横隔膜

静脈洞周囲の脈管のリンパ管的特徴を調べるため、幾つかの LEC マーカーで評価した。主要な LEC 発現因子である Prox1 は、野生型マウス (Extended Fig. 2a) でも、Prox1 プロモーター下に蛍光色素 tdTomato を発現させたマウス (Prox1^{tdT}) (Fig. 2a) でも、Lyve-1 陽性の脈管で検出可能だった。末梢組織のリンパ管のように、Lyve-1 を発現した脈管は podoplanin (Fig. 2b, Extended Fig. 2 b, c) と血管内皮細胞増殖因子受容体 3 (vascular endothelial growth factor receptor 3; VEGFR3) (Fig. 2c, Extended Fig. 2d) を発現していた。VEGFR3 特異的リコンビナント VEGF-c (※リンパ管を特異的に増殖させる因子) を大槽に注入すると、7 日後に髄膜リンパ管の径が増した (Fig. 2d, e, Extended Fig. 2e) ことは、VEGFR3 が髄膜 LEC において機能的役割を果たしていることを示唆している。

【Extended Fig. 3】

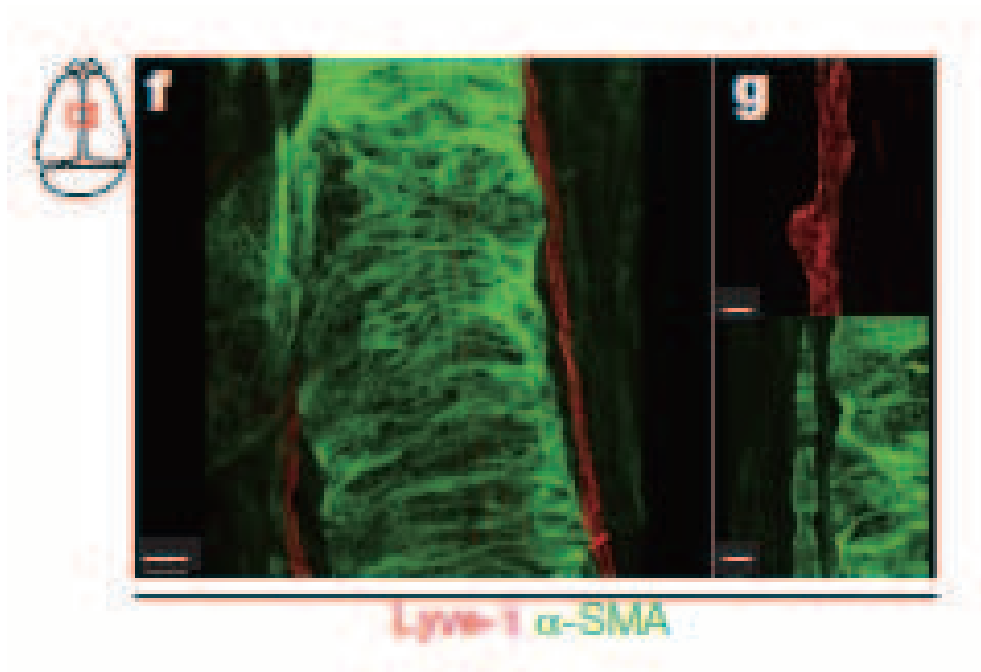


【Extended Fig. 4】

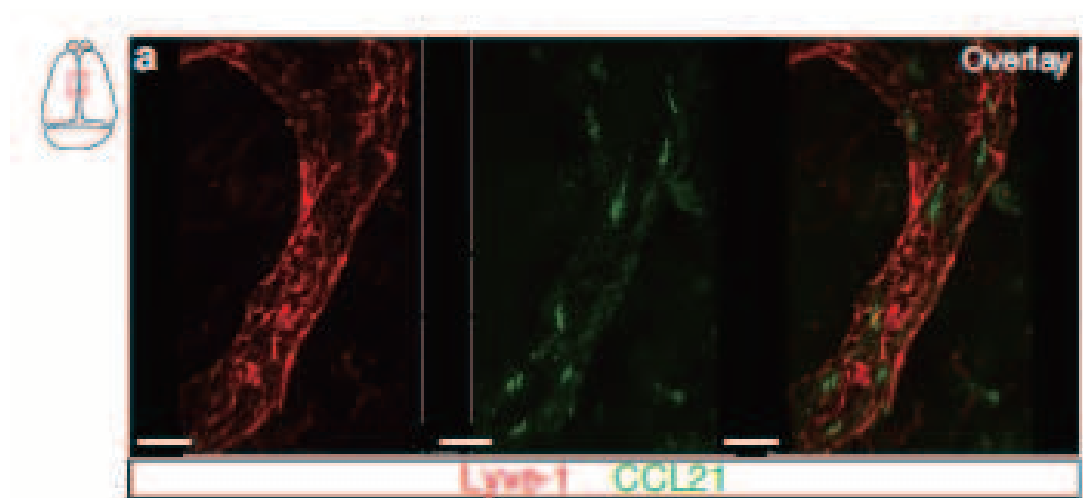


髄膜における LECs の存在を、フローサイトメトリーで評価した。
CD45-CD31+podoplanin+ 細胞群 (=LECs) は硬膜で検出され、皮膚や横隔膜でみられるものと似ていた (Extended Fig. 3)。
さらに、ヒトの硬膜でも Lyve-1+podoplanin+CD68- の似たような構造物を認めた (Extended Fig. 4) が、ヒトの中枢神経系での評価には更なる研究が必要である。

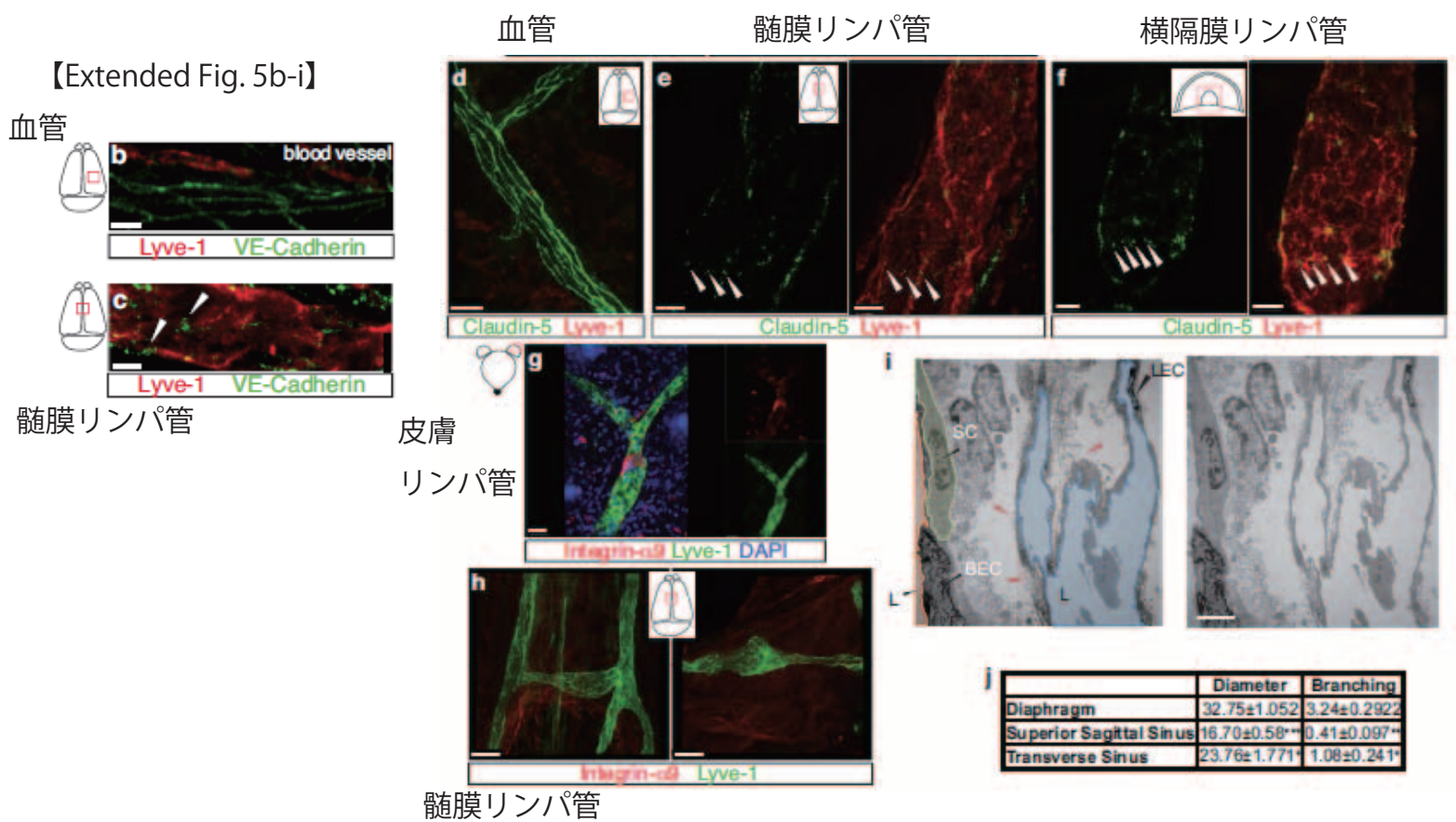
【Fig. 2f, g】



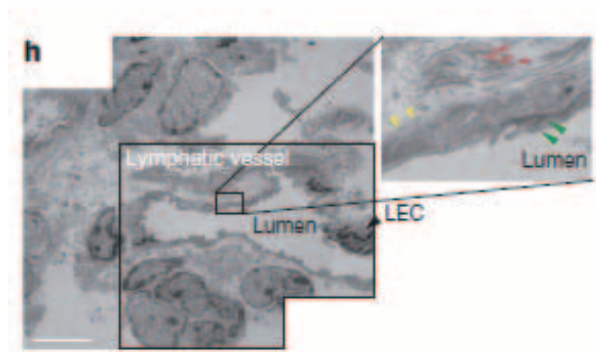
【Extended Fig. 5a】



輸入リンパ管 (afferent lymphatic vessel) には、毛細リンパ管 (initial lymphatic) と集合リンパ管 (collecting lymphatic) が存在する。これらは解剖学的に (周囲を囲む平滑筋や弁の有無)、及び接着分子の発現パターン、液体や細胞の流入への寛容さといった点で異なっている。静脈洞とは対照に、髄膜のリンパ管は平滑筋を欠いていた (Fig. 2f, g)。さらに、髄膜のリンパ管はケモカイン CCL21 (※T 細胞領域やリンパ管内皮で産生される) が陽性であった (Extended Fig. 5a)。



【Fig. 2h】



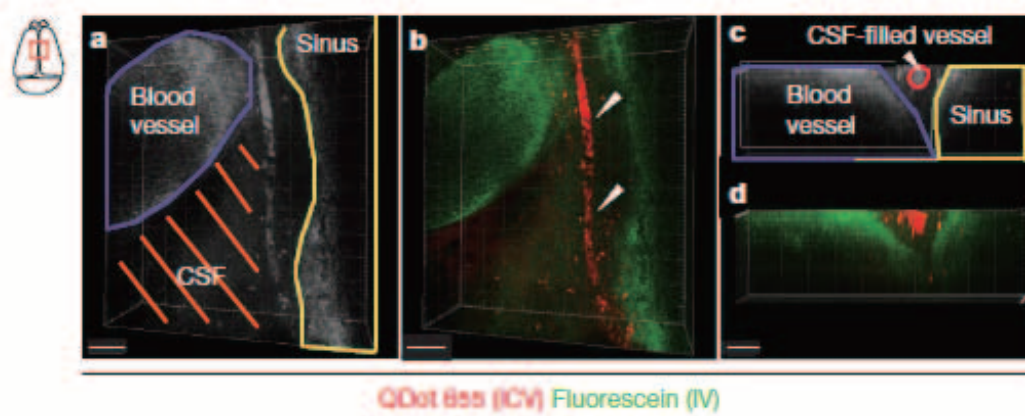
Claudin-5 やカドヘリンを連続して示している血管とは異なり、髄膜のリンパ管は横隔膜のリンパ管のようにこれらの分子を点状に発現している (Extended Fig. 5b-f)。

また、リンパ管の弁に特徴的であるような integrin- $\alpha 9$ の発現は髄膜のリンパ管ではみられないが、皮膚のリンパ網 (lymphatic network) では簡単に検出される (Extended Fig. 5g, h)。これらの知見を合わせると髄膜のリンパ管は、毛細リンパ管の解剖学的、分子的特徴を備えているといえる。

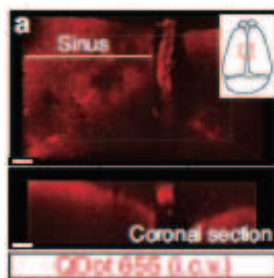
さらに、髄膜全載標本の電子顕微鏡による観察では、繫留フィラメント (anchoring filament) に囲まれた非連続的な基底膜というリンパ管の典型的な超微形態的特徴がみられた (Fig. 2h, Extended Fig. 5i)。

末梢リンパ管としての特徴を多く持ちながら、髄膜のリンパ管はいくつかのユニークな特徴を備えている。髄膜のリンパ管は眼から始まり、静脈洞近傍を直線的に走行する前に嗅球の上を通るようだ。横隔膜と比べると、髄膜のリンパ管は組織をあまりカバーせず、細い脈管から成る複雑なネットワークも作らない (Extended Fig. 5j)。上矢状洞よりも、横静脈洞の方がリンパ管はより広大で複雑である (Extended Fig. 5j)。これはリンパ管が存在する環境—中枢神経系では高い髄液圧にさらされていることが影響している可能性がある。

【Fig. 3a-d】



【Extended Fig. 6a】



次に、リンパ管がリンパ液や細胞を運ぶ能力を調べた。麻酔した成体マウスにフルオレセインの経静脈投与と蛍光トレーサー (ODot655) の経髄腔内投与を同時に行い、多光子顕微鏡で観察した。

リンパ管は、フルオレセインではなく ODot655 で満たされ、上矢状洞に沿ってみられた (Fig. 3a-d)。このことから、非心循環系が髄液を排出するようであることがわかった。

この髄液の髄膜リンパ管への排出は、髄液のくも膜顆粒を介した硬膜静脈洞への濾過に加えて起きているのかもしれない (Extended Fig. 6a)。

b Sinus

c Sinus

c_i

c_{ii}

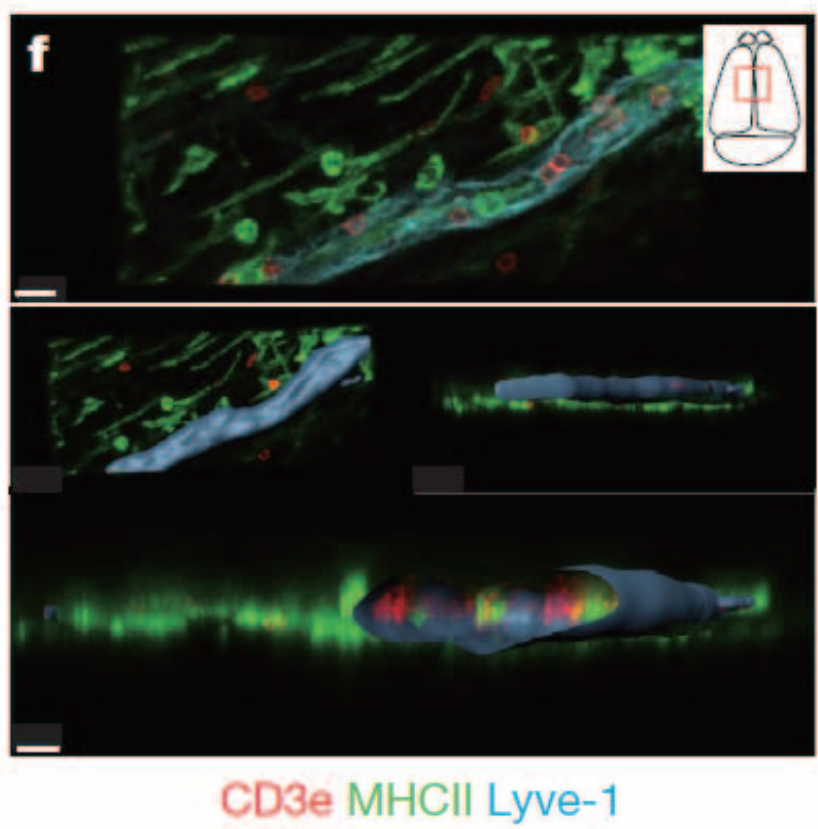
CD31 Alexa488 Lyve-1 (i.c.v.)

QDot 655 (l.v.) Alexa488 Lyve-1 (i.c.v.) Skull Signal

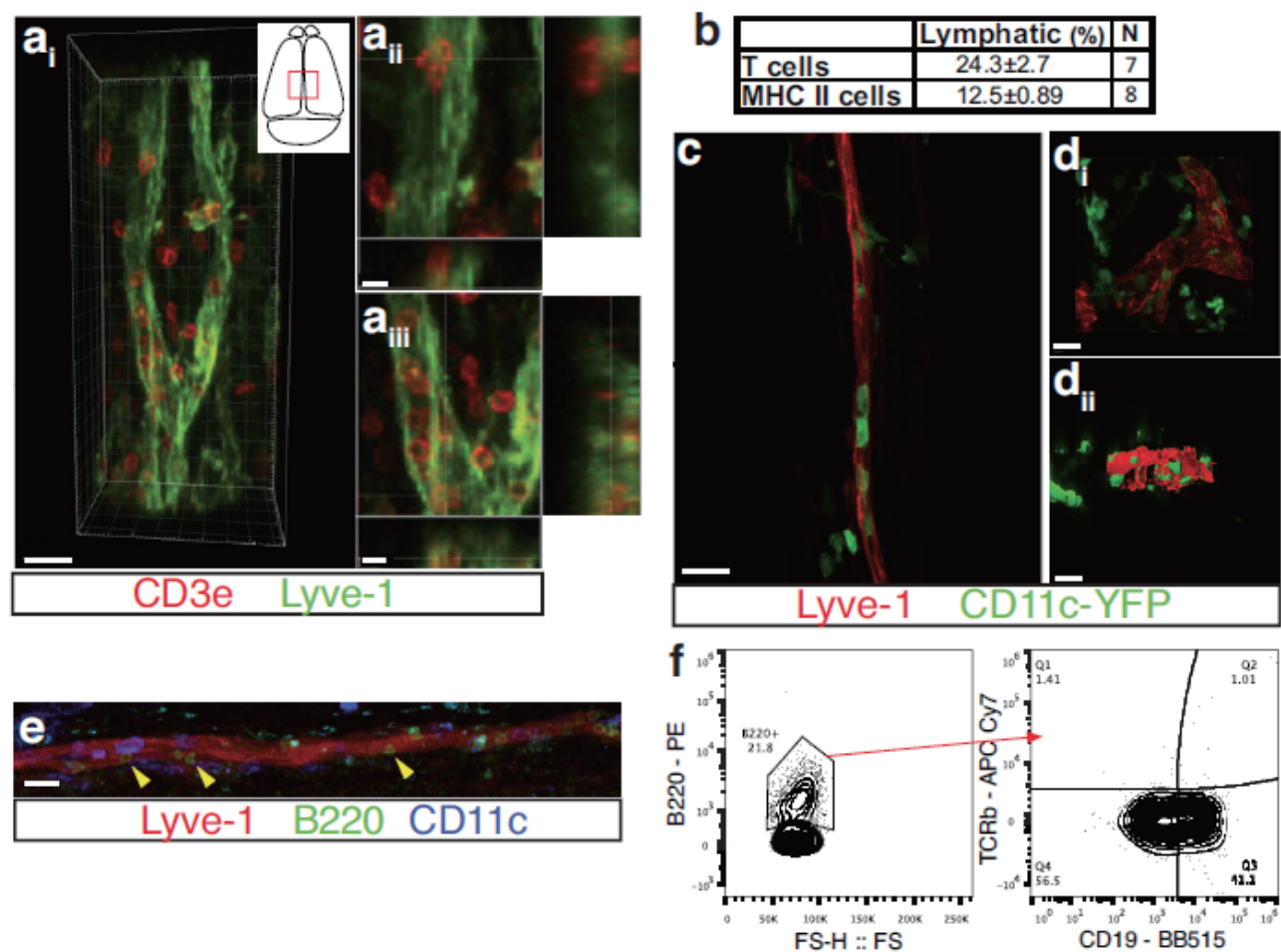
QDot 655 Anti-Lyve-1 Alexa 488

さらに、QDot655 と Alexa488 結合抗 Lyve-1 抗体をとともに髄腔内投与すると、髄膜リンパ管は QDot655 で満たされた (Fig. 3e)。これは、QDot655 が髄膜リンパ管から排出されていることを示していた。QDot655 で満たされたリンパ管の映像は、隣接した血管と比べると、流れが遅く髄膜リンパ管と流れる方向が似ており、これは中枢神経以外で観察される所見と類似していた。

【Fig. 3f】

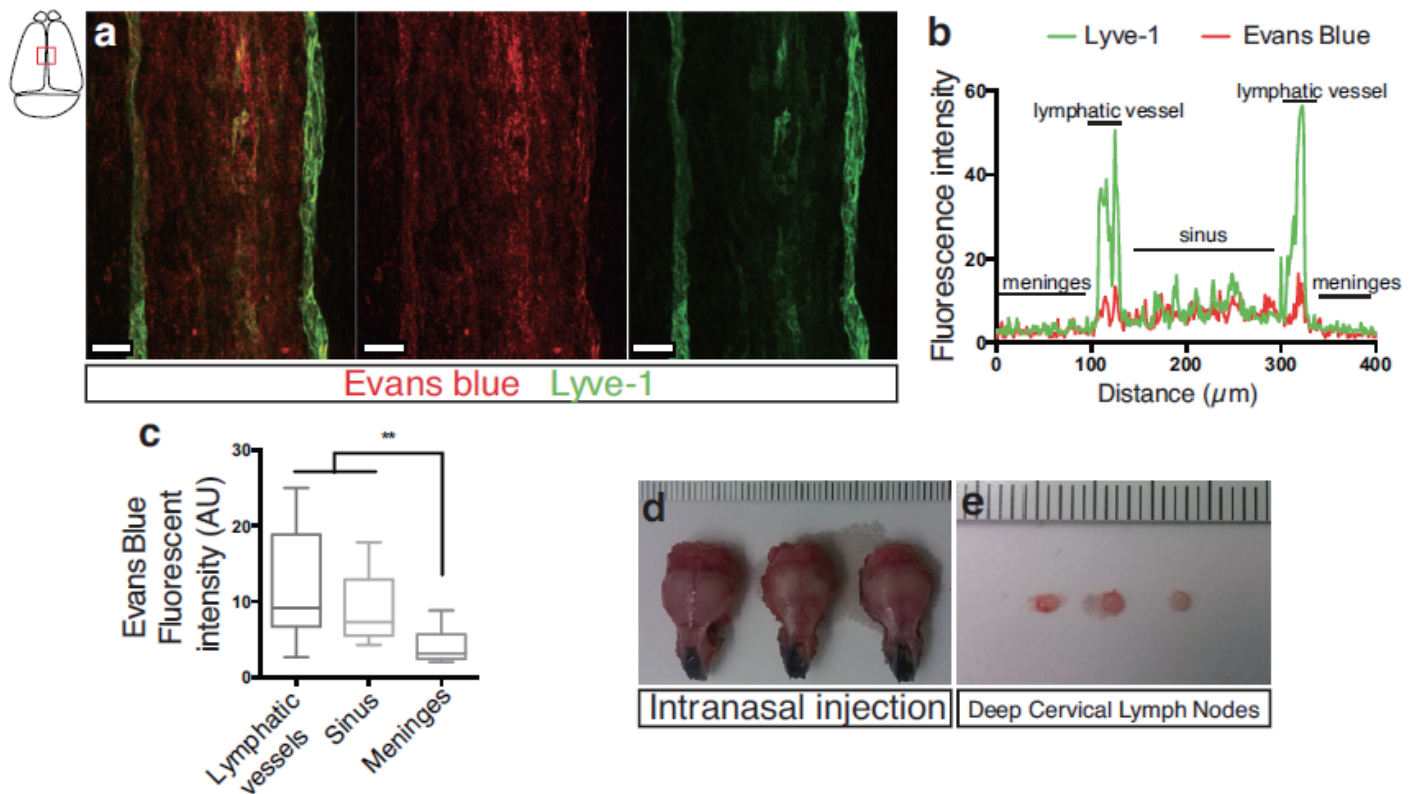


【Extended Fig. 7】

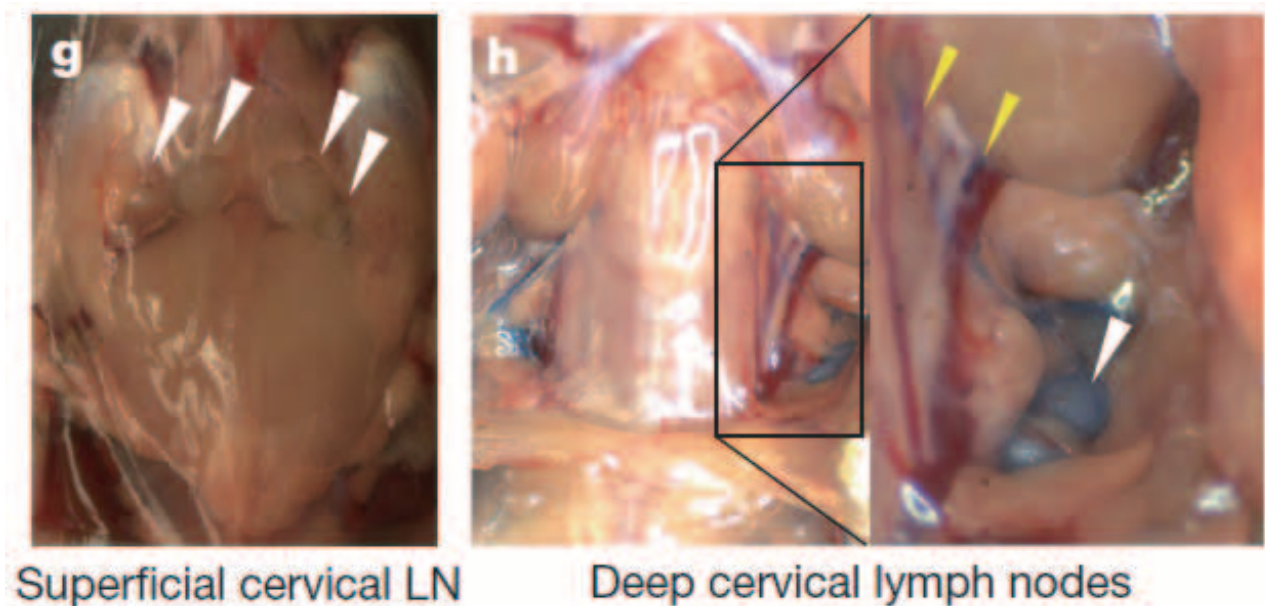


古典的なリンパ管は、細胞を組織からリンパ節へ運ぶ。それゆえ、髄膜リンパ管に白血球を運ぶ能力があるかを調べた。髄膜全載標本の免疫組織学的検討では、全静脈洞 T 細胞の約 24%、全静脈洞 MHCII 陽性細胞の約 12% がリンパ管内で見つかった (Fig. 3f, Extended Fig. 7a, b)。さらに、CD11c 陽性と B220 陽性細胞も未処置マウス (naive mice) の髄膜リンパ管で見つかった (Extended Fig. 7c-f)。

【Extended Fig. 8】

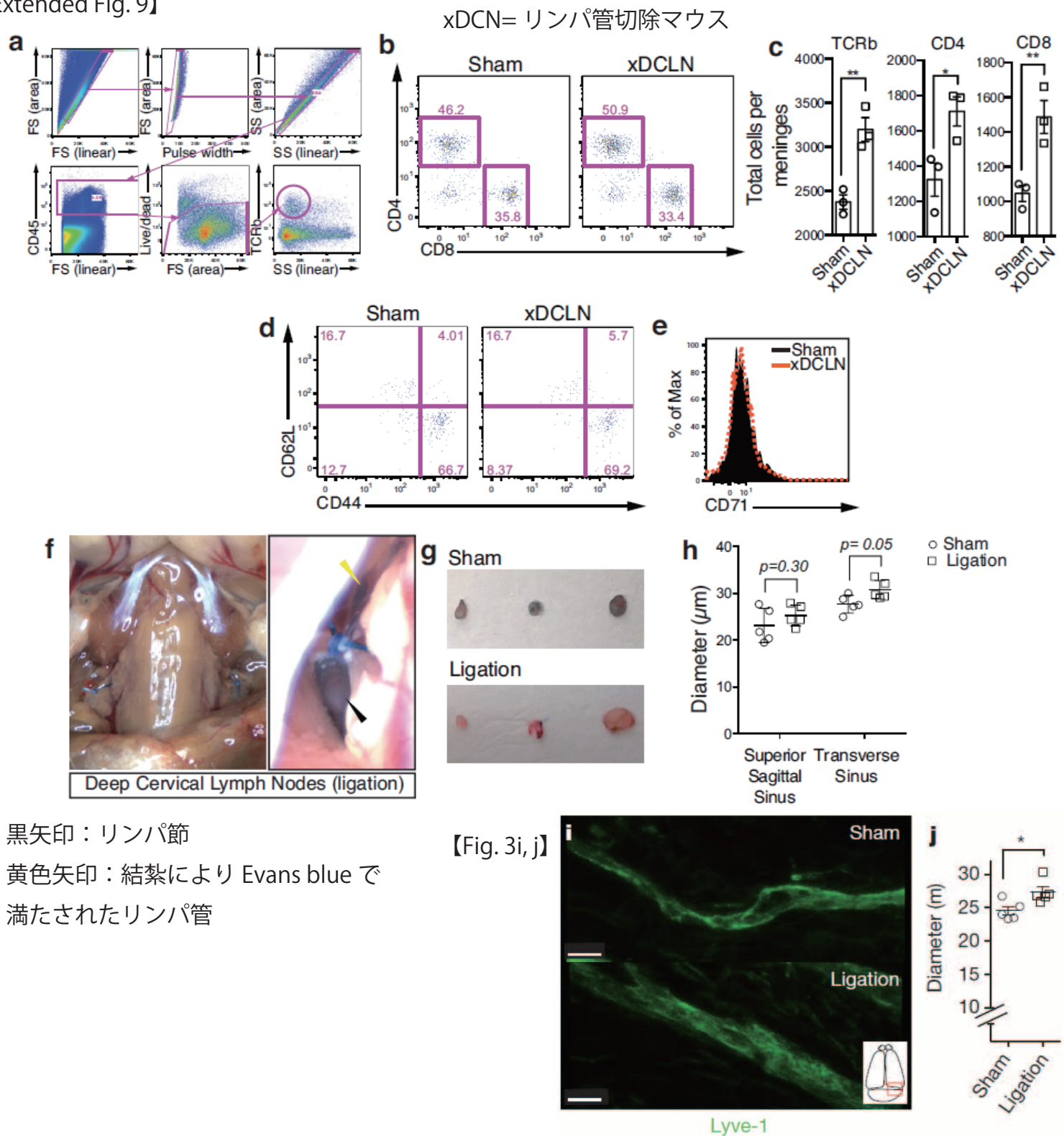


【Fig. 3g, h】



髄液の細胞性あるいは可溶性構成成分は、頸部リンパ節で免疫応答を引き起こす。想定されているのは篩板から鼻粘膜内のリンパ管に入るというものだ。髄膜リンパ管が深頸部リンパ節と直接交通しているか確認するため、マウスに色素 Evans blue を髄腔内投与し、色素が末梢リンパ節に存在するか 2 時間以上に渡り調べた (Extended Fig. 8a-c)。注入 30 分後、Evans blue は髄膜リンパ管と静脈洞で検出され (Extended Fig. 8a-c)、深頸部リンパ節に排出された (Fig. 3g, h) が、表在リンパ節では確認されなかった (data not shown)。調べた time point では、Evans blue はリンパ節を囲む非リンパ組織でほとんど検出されなかった。興味深いことに、鼻粘膜に直接注入した 30 分後、深頸部リンパ節では Evans blue は検出されなかった (Extended Fig. 8d, e)。このことから、髄膜リンパ管は髄液由来の可溶性及び細胞性構成成分を深頸部リンパ節に排出する主要なルートだが、鼻粘膜リンパ管はそうではないことがわかった。

【Extended Fig. 9】



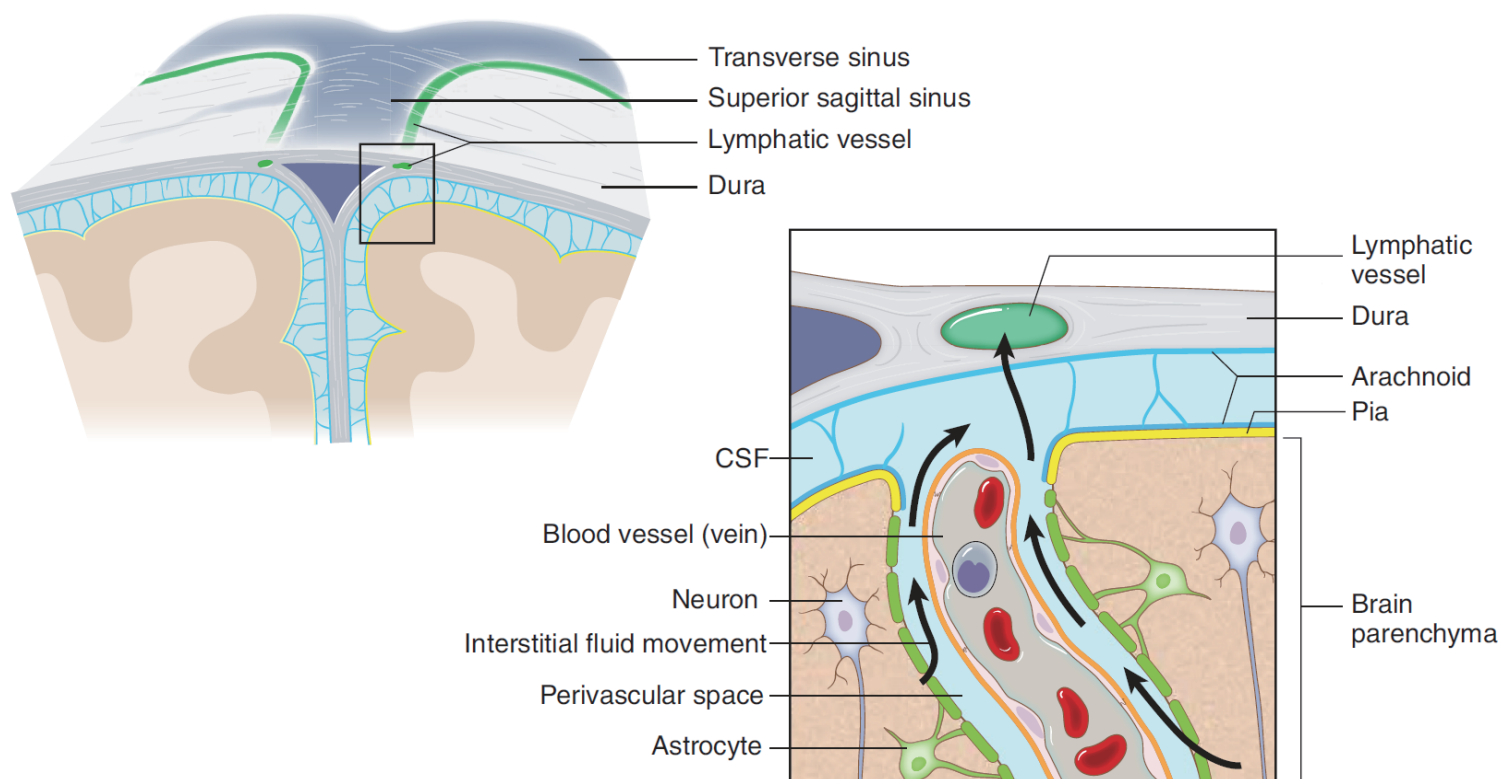
黒矢印：リンパ節

黄色矢印：結紮により Evans blue で
満たされたリンパ管

【Fig. 3i, j】

深頸部リンパ節の切除は、髄膜 T 細胞の構成に影響し、結果として髄膜 T 細胞は増加する (Extended Fig. 9a-e)。これはおそらく T 細胞が髄腔から排出されないためで、髄膜と深頸部リンパ節が直接交通していることと合致している。この交通をさらに調べるため、深頸部リンパ節に流出するリンパ管を結紮し (Extended Fig. 9f)、Evans blue を髄腔内に投与した。Evans blue は結紮されたマウスの深頸部リンパ節ではみられず、コントロール群では検出された (Extended Fig. 9g)。さらに、末梢でのリンパ浮腫に似て、髄膜リンパ管の径が増していた (Fig. 3i, j, Extended Fig. 9h)。これらの結果は、髄膜リンパ管と深頸部リンパ節の物理的な交通を示唆している。

【Extended Fig. 10】



これまで、どうやって髄液が排出されているかよくわかっていなかった。

今回見つかった髄膜リンパ管は髄液が排出される新たな経路であり、
中枢神経系から免疫細胞が出て行く、より一般的な経路である。

今回の知見は、最近見つかった“glymphatic system (中枢神経系の老廃物を排出するシステム)”
を介した髄液への排出の後、脳実質から末梢に間質液を排出する第二段階をみているのかもしれない
(Extended Fig. 10)。

中枢神経系のリンパ管系が見つかったことで、神経免疫学における基本的な仮説の再評価が必要と
なるかもしれない。また、免疫系の機能障害と関連する神経炎症性疾患や神経変性疾患の病因解明に
新しい見方を提供する可能性がある。

【まとめ】

- ①頭蓋内にリンパ管が見つかった
- ②部位としては硬膜静脈洞に隣接していた
- ③このリンパ管は、免疫細胞や髄液を運んでいる
- ④鼻粘膜のリンパ管と異なり、深頸部リンパ節と交通しているようだ