

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15891

研究課題名（和文）ラット腸間膜リンパ管を用いた五苓散の浮腫改善機序の解明

研究課題名（英文）Effect of goreisan on rat mesenteric lymphatic vessels.

研究代表者

条 美智子（Jo, Michiko）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：80432110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：リンパ浮腫治療方法の構築およびその作用機序の解明を目的としている。五苓散のラット腸間膜リンパ管の収縮に対する効果は認められなかったが、沢瀉には30mg/mlの濃度で収縮速度を有意に低下させた。五苓散と沢瀉のProx1、LYVE-1 mRNA発現量はコントロールに比べ、減少傾向を示した。さらに、VEGFR3、VEGFR2、VE-cadherin、Prox1抗体を用いてタンパク質発現量を測定したところ、五苓散はコントロールに比べて増加したが、有意な差は認められなかった。五苓散と沢瀉のラット腸間膜リンパ管収縮速度を低下はリンパ管形成やリンパ管新生には関与せず、リンパ管の機能不全が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内のリンパ管研究を進めることで、現在治療薬のないリンパ浮腫の治療や疾患発症前に予防策を講じる先制医療や診断薬の開発に応用できる。また女性に頻発する浮腫や妊娠時に起こる浮腫についても、リンパ管機能を解析し漢方薬の有効性を検証することでQOLの改善や代替医療への支援にも貢献できる。また、研究技術を国内に広く発信することで、次世代の若手研究者の育成に寄与することができる。さらに、臨床で用いられている漢方方剤を実験に用いることで、その効果機序に関する科学的な裏づけを示すことは重要な課題であるため、本研究は将来的に漢方方剤の新たなリンパ浮腫治療方法の構築を目指す。

研究成果の概要（英文）：Kampo medicines are traditional herbal formulas used to treat and prevent various diseases. The Kampo medicine Goreisan is a traditional herbal formulas known diuretic and is currently being tested in the clinic to reduce symptoms of surgically induced lymphedema in OB/GYN patients in Japan. The present study was aimed to clarify how Goreisan and its five different components affect lymphatic pump function and barrier function. Goreisan does not directly affect lymphatic pumping or barrier function, although at its component Alismatis Rhizoma can influence pump activity and Polyporus can enhance barrier function. By extension, in the lymphedema patients treated with Goreisan, its pharmacological action is more likely to be on renal mechanism to reduce excess body fluids. Additional work is needed to determine whether Goreisan may have direct effect to rescue impaired lymphatic vessel functions under inflammatory conditions.

研究分野：薬理学

キーワード：漢方方剤 リンパ管 内皮細胞 浮腫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫には、一次性リンパ浮腫(先天性あるいは原因不明)、二次性リンパ浮腫(リンパ節の切除など明らかな原因がある)があり、臨床例のほとんどは二次性リンパ浮腫であり、特に乳癌や子宮癌などの術後合併症として発症することが多い。本邦のリンパ浮腫患者は15万人と推定されており、浮腫により日常生活に支障を来すだけでなく外見変化に起因するうつ状態発症や細菌感染合併の危険性増大が指摘されている。また、リンパ浮腫については、モデル動物の開発は行われているものの有効な治療方法は見出されていない。近年、リンパ浮腫治療薬として HGF 遺伝子治療薬が臨床試験中であったが、主要評価項目である浮腫の体積に大きな減少は認められなかったため中止された。そのため新たな治療方法を確立することは極めて重要である。

2. 研究の目的

リンパ浮腫とは、リンパ輸送システムの機能不全によって間質腔にリンパが蓄積した状態である。その治療方法として、リンパドレナージ、薬物療法、外科治療と様々な対症療法が用いられているが有効性が明らかではない。また、長期的な治療を行うリンパ浮腫では利尿薬は根治療法ではなく、さらに電解質異常や線維化促進の恐れのあることから長期間使うことは非常に危険である。そこで体内の水分代謝調節作用を持ち、生体の恒常性の維持に有意に作用する漢方方剤が治療薬となる可能性がある。現在までに様々な漢方方剤を用いたリンパ浮腫に対する症例報告が複数存在するが、作用機序や効果は明らかではない。我々はこれまでに五苓散の腎障害進展抑制作用、尿浸透圧維持作用を主とした浮腫に対する効果および作用機序を明らかにしてきた。本研究ではラット腸間膜およびそのリンパ管を用いることにより、それらの形態学的検討や分子生物学的解析を行い、五苓散の新たなリンパ浮腫治療方法の構築およびその作用機序の解明を目的としている。

3. 研究の方法

ラット腸間膜および単離したリンパ管に五苓散および構成生薬エキスを投与し、リンパ管における AQP1、血管新生に関与するタンパク質発現量を評価するとともに、ラットに五苓散および生薬エキスを経口投与した後のラット腸間膜および単離したリンパ管の AQP1 と血管新生およびリンパ管形成に関わるタンパク質発現量および mRNA 発現量を解析する。

(1) 五苓散およびその構成生薬の凍結乾燥エキス作製

五苓散エキスは、構成生薬(沢瀉・茯苓・白朮・猪苓・桂皮)を各 20g に水道水 500mL を加え、煎じ器「ニューマイコン漢方煎じ器文火楽々」(EK-SA10 型, 350W)にて火力中で 50 分間煎じを用いた。得られた煎液は二枚重ねたガーゼにて濾過し凍結真空乾燥法によりエキスを作製する。生薬エキスについても同様に行った。

(2) ラット腸管膜および単離したリンパ管の分子生物学的解析

250g の SD ラットを麻酔下で開腹、盲腸近傍から結腸近傍を切離後、腸管からリンパ管を含む脂肪組織を切り取りディッシュに移す。その後、腸間膜リンパ管を単離し、vessel chamber に移し、五苓散および生薬エキスをディッシュに投与し、腸間膜リンパ管収縮効果を測定した。また、単離した腸間膜リンパ管を AQP1 抗体、VEGFR-3、VEGFR-C 抗体を用いウエスタンブロット法によりタンパク質発現量を定量する。さらに mRNA 発現量を測定した。またタンパク質局在性を解明するために、腸間膜リンパ管を顕微鏡下で vessel chamber に付属したガラスピペットに挿入し、AQP1 抗体、VEGFR-3、VEGFR-C 抗体、LYVE-1 抗体および CD31 抗体を用いリンパ管の免疫染色を行った。

(3) ヒト静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた五苓散およびその構成生薬の細胞間接着の解析

ヒト静脈内皮細胞(HUVEC)を用い五苓散およびその構成生薬を投与し、Electric Cell-substrate Impedance Sensing(ECIS)を用いて内皮細胞間のバリア機能の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 漢方方剤である五苓散とその構成生薬である沢瀉、猪苓、白朮、茯苓、桂皮を煎じた。得られた煎液は二重に重ねたガーゼにて濾過し、その後凍結乾燥法により凍結乾燥エキスを得た、サンプルとして調整した。

(2) 200g の SD ラットを麻酔下で開腹、盲腸近傍から結腸近傍を切離し、顕微鏡下で腸間膜リンパ管を単離した。単離した腸管膜リンパ管を vessel chamber に付属したガラスピペットに挿入し、作製した五苓散とその構成生薬の各凍結乾燥エキスを 1~30ug/ml の濃度の範囲で chamber 内に投与した。顕微鏡に付属した CCD カメラから得られた画像を解析ソフトにより腸管膜リンパ管の収縮期および拡張期の直径、収縮速度および頻度を測定・解析をした。五苓散およびその構成生薬である茯苓には、ラット腸間膜リンパ管の収縮に対する効果は認められなかった。また

桂枝および猪苓については、1 分間のリンパ管収縮頻度は濃度依存的に低下したが有意な変化は認められなかった。しかし、沢瀉については、30 μ g/ml の濃度でラット腸間膜リンパ管収縮速度を有意に低下させた。

(3) 五苓散とその構成生薬である沢瀉を 2g/kg を SD ラットに 1 週間経口投与した。最終日は藤よ 1 時間後に麻酔下で開腹、盲腸近傍から結腸近傍を切離し、顕微鏡下で腸間膜リンパ管を単離した。単離した腸管膜リンパ管を chamber に付属したガラスピペットに挿入し、AQP1、VE-cadherin、 α SMA タンパク質を用いてリンパ管の免疫組織化学染色を行なった。AQP1 タンパク質は発現していないまたは発現量が低く確認できなかったが、VE-cadherin、 α SMA はリンパ管壁に発現していることを確認した。また単離したリンパ管を用い、PCR 法により水チャネルである AQP1、リンパ管形成に関与する Prox1、リンパ球の接着・遊走に関与する LYVE-1 の mRNA の発現量を解析した。また、リンパ管新生に関わる VEGFR3 および VEGFC についても検討を行った。AQP1 mRNA 発現量は低く解析ができなかったが、五苓散と沢瀉の Prox1、LYVE-1 発現量はコントロールに比べ、減少傾向を示した。VEGFR3 および VEGFC の mRNA 発現量については、五苓散はコントロールに比べて低下したが、有意な差は認められなかった。さらに、VEGFR3、VEGFR3、VE-cadherin、Prox1 抗体を用いウエスタンブロット法でタンパク質発現量を測定した。五苓散の VEGFR3、VEGFR3、VE-cadherin、Prox1 のタンパク質発現量はコントロールに比べて増加したが、有意な差は認められなかった。以上の結果より、五苓散と沢瀉のラット腸間膜リンパ管収縮速度を低下はリンパ管形成やリンパ管新生には関与しないため、リンパ管の機能不全が考えられる。

(4) HUVEC を用い五苓散およびその構成生薬を投与し、ECIS を用いて内皮細胞間の接着(バリア機能)機能の検討を行った。ECIS は、細胞間の膜電位を測定することにより細胞間の接着能、密着性、結合形成能の指標となる。HUVEC に各種濃度の五苓散およびその構成生薬を投与し、経時的に細胞間の膜電位を測定した。五苓散には有意な変化は認められなかったが、猪苓は低濃度ではコントロールと比べて細胞間の膜電位が上昇し、細胞間の接着が増強したことが分かった。次に、細胞増殖抑制やアポトーシス誘導 IL1b を HUVEC に投与後、各種濃度の五苓散およびその構成生薬を投与し、膜電位の低下を回復させるのかを検討した。五苓散には有意な変化はみとめられなかったが、白朮は膜電位低下を回復させることが確認できた。リンパ浮腫に用いられる五苓散の浮腫改善作用はリンパ管収縮運動や内皮細胞間の接着には影響を与えず、腎機能を介して浮腫を改善する可能性が示唆された。今後は炎症状態のラットおよび腸間膜リンパ管を用いて検討を行う。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Michiko Jo, Andrea N. Trujillo, Naotoshi Shibahara, Jerome W. Breslin
2 . 発表標題 Evaluation of the impact of the traditional medicine formulation Goreisan and its components on mesenteric lymphatic vessel contraction and lymphatic endothelial barrier function.
3 . 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----