

機関番号：10107  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390328  
 研究課題名（和文） リンパ浮腫次世代治療法  
 —リンパ管新生遺伝子治療と外科治療のハイブリッド治療法  
 研究課題名（英文） Therapeutic Lymphangiogenesis for Lymphedema by Gene Therapy of  
 Hepatocyte Growth Factor Plasmid DNA.  
 研究代表者  
 笹嶋 唯博（SASAJIMA TADAHIRO）  
 旭川医科大学・医学部・副学長  
 研究者番号：20109515

研究成果の概要（和文）：リンパ浮腫は有効な根治治療法がなく次世代治療法が望まれる。本研究では肝細胞増殖因子(HGF)のリンパ管新生作用を証明しリンパ浮腫への遺伝子治療効果を検討した。リンパ管内皮細胞にはHGF受容体が発現しHGF刺激で、ERKおよびAktの活性化を伴う増殖能、遊走能の増加が認められた。さらにラットリンパ浮腫モデルでHGF遺伝子治療効果が得られた。HGFがリンパ浮腫の次世代治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Treatment for lymphedema remains limited and largely ineffective. The goal of the present study was to investigate the therapeutic efficacy of hepatocyte growth factor (HGF) in animal models of lymphedema. Immunofluorescent analysis of lymphatic endothelial cell (LEC) was positive for lymphatic specific markers and the HGF receptor. The treatment of LEC with human recombinant HGF resulted in a dose-dependent increase in cell growth and migration. Weekly HGF gene transfer in a rat tail lymphedema model by disruption of lymphatic vessels resulted in a decrease in thickness of lymphedema. Furthermore, HGF plasmid DNA was transferred into an axillary lymph node-excised rat model. The volume of lymphedema was significantly decreased in the HGF group. Serial lymphangiography by PDE system revealed progressive extension of neo-lymphvascularization in HGF-treated animals. These data demonstrate that expression of HGF via plasmid transfer improves lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. Further study to determine the clinical utility of this approach would be of benefit to patients with lymphedema.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野： 血管外科

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：リンパ浮腫、リンパ管新生、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫はリンパ管の原因不明な低形成・無形成による原発性リンパ浮腫と寄生虫感染、外科手術や放射線治療などによる二次性リンパ浮腫に分けられる。いずれもリンパ流障害により患肢に高度の腫脹を惹起し、患者の Quality of Life を著しく障害する難治性疾患である。この疾患に対し根治的治療法の開発が過去 1 世紀以上にわたり試みられているが、残念ながらその解決には至っていない。

1980 年代以降の血管新生に関する分子生物学の発展に伴い、その副産物としてリンパ管新生の新たな知見が報告されるようになってきた。例えば vascular endothelial growth factor (VEGF)-C や fibroblast growth factor (FGF)-2、Angiopoietin (Ang)-1 などリンパ管新生作用が見いだされた。さらにインドシアニンググリーンを用いた赤外光によるリンパ管撮影法はリンパ管研究の画像評価を後押しした<sup>7)</sup>。

これらの状況を踏まえ我々はリンパ浮腫の根治的治療法を開発するために遺伝子治療に着目した。また治療用分子として本邦で施行された血管新生療法開発でヒトに応用された実績のある肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) を用いることとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は HGF によるリンパ管新生作用を細胞レベルで証明し、さらに小動物モデルを使用し HGF 遺伝子治療の効果を確かめることである。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞培養

リンパ管内皮細胞 (LEC) はイヌ胸管より単離し培養細胞系を確立した。培地は 20%FBS 添加 EGM-2 培地で培養し、5~8 継代の細胞を実験に使用した。

### 2) 増殖能、遊走能の検討

増殖能は

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay (Promega, Madison, WI) または c-fos promoter の転写因子結合部位下流に Luciferase 遺伝子を挿入したレポ

ーター遺伝子を用いた c-fos promoter assay にて検討した。遊走能は modified Boyden chamber で検討した。

### 3) 免疫学的検討

免疫染色には以下の抗体を使用した。

PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、VEGFR-3 (CHEMICON, Temecula, CA)、LYVE-1, Podoplanin, Prox1 (RESERCH DIAGNOSTICS, INC., Flanders, NJ)、c-Met (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) AlexaFluor488, AlexaFluor546 (Molecular Probes, Eugene, OR)。また Western blot には以下の抗体を使用した。phospho-specific, total ERK, phospho-specific, total Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)。

### 4) ラット動物モデル

すべての動物実験は旭川医科大学動物実験委員会の承認のもと施行された。ラット尾リンパ浮腫モデルを 60 匹作成し無作為に 6 つに群分けした。また胸筋温存乳房切除術に準じた方法で手術を施行し上肢リンパ浮腫モデルを 20 匹作成し無作為に 2 つに群分けした。遺伝子の導入は浮腫側筋肉内に naked plasmid を注射した。

### 5) 統計

統計学的検定は ANOVA にて施行し、コントロール群との比較は Tukey 法を使用し多群間での比較には Dunnett 法を使用した。

## 4. 研究成果

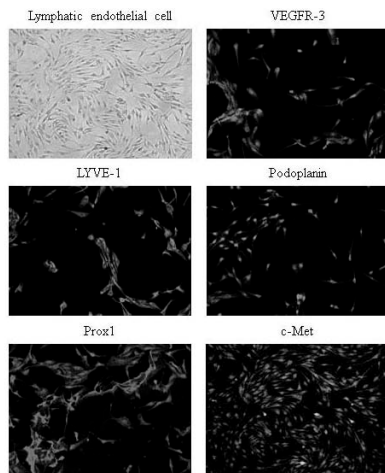
### 1) リンパ管内皮細胞の培養系確立とリンパ管マーカー発現の検討

雑種成犬胸管より内皮細胞を採取し初代培養細胞系を確立した。これらの細胞は免疫染色上リンパ管内皮細胞特異マーカーである VEGFR-3、LYVE-1、Podoplanin、Prox1 すべてに対し陽性であった。さらに HGF の受容体である c-Met がリンパ管内皮細胞に発現していることも確認し、この細胞が HGF に反応することが示唆された (Fig. 1)。

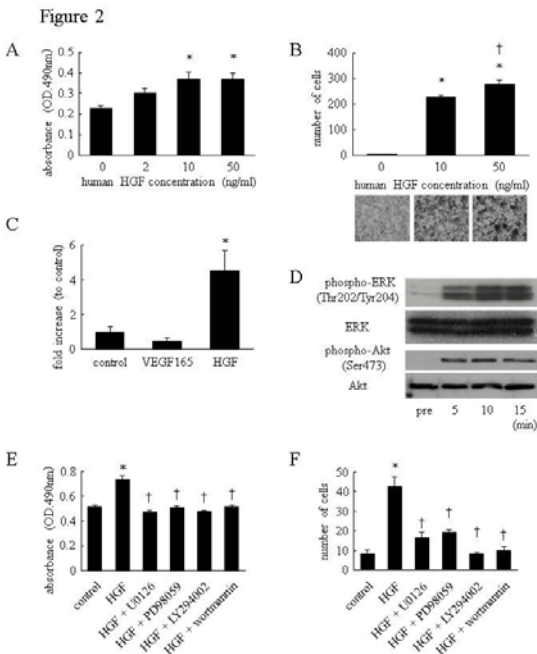
### 2) リンパ管内皮細胞の HGF への反応

LEC にヒト recombinant HGF (0, 2, 10, 50ng/ml) を添加し細胞増殖能 (MTS assay) を

Figure 1



検討したところ、濃度依存性に増殖能の増加を認めた (Fig. 2A)。また同様に遊走能の検討 (Boyden chamber assay) を行ったところ、遊走能の増加も濃度依存性に認められた (Fig. 2B) (\* $p < 0.05$  vs. HGF 0 ng/ml; † $p < 0.001$  vs. HGF 0 ng/ml)。さらにヒト HGF プラスミド DNA と、c-fos プロモーターの転写因子結合部位下流に Luciferase 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子をリンパ管内皮細胞に共導入して c-fos プロモーター活性を測定したところ、コントロールに比べ有意に増殖能の増加を認めたが、ヒト VEGF-A プラスミド DNA を導入した群では増殖能の増加は認められなかった (Fig. 2C) (\* $p < 0.05$  vs. control)。以上の培養細胞による検討から HGF がタンパク、遺伝子のいずれにおいてもリンパ管内皮細胞の増殖・遊走作用を有することが明らかとなった。



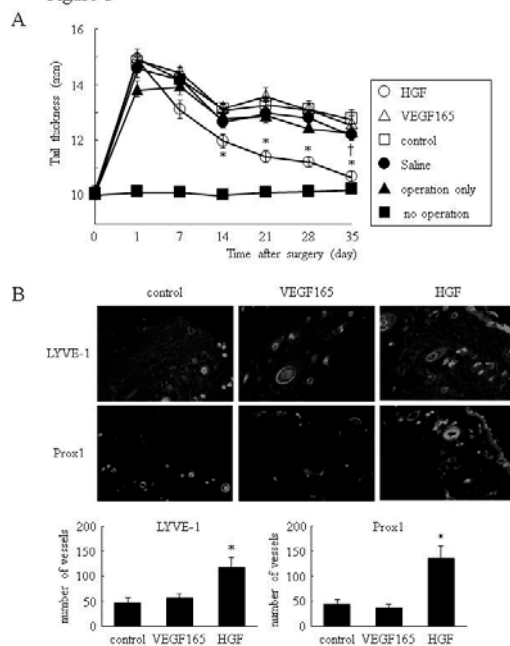
### 3) 細胞内シグナルの同定

これまでの報告から HGF-c-Met シグナルでは ERK と Akt のリン酸化が重要であることが知られている。そこで LEC をヒト recombinant HGF (50ng/ml) で刺激したのち回収し Western blot で解析した。ERK、Akt とともに HGF 刺激により 10 分後をピークとするリン酸化が認められた (Fig. 2D)。さらに HGF 刺激前に MEK inhibitor (U0126 と PD98059) あるいは PI3K inhibitor (LY294002 と wortmannin) で処理すると、いずれの inhibitor でも LEC の増殖能、遊走能が阻害されたため (Fig. 2E and F)、ERK、Akt シグナルが LEC 活性化に重要であることが証明された (\* $p < 0.05$  vs. control; † $p < 0.05$  vs. HGF)。

### 4) ラット尾モデルでの治療効果

細胞レベルでの実験結果を踏まえ、小動物でリンパ管新生遺伝子治療効果を検討することとした。そこでまずラットの尾のリンパ管を選択的に切除してリンパ浮腫モデルを作製し、naked HGF プラスミド DNA を浮腫側尾筋肉内に導入した。導入した遺伝子は Real Time PCR で発現していることを確認した。各群を比較するとヒト HGF 遺伝子導入群のみが他群に比べ有意に浮腫が改善し、35 日目で非手術群と変わらないまでに改善していた (Fig. 3A) (\* $p < 0.0001$  vs. VEGF165, control, Saline, operation only; † $p = 0.1449$  (no significance) vs. no operation.) さらにこれらの組織を免疫染色にて検討したところ、リンパ管内皮細胞マーカーである LYVE-1、Prox1 ではヒト HGF 遺伝子導入群で有意に脈

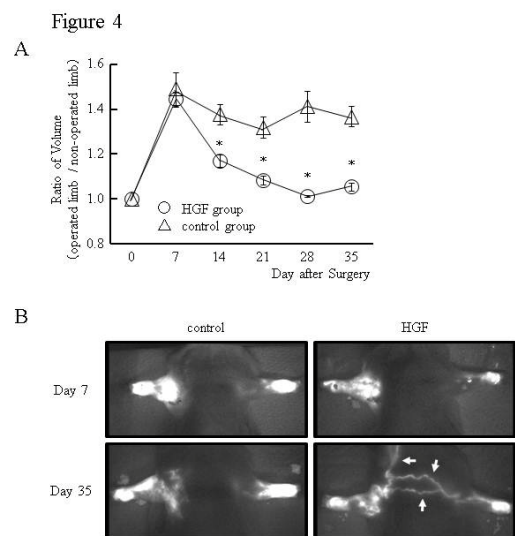
Figure 3



管が増加しており、HGF がリンパ管新生を誘導したことが確認された (Fig. 3B) (\* $p < 0.01$  vs. VEGF165 and control)。

#### 5) ラット上肢モデルでの治療効果

さらに乳癌術後を想定したラット上肢リンパ浮腫モデルを作成し検討した。尾モデルと同様に HGF 遺伝子導入群では浮腫が有意に改善していた (Fig. 4A) (\* $p < 0.05$  vs. control)。さらに PDE でリンパ流を観察すると、術後 21 日目の HGF 遺伝子導入群で浮腫側リンパ管が既存のリンパ管に接続しリモデリングされており、前胸壁、腹壁から対側の腋窩リンパ節に流入している像が描出された (Fig. 4B)。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) 齊藤幸裕、笹嶋唯博：肝細胞増殖因子によるリンパ浮腫遺伝子治療の基礎的検討. リンパ学. 2011年. In press.
- 2) 齊藤幸裕、笹嶋唯博、他：リンパ浮腫に対する遺伝子治療法の開発. 脈管学. 2011年. In press.

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Yukihiro Saito, Tadahiro Sasajima et al; Hepatocyte growth factor ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis.; 2007 Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology; S15-04; Taipei, Taiwan; 2007 Sep.
- 2) 齊藤 幸裕、中神 啓徳、東 信良、森下 竜一、金田 安史、笹嶋 唯博；リ

ンパ浮腫に対する HGF 遺伝子治療 — 臨床応用を目指した新たなステップ；第 49 回日本脈管学会総会；0-15-1；東京；2008 年 10 月

- 3) 齊藤 幸裕、笹嶋 唯博；乳癌術後リンパ浮腫モデルへの HGF によるリンパ管新生遺伝子治療；第 50 回日本脈管学会総会；0-1-4；東京；2009 年 10 月
- 4) 齊藤 幸裕、笹嶋 唯博；乳癌術後リンパ浮腫モデルへの HGF によるリンパ管新生遺伝子治療；第 110 回日本外科学会定期学術集会；末梢血管-3 OP-265-4；東京；2010 年 4 月
- 5) Yukihiro Saito, Tadahiro Sasajima; Therapeutic Lymphangiogenesis for Lymphedema by Gene Therapy of Hepatocyte Growth Factor Plasmid DNA; 2010 International Union of Angiology; Buenos Aires, Argentina; 2010 Apr.
- 6) 齊藤 幸裕、笹嶋 唯博；肝細胞増殖因子によるリンパ浮腫遺伝子治療の基礎的検討；第 34 回日本リンパ学会総会；シンポジウム 1 リンパ浮腫治療の新しい展開 S1-1；東京；2010 年 6 月
- 7) Yukihiro Saito, Tadahiro Sasajima et al; TRANSFECTION OF HUMAN HEPATOCYTE GROWTH FACTOR GENE AMELIORATES SECONDARY LYMPHEDEMA VIA LYMPHANGIOGENESIS; 16th JSGT Annual Meeting Oral Presentation-Genetic, Neuromuscular & Other Disease-II; Utsunomiya, Japan; 2010 Jul.
- 8) 齊藤 幸裕、笹嶋 唯博、他；リンパ浮腫に対する遺伝子治療法の開発；第 51 回日本脈管学会総会；SY-4-6；旭川；2010 年 10 月
- 9) Yukihiro Saito, Tadahiro Sasajima et al; Hepatocyte growth factor gene therapy for lymphedema.; 2nd Catholic VESSEL Update 2010; Seoul, Korea; 2010 Dec.
- 10) Yukihiro Saito, Tadahiro Sasajima; Therapeutic Lymphangiogenesis for Lymphedema by Gene Therapy of Hepatocyte Growth Factor Plasmid DNA; The 75<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society; OE-393. Yokohama, Japan; 2011 Mar.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：リンパ管新生促進剤。  
 発明者：齊藤幸裕 他 3 名  
 権利者：アンジェス MG 株式会社  
 種類：特許

番号：PCT/JP2006/315010  
出願年月日：2006年7月28日  
国内外の別：国外

○取得状況（計1件）

名称：リンパ管新生促進剤  
発明者：齊藤幸裕 他3名  
権利者：アンジェスMG株式会社  
種類：特許  
番号：特許4111993  
取得年月日：2008年4月18日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med-surgery.net/jp/home/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹嶋 唯博 (SASAJIMA TADAHIRO)  
旭川医科大学・医学部・副学長  
研究者番号：20109515

(2) 研究分担者

齊藤 幸裕 (Saito Yukihiro)  
旭川医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：80540583

(3) 研究協力者

内田 恒 (Uchida Hisashi)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60301991