

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18198

研究課題名(和文) TRPV4を標的とした血管・リンパ管新生に基づく虚血肢改善治療のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for critical limb ischemia therapy targeting TRPV4 by inducing angiogenesis and lymphangiogenesis

研究代表者

山田 英明 (Hideaki, Yamada)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：80785006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は重症下肢虚血に対する血管再生治療の問題点である浮腫の解消を目的とした治療研究である。リンパ管は浮腫を解消する重要な器官である。血管再生効果とリンパ管制御が期待できるTRPV4(カルシウムチャネル受容体)に注目しマウス虚血肢モデルを用いて以下のことを示した。

1)マウス虚血肢にTRPV4活性化剤を投与することは血管およびリンパ管新生を誘導し、下肢の血流を回復させる。2)虚血肢は低酸素状態であり、TRPV4発現を増加させる。3)TRPV4活性化剤を虚血肢に投与することで血管新生効果の効果を高めることが期待できる。

TRPV4を制御することは重症下肢虚血に対する新たな治療方法となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、血管再生治療の弊害である浮腫を解決する新たな治療法の確立として期待できる。重症下肢虚血治療研究のみならず再生移植医学全般の治療研究への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a new angiogenic therapy to eliminate edema, which is a challenge in angiogenic therapy for critical limb ischemia. Lymphatic vessels have a crucial role for solving edema. We focused on TRPV4, which is expected to have angiogenic and lymphangiogenic effects, and conducted validation experiments using a mouse ischemic limb model to elucidate the following.

1) TRPV4 agonist improved the blood flow of ischemic hind limb by inducing angiogenesis and lymphangiogenesis; 2) excessive TRPV4 expression was detected on ischemic hind limb under hypoxic condition; 3) TRPV4 agonist can be expected to enhance this effect.

TRPV4-targeted therapy is a promising treatment for critical limb ischemia.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：TRPV4 リンパ管新生 血管新生 虚血肢 低酸素

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症は動脈の狭窄および閉塞により、主に下肢の血流が低下した病態である。その最重症病態である重症下肢虚血は血行再建術(血管内治療およびバイパス手術)が治療の第一選択となるが、重症下肢虚血患者の30%が血行再建術の適応外であり、また、血行再建術を受けることができた患者でも、その20%は術後5年以内に下肢切断が不可避となる。よって、血行再建術以外の効果的な治療法が求められている。

近年、血管再生治療が重症下肢虚血の重要な治療戦略として注目されているが、その有効性は現時点において証明に至っていない。フィンランドで行われた血管新生因子 VEGF 遺伝子導入の臨床試験においても、その血流回復効果の優位性は認められなかった (Makinen K, et al. Mol Ther. 2002)。血管再生治療の障壁の一つに血管透過性亢進による組織浮腫の形成が指摘されている (Yancopoulos GD, et al. Nature. 2000) が、このことは、重症下肢虚血の血流回復には、血管新生の促進に加えて組織浮腫の制御が重要である、と言い換えることができる。血流回復を促進する鍵として、当講座は長年リンパ管に着目してきた。リンパ管は組織液を循環系に還流するためのドレナージルートであり、組織浮腫を解消する重要な器官である。血流回復におけるリンパ管新生の重要性については、以前行なった VEGFC をマウス虚血肢に投与する実験において、虚血肢のリンパ管新生誘導と血流回復を明らかにしたことで証明している (Kawahara G, et al. J Vasc Surg. 2013)。

TRPV4 は血管内皮細胞膜に存在する非選択性カルシウムチャネル受容体である。その活性化により、細胞内へカルシウムイオンが流入し血管新生が誘導される (Zuccolo E, et al. Vascul Pharmacol. 2016)。TRPV4 の活性化による血流回復効果については、ブタの虚血肢モデルを用いた他のグループより示されている (C Troidl, et al. J. Mol. Cell. Cardiol. 2010)。また近年、TRPV4 がリンパ管内皮細胞にも存在していることが明らかになった (Behringer EJ, et al. J Physiol. 2017)。以上より、TRPV4 の制御により血管およびリンパ管新生が誘導され、重症下肢虚血における血流回復が期待できると考えられた。

2. 研究の目的

TRPV4 の活性化により血管およびリンパ管新生が誘導され虚血肢の血流が回復することを、マウス虚血肢モデルを用いて証明する。

3. 研究の方法

虚血肢モデルには 12 週齢雄の野生型 C57BL/6J マウスを使用した。虚血肢は左大腿動静脈の本幹とその分枝を結紮切離することで作成した。その直後に TRPV4 作動薬、拮抗薬、薬剤を加えない溶解液を虚血肢大腿部の筋肉内に各々注射し、それぞれ TRPV4 作動薬群、拮抗薬群、対照群と群別化した。レーザードップラーによる下肢の血流測定は術後 3、7、14 日目に施行した。リンパ管新生の *in vivo* での評価は、エバンスブルー色素による下肢のリンパ管造影で行った。

血管およびリンパ管新生の評価は虚血肢の筋組織の免疫染色と画像解析ソフトによる定量化処理にて行った。1 次抗体は、血管に対しては von Willebrand factor (vWF) 抗体および SMA 抗体を、リンパ管に対しては Podoplanin (Pdp) 抗体および LYVE-1 抗体をそれぞれ使用した。染色後、術後 14 日目の虚血肢筋組織の 1 筋繊維あたりの血管数およびリンパ管数を計測した。また、Pdp と TRPV4 の二重染色により TRPV4 を発現するリンパ管を同定した。さらに、虚血肢作成前後の血管およびリンパ管の TRPV4 発現の変化を評価した。

虚血肢筋組織の酸素分圧を酸素分圧測定器で測定した。低酸素誘導因子(HIF1)が虚血肢筋組織のリンパ管に発現していることを免疫染色で評価した。低酸素状態におけるマウスリンパ管内皮細胞の HIF1 と TRPV4 遺伝子の発現は定量的 PCR 法で数値化し、酸素濃度(正常 21%O₂、低酸素 2% O₂)と培養時間(6 時間、24 時間)の差異による比較を行なった。続いて HIF1 が TRPV4 のプロモーターを活性化させることを検証するため、発光色素のルシフェラーゼレポーターを遺伝子導入したベクターをマウスリンパ管内皮細胞にトランスフェクションさせ、酸素条件を変えてその活性を解析した。

最後に、マウスリンパ管内皮細胞におけるカルシウムイオンの細胞内への取り込み量の大きさを Fura-2AM (DOJINDO)を用いて測定し、酸素濃度と試薬条件の違いによる差異を評価した。

4 . 研究成果

TRPV4 作動薬群では術後 3 日目より血流が検出され、7 日目、14 日目においても他の 2 群よりも良好な血流回復が確認された(それぞれ $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.0001$)。また、術後 3 日目の下肢リンパ管造影において、TRPV4 作動薬群におけるリンパ管は対照群に比べて明瞭に造影された。

血管並びにリンパ管新生に関しては、TRPV4 作動薬群において、術後 14 日目での 1 筋繊維あたりの vWF 陽性数、pdp 陽性数、LYVE-1 陽性数がそれぞれ著明に増加していた(いずれも $P < 0.01$)。また、TRPV4 作動薬群では、術後 14 日目の TRPV4 を発現したリンパ管が他の 2 群と比べて有意に増加していた($P < 0.05$)。

虚血肢筋組織中の酸素分圧は低下し、組織中のリンパ管での HIF1 の発現は増強した。さらに、虚血肢作成後 3 日目の筋組織では、虚血肢作成前と比べリンパ管における TRPV4 発現が増加した。

低酸素濃度で培養したマウスリンパ管内皮細胞の培養 24 時間後の HIF1 発現量は著明に増加し($P < 0.01$)、さらに TRPV4 発現量も培養 6 時間、24 時間でともに増加していた(それぞれ $P < 0.01$)。HIF1 の TRPV4 プロモーターへの活性も低酸素により増加を認めた($P < 0.01$)。

マウスリンパ管内皮細胞のカルシウムイオンの取り込み量は低酸素条件で増加し、TRPV4 拮抗薬の添加により正常酸素分圧と同程度に抑制された。

以上より、TRPV4 作動薬をマウス虚血肢に投与することで血管新生とリンパ管新生が誘導され下肢の血流が回復すること、低酸素条件で TRPV4 が活性化しリンパ管内皮細胞における細胞内へのカルシウムイオンの取り込みが増加すること、低酸素条件でリンパ管内皮細胞での HIF1 発現が増強し、HIF1 の TRPV4 プロモーターへの活性が増加することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideaki Yamada, Naoaki Sakata, Tomoko Tanaka, Hideaki Tagashira, Gumpei Yoshimatsu, Ryo Kawakami, Hideichi Wada, Takahiro Iwamoto, Shohta Kodama	4. 巻 146
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and angiogenesis rescue murine ischemic hindlimb via transient receptor potential vanilloid 4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 244-248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hideaki Yamada, Naoaki Sakata, Masuhiro Nishimura, Tomoko Tanaka, Masayuki Shimizu, Gumpei Yoshimatsu, Ryo Kawakami, Hideichi Wada, Osamu Sawamoto, Shinichi Matsumoto, Shohta Kodama	4. 巻 -
2. 論文標題 Xenotransplantation of Neonatal Porcine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Murine Hind Limb Ischemia through Lymphangiogenesis and Angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Xenotransplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/xen.12693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------