

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09841

研究課題名(和文) 低酸素応答システム活性化薬剤を用いた下肢慢性創傷の新治療

研究課題名(英文) Novel Treatment of Chronic Wounds of the Lower Extremity with Drugs Activating the Hypoxic Response System

研究代表者

大澤 昌之(Osawa, Masayuki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：70625029

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)：生体は低酸素状態に対する適応応答としてHIF-1 (hypoxia inducible factor-1 alpha) を発現する。本研究は、マウスの後肢リンパ浮腫モデルを用いてHIF-1 調整薬剤の与える影響を検証し、慢性創傷を含むリンパ浮腫の病態に対する治療法の開発を目的とした。本研究において、マウス後肢リンパ浮腫モデルにHIF-1 安定化薬であるRoxadustatを投与し、後肢周径の変化、リンパ流変化、組織病理学的変化、遺伝子発現等の変化の有無について検討した結果、Roxadustatはリンパ管新生を促し、リンパ浮腫に対する治療的効果がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫患者は創傷ができやすく、治癒が遅延するため頻りに蜂窩織炎などの合併症を起こし、治療に難渋することが多い。リンパ浮腫では、細胞障害、免疫低下、感染など複雑な病態で創傷治癒が遅延するとされ、随伴症状治療の観点からも有効な治療法の開発が望まれている。本研究では、Roxadustatはマウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて、リンパ管新生因子の発現およびリンパ管数を増加させ、浮腫の後肢周径の減少、リンパ流のうっ滞の改善効果を発揮することを示した。これらの結果はRoxadustatがリンパ浮腫治療薬として有望であることを示唆しており、リンパ浮腫に対する薬剤治療の可能性を拓くものである。

研究成果の概要(英文)：The organism expresses HIF-1 (hypoxia inducible factor-1 alpha) as an adaptive response to hypoxia. This study was initiated to examine the effects of HIF-1 modulating agents on a mouse model of hindlimb lymphedema and to develop a treatment for lymphedema, including chronic wounds. In this study, we administered roxadustat, a HIF-1 stabilizer, to a hindlimb lymphedema model and examined whether changes in hindlimb circumference, lymphatic flow, histopathology, gene expression, etc. were observed. The results suggest that roxadustat may promote lymphangiogenesis in lymphedema and may have a therapeutic effect on lymph edema.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 低酸素応答

1. 研究開始当初の背景

低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor ; HIF)は、低酸素に対する細胞の適応反応に関連する様々な遺伝子の転写活性化因子であり、血管およびリンパ管新生、炎症、細胞外マトリックスの代謝、細胞増殖などに関わる遺伝子を活性化する。薬剤による HIF の安定化または阻害は、創傷、心疾患、網膜疾患、脊髄損傷、パーキンソン病、悪性腫瘍 など多岐にわたる疾患に対する治療効果を有することが報告されている。

一方、リンパ浮腫は未だ病態が完全に解明されておらず、根治療法が存在しない慢性疾患である。症状として、痛みや疲労感に加え、創傷ができやすい上に創傷治癒遅延を生じ、繰り返す皮膚軟部感染症の原因となるなど、患者の日常生活動作を著しく制限する。このような症状の治療の観点からも新規治療法の開発が望まれている。当教室ではこれまでに、マウス後肢リンパ浮腫モデルを開発、改良し、リンパ機能不全における病態について研究してきた。

2. 研究の目的

HIF はリンパ浮腫のリンパ管再構築において重要な役割を担うことが示唆されているが、HIF の活性を調整する薬剤がリンパ浮腫およびリンパ浮腫における創傷にどのような影響を与えるのかは分かっていない。そこで、当教室で開発したマウス後肢リンパ浮腫モデルを用いて、HIF の活性調整薬がリンパ浮腫およびリンパ浮腫における創傷に与える影響を検証することを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

【材料と方法】

- (1) 8 から 10 週齢雄の C57BL/6N マウス 24 匹を用いて、マウス後肢リンパ浮腫モデル($n=18$)、および鼠径部の皮膚を切開するのみの Sham ope($n=6$)を作製した。作製した後肢リンパ浮腫マウスを、HIF-1 安定化薬である Roxadustat (DMSO 中 25 mg/kg)を投与する実験群($n=6$)、HIF-1 阻害薬である YC-1(DMSO 中 30 mg/kg)を投与する実験群($n=6$)、およびリンパ浮腫(LE)群(DMSO)($n=6$)に無作為に分け、手術日を含み 2 日ごとに腹腔内注射を最大 2 週間行った。また、Sham ope 群($n=6$)に同量の DMSO を同様に投与した。手術後 4 日目に、各群の後肢に直径 8mm の皮膚全層欠損創を作成した。創傷作成後毎日創部を観察し、閉創するまでの日数を計測した。また、手術後 0, 4, 7, 10, 14 日目における創傷の画像を撮影し、閲覧ソフトウェアを用いて創傷作成後 0, 4, 7 日目における創傷の面積を計測し、各時点における創傷閉鎖割合を算出した。創傷作成時に採取した皮膚は、hematoxylin and eosin(HE)染色で組織学的に評価した。
- (2) (1)と同様のマウス 36 匹を用いて後肢リンパ浮腫モデルを作製し、以下の 2 群に無作為に分けた。各群は、後肢リンパ浮腫モデル(コントロール) 群($n=18$)、後肢リンパ浮腫モデルに対して Roxadustat を投与する群($n=18$)とした。手術後 28 日まで経時的に健側に対する患側後肢の周径比を評価し、蛍光リンパ管造影法により後肢のリンパ流を比較した(各群 $n=6$)。また、手術後 7 日目に後肢浮腫部の皮膚、皮下組織を摘出し、HE 染色および lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 ; LYVE-1 に対する免疫組織化学染色で組織学的に評価した。画像閲覧ソフトウェアを用いて各切片の hot spot におけるリンパ管数およびリンパ管の平均内腔面積を計測した(各群 $n=6$)。また、手術後 4 日目に後肢浮腫部の皮膚、皮下組織を摘出し hypoxia inducible factor-1 ; HIF-1 ,vascular endothelial growth factor-C ; VEGF-C ,vascular endothelial growth factor receptor-3 ; VEGFR-3 ,prospero homeobox protein 1 ; Prox1 の mRNA 発現量を比較した(各群 $n=6$)。2 群間の解析は Student の t 検定で統計解析した。3 群以上に関しては、一元配置分散分析法(one-way ANOVA)で検定した後、多重比較検定(Tukey-Kramer 法)を行った。得られた結果は平均 ± 標準誤差(standard error of the mean ; SEM)で表した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

【結果】

- (1) 創傷閉鎖日数は、Sham ope 群(8.3 ± 0.4 日)に対し、LE 群(12.7 ± 0.3 日)、Roxadustat 投与群(10.7 ± 0.4 日)、YC-1 投与群(15.6 ± 0.2 日)は、いずれも有意に延長した($p < 0.01$)。また、LE 群に対して Roxadustat 投与群は有意に短縮し($p < 0.01$)、YC-1 投与群は有意に延長した($p < 0.01$) (図 1A, B)。創傷作成から 4 日時点での創傷閉鎖割合は、Sham ope 群($78.2 \pm 4.6\%$)に対し、LE 群($34.8 \pm 3.0\%$)、Roxadustat 投与群($50.0 \pm 1.6\%$)、YC-1 投与群($22.8 \pm 3.2\%$)はいずれも有意に減少した。また LE 群に対して Roxadustat 投与群は有意に増加したが($p < 0.05$)、YC-1 投与群は有意差がなかった(図 1A, C)。創傷作成から 7 日時点での創

傷閉鎖割合は, Sham ope 群($96.5 \pm 2.1\%$)に対し, LE 群 ($67.8 \pm 3.1\%$), YC-1 投与群($53.6 \pm 4.6\%$)はいずれも有意に減少した。また LE 群に対して Roxadustat 投与群($86.5 \pm 2.8\%$), は有意に増加し($p < 0.01$), YC-1 投与群は有意に減少した($p < 0.05$) (図 1A, D)。また, LE 群に比して, Roxadustat 投与群は肉眼的に浮腫が減少し, YC-1 投与群は浮腫が増悪していた。この所見は創傷作成時から閉創時に至るまで認められた(図 1A)。Sham ope 群, LE 群, Roxadustat 投与群, YC-1 投与群の創傷作成時の皮膚厚はそれぞれ, 203 ± 4.8 , 275 ± 4.3 , 208 ± 16.6 , $322 \pm 9.0 \mu\text{m}$ であり, Sham ope 群に比して, LE 群は有意に増加した($p < 0.01$)。LE 群に比して, Roxadustat 投与群は有意に減少し($p < 0.01$), YC-1 投与群は有意に増加していた($p < 0.05$) (図 2A, B)。

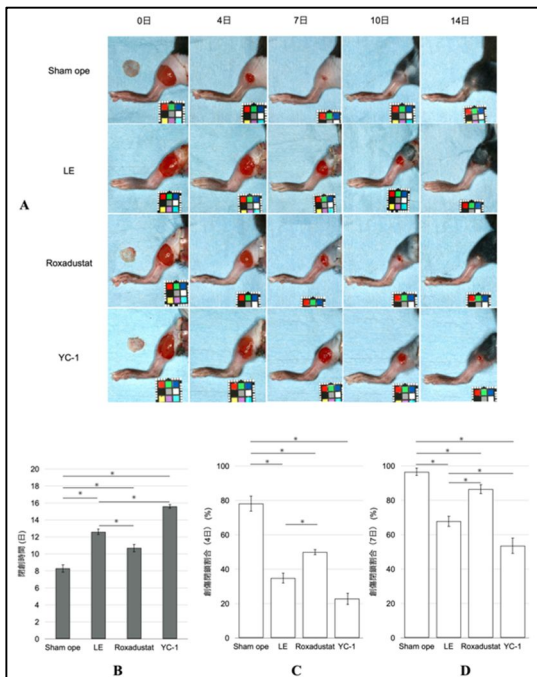


図 1.
(A)創傷治癒の経過写真。LE 群に比して, Roxadustat 投与群は肉眼的に浮腫が改善し, YC-1 投与群は浮腫が増悪した。
(B)各群の創傷閉鎖日数。Roxadustat 投与群が LE 群に比して有意に短縮し ($*p < 0.01$), YC-1 投与群では有意に延長した ($*p < 0.01$)。error bar = standard error of the mean; SEM。
(C)創傷作成から 4 日目の創傷閉鎖割合。LE 群に比して Roxadustat 投与群は有意に増加したが ($*p < 0.05$), YC-1 投与群は有意差がなかった。error bar = SEM。
(D)創傷作成から 7 日目の創傷閉鎖割合。LE 群に比して Roxadustat 投与群は有意に増加したが ($*p < 0.01$), YC-1 投与群は有意に減少した ($*p < 0.05$)。error bar = SEM。

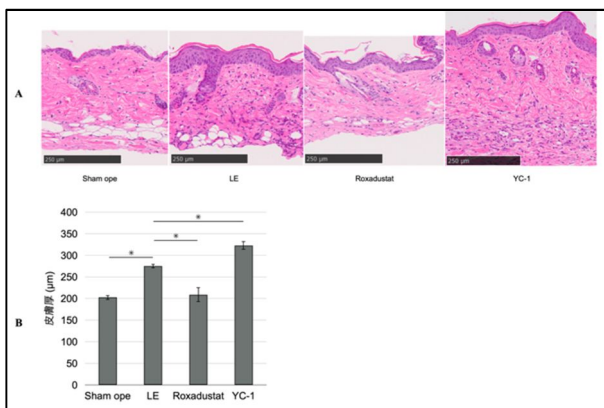


図 2.
(A)リンパ浮腫作製手術後 4 日目の各群の皮膚の HE 染色像。scale bar = $250 \mu\text{m}$ 。
(B)各群の皮膚厚。Roxadustat 投与群が LE 群に比して有意に皮膚厚が減少し ($*p < 0.01$), YC-1 投与群では有意に皮膚厚が増加した ($*p < 0.05$)。error bar = standard error of the mean; SEM。

(2) 周径比は, コントロール群では手術後 28 日目に 100%に達したが, Roxadustat 投与群では 21 日目に 100%に達し, 2 日目から 24 日目まで, Roxadustat 投与群はコントロール群より有意に低かった($p < 0.05$) (図 3A, B)。蛍光リンパ管造影で, コントロール群では手術後 1 週間から 4 週間まで手術側後肢全体にびまん性の dermal backflow が認められた。一方, Roxadustat 群でも dermal backflow を認めたが, コントロール群に比べ蛍光が减弱し, この所見は手術後 2 週以降において有意であった($p < 0.05$) (図 4A, B)。また免疫組織学的検討において, リンパ管数は, コントロール群(5.2 ± 0.4)に比べ, Roxadustat 投与群(8.5 ± 0.5)で有意に多かった($p < 0.05$) (図 5A, B)。リンパ管内腔面積は, コントロール群($1,385 \pm 163 \mu\text{m}^2$)に比べて Roxadustat 投与群($334 \pm 38 \mu\text{m}^2$)で有意に小さかった($p < 0.05$) (図 5A, C)。また, HIF-1, VEGF-C, VEGFR-3, Prox1 の相対 mRNA 発現量は, Roxadustat 投与群でコントロール群より有意に高かった(それぞれ 1.6 ± 0.2 , 4.3 ± 0.7 , 2.5 ± 0.3 , 2.8 ± 0.4) ($p < 0.05$) (図 6)。

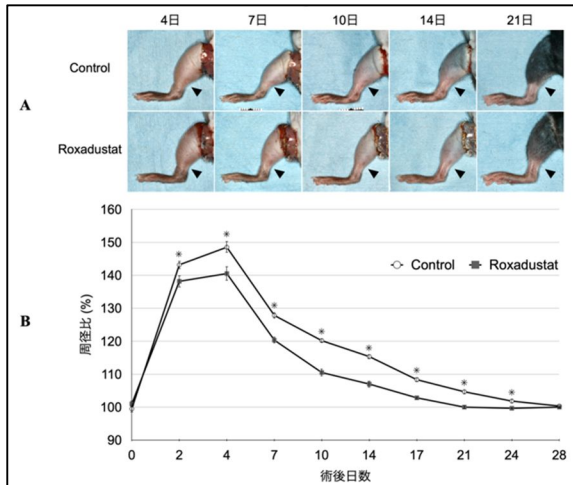


図 3.
(A)両群のマウス後肢リンパ浮腫モデル。後肢周径は腓腹筋の筋腱接合部で測定した(黒矢じり)。
(B)周径比の経時的評価。Roxadustat 投与群ではコントロール群に比して周径比が減少した。この所見は手術後 2 日目から 24 日目まで統計学的に有意であった(* $p < 0.05$)。error bar = standard error of the mean; SEM。

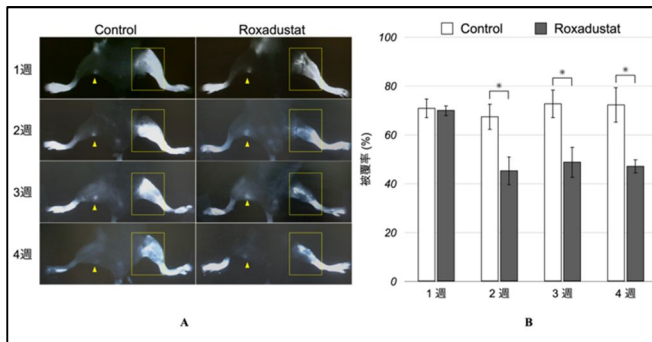


図 4.
(A)手術後 1 から 4 週目の各群の蛍光リンパ造影画像。リンパ浮腫を作製した左後肢では、どちらの群においても dermal backflow が広範囲に観察された(黄色の四角内)。Roxadustat 投与群では dermal backflow が観察されたが、コントロール群に比べ蛍光は減弱した。健側の後肢では、膝窩リンパ節(黄矢じり)が確認された。

(B)後肢浮腫部における蛍光領域の被覆率。手術後 2 週以降において、コントロール群に比して Roxadustat 投与群は有意に被覆率が減少した(* $p < 0.05$)。error bar = standard error of the mean; SEM。

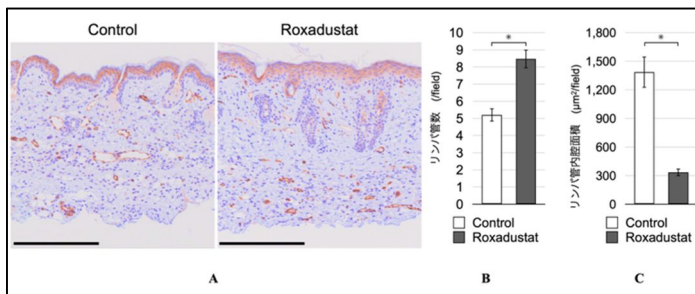


図 5.
(A)手術後 7 日目のコントロール群(左)および Roxadustat 投与群(右)における LYVE-1 免疫組織化学染色。scale bar = 250 μm 。
(B)リンパ管数は、コントロール群に比して Roxadustat 投与群で有意に増加した(* $p < 0.05$)。error bar = standard error of the mean; SEM。

(C)リンパ管内腔面積は、コントロール群に比して Roxadustat 投与群で有意に減少した(* $p < 0.05$)。error bar = SEM。

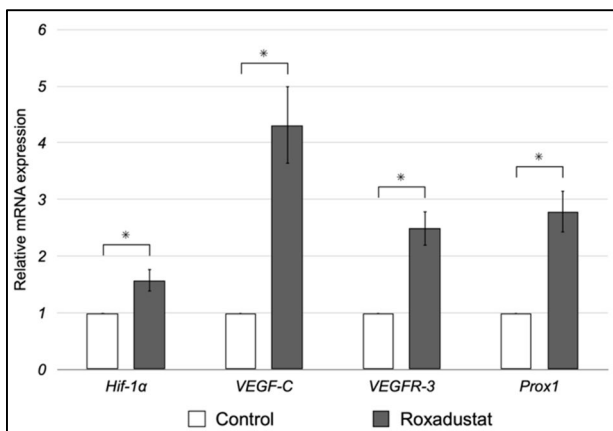


図 6.
皮膚および皮下組織のリアルタイム PCR 分析により、手術後 4 日目に HIF-1 α 、VEGF-C、VEGFR-3、および Prox1 が、コントロール群に比して Roxadustat 投与群で有意に高いレベルで発現した(* $p < 0.05$)。error bar = standard error of the mean; SEM。

【考察】

- (1) マウス後肢リンパ浮腫モデルに作成した創傷は、Sham ope 群よりも有意に創傷治癒が遅延し、リンパ浮腫における創傷治癒遅延を再現することができた。また、同モデルに HIF-

1 安定化薬および阻害薬を投与することにより、創傷治癒は有意に促進または遅延したが、創傷作成時点から治癒に至る過程において、肉眼的浮腫についても群間で差が認められた。また創傷作成時の皮膚厚については各群で有意差を認めた。つまり、HIF-1 の活性調整薬の投与によりリンパ浮腫の改善および増悪が起きており、各群の創傷治癒に影響を与えている可能性が示された。特に、Roxadustat 投与による肉眼的浮腫の改善および皮膚厚の減少は、リンパ浮腫に対する治療効果として捉えることができるため、リンパ循環機能ならびにリンパ管の形態、リンパ管新生因子などに与える影響についてさらなる検証が必要と考えられた。

- (2) Roxadustat の投与は、リンパ浮腫を作製した後肢周径の改善ならびにリンパ流のうっ滞を改善することを示した。さらに手術後4日においてリンパ管新生因子の遺伝子発現は有意に増加し、手術後7日における皮膚、皮膚皮下組織におけるリンパ管の数の増加ならびにリンパ管内腔の減少を示し、リンパ管新生が亢進することを示した。

【結論】

- (1) マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける創傷モデルを作製した。また、同モデルに対するHIF-1 の活性調整薬の投与が、創傷治癒のみならず浮腫の改善、増悪に影響している可能性を示した。
- (2) Roxadustat は、マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいてリンパ管新生を促し、浮腫の改善効果を発揮することを示した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yoshitada Hoshino, Masayuki Osawa, Emi Funayama, Kosuke Ishikawa, Takahiro Miura, Masahiro Hojo, Yuhei Yamamoto, Taku Maeda	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic potential of the prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat in a mouse hindlimb lymphedema model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	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） 10.1089/lrb.2022.0071	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野善允、石川耕資、前田拓、大澤昌之、舟山恵美、三浦隆洋、北條正洋、林利彦、山本有平
2. 発表標題 マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける創傷モデルの作成と低酸素応答因子・酸素環境の解析
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野善允、前田拓、石川耕資、大澤昌之、舟山恵美、三浦隆洋、北條正洋、林利彦、山本有平
2. 発表標題 マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける創傷モデルの作成とHIF-1 活性調整薬剤の創傷治癒に与える影響
3. 学会等名 第103回北日本形成外科学会北海道地方会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	舟山 恵美 (Funayama Emi) (10533630)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山本 有平 (Yamamoto Yuhei) (70271674)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	前田 拓 (Maeda Taku) (80813542)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	石川 耕資 (Ishikawa Kosuke) (60791374)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	林 利彦 (Hayashi Toshihiko) (00432146)	旭川医科大学・形成外科・教授 (10107)	

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