

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670748

研究課題名(和文)リンパ循環改善による食塩感受性高血圧の新規治療法の開発的研究

研究課題名(英文)Development of a new treatment for salt-sensitive hypertension by improvement of the lymphatic system

研究代表者

水野 理介(Mizuno, Risuke)

東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：30273080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：食塩感受性高血圧症におけるリンパ循環系の関与を解明するために、モデル動物を用いて研究を行った。動物を正常食塩食群(NSD)と高食塩食群(HSD)に分け、食塩負荷後に集合リンパ管を摘出しex vivo実験において、集合リンパ管の収縮機能を評価検討した。その結果HSDは、1)ラット腸骨リンパ節輸入リンパ管の収縮力とポンプ作用増強を誘起する、2)ICRマウス腸骨リンパ節輸入リンパ管の収縮頻度増加によるポンプ作用増強を誘起する、3)ICRマウス集合リンパ管の浸透圧感受性Cl⁻チャネルおよびTRPVチャネルの反応性を変調させることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To identify roles of lymphatic circulation for salt-sensitive hypertension, we investigated the effect of a high salt diet (HSD) on mechanical function and contractility of collecting lymphatics in ex vivo studies. A HSD significantly enhanced contractility and pump activity of afferent lymphatics of SD rat iliac lymph nodes. Efferent, but not afferent, lymphatics of ICR mice iliac lymph nodes significantly increased the frequency and pump activity in response to HSD. A HSD altered responsiveness of osmolality dependent Cl⁻ channels and TRPV channels. The present study indicates that the lymphatic system could adapt to compensate for increase in lymph flow and/or pressure after high salt loading.

研究分野：生理学

キーワード：リンパ管 平滑筋 食塩 高血圧 微小循環

1. 研究開始当初の背景

リンパは毛細リンパ管(平滑筋無し)で産生され、その下流に連結する集合リンパ管のポンプ作用によって輸送される(図 1A)。集合リンパ管には平滑筋が存在し、この平滑筋の収縮-弛緩作用によるポンプ作用は、リンパ輸送の動力源として生理学的に重要な因子である。ヒトを含めて多くの哺乳動物の集合リンパ管は、自発性収縮能を有することが特徴である。高血圧症に関連する臓器組織として、心血管系、中枢末梢神経系、腎臓であることは明らかになっている。さらに近年、食塩感受性高血圧の病態生理にリンパ管系の関与することが報告された。すなわち、高食塩負荷は、モデル動物の皮下毛細リンパ管過形成を惹起し、そのメカニズムに皮下微小循環領域における、プロテオグリカン-Na⁺複合体やマクロファージ由来 VEGF-C が重要な Player として関与していることが判明した(1 図 B)。しかしながら、食塩感受性高血圧において毛細リンパ管に連結する集合リンパ管の病態生理学は、国内外ほとんど研究されていない。本研究では、食塩感受性高血圧における集合リンパ管の病態生理学解明の重要性と必要性に着目し、さらに本研究結果を基盤とした新規治療法の開発的研究を行うに至った。

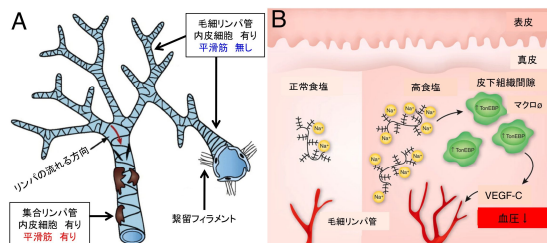


図 1

2. 研究の目的

食塩感受性高血圧とは、食塩摂取により惹起される高血圧症である。この病態に関わる重要な臓器・組織は、神経系(中枢・末梢)、心臓、腎臓および血管である。最近、リンパ循環系もこの食塩感受性高血圧の病態生理に役割を果たすことが報告された。すなわち高食塩を負荷された動物において、マクロファージ由来リンパ管新生因子は、皮下の毛細リンパ管過形成を惹起する。この毛細リンパ管過形成は、高食塩負荷による組織間隙液の不均等分布を解消し高血圧に代償すると考えられている。しかし、毛細リンパ管に連結する集合リンパ管の高食塩負荷に対する機能特性変化は、全く明らかにされていない。本研究の目的は、食塩感受性高血圧モデル動物の集合リンパ管機能を解析し、そのリンパ循環改善による食塩感受性高血圧の新規治療法の開発的研究を行うことである。

3. 研究の方法

モデル動物(SD ラットと ICR マウス)の集合リンパ管機能を ex vivo 実験によって解析した。正常食塩群(NSD)と高食塩群(HSD)から、集合リンパ管を摘出、還流標本を作製し、集合リンパ管の

機械的活動を DVD Microscopy を用いて測定した。実験システムの概略図: ラット腸骨リンパ節のリンパ循環(図 2A)、輸入-輸出リンパ管を摘出し実験に用いた。摘出リンパ管還流標本と DVD マイクロスコープ(図 2B)。標本の内径変化をビデオキャリパーによって測定し、機械的収縮機能を算出した。

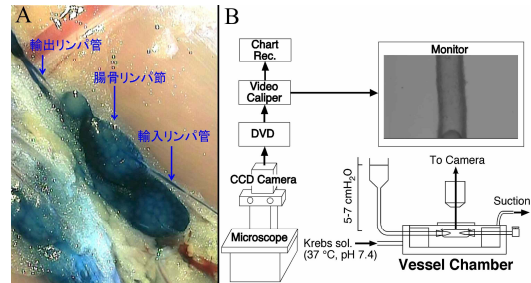


図 2

プロトコール 1

SD ラットを NSD 群(正常食塩食+水 7 週間)と HSD 群(5 週間 NSD その後 8% 食塩食+1% 食塩水 2 週間)に分けた。両群から腸骨リンパ節輸入リンパ管を摘出した後に、リンパ管還流標本を作製、標本内腔に内圧を負荷し内圧依存性リンパ管 mechanical activity を測定した。

プロトコール 2

ICR マウスを NSD 群(正常食塩食+水 9 週間)と HSD 群(5 週間 NSD その後 8% 食塩食+1% 食塩水 4 週間)に分けた。両群から腸骨リンパ節の輸入リンパ管と輸出リンパ管を摘出した後に、リンパ管還流標本を作製、標本内腔に内圧を負荷し内圧依存性リンパ管 mechanical activity を測定した。

プロトコール 3

ICR マウスを NSD 群(正常食塩食+水 9 週間)と HSD 群(5 週間 NSD その後 8% 食塩食+1% 食塩水 4 週間)に分けた。両群から腸骨リンパ節輸出リンパ管を摘出した後に、リンパ管還流標本を作製、標本内腔に一定内圧を負荷し内圧依存性リンパ管自発性収縮を惹起させた。標本に外因性刺激(NaCl、マンニトール、NPPB: Cl⁻チャネル阻害薬、カプサゼピン: TRPV チャネル阻害薬)を負荷し反応性を検討した。

すべてのプロトコールにおいて、刺激に対するリンパ管の反応性の相違を NSD 群と HSD 群とで比較検討した。

4. 研究成果

プロトコール 1

- (1) HSD 群の passive diameter (PD) は、NSD 群より有意に増加した。
- (2) Maximum(Dmax) および minimum diameter(Dmin) は、両群において有意な変化が見られなかった。
- (3) 筋原性収縮力の指標である %Dmax ならびに %Dmin において、HSD 群は NSD 群より有意に収縮力を増強した。
- (4) HSD 群の収縮振幅(amplitude) は、NSD 群より有意に高値を示した。
- (5) HSD 群の収縮頻度(frequency) は、NSD 群より高値を示す傾向にあった。

- (6) リンパ管収縮のポンプ作用に指標である stroke volume index (SVI) において、HSD 群は、NSD 群より有意に高値を示した。

以上の結果から、HSD はラット腸骨リンパ節輸入リンパ管の収縮力とポンプ作用増強を誘起することが判明し、HSD に対する集合リンパ管の適応反応性を初めて提示した。

プロトコール 2

- (1) HSD の輸入リンパ管の PD、Dmax および Dmin は、NSD に比べて有意に低値を示した。一方、輸出リンパ管において PD、Dmax および Dmin は両群間で差は見られなかった。
- (2) %Dmax は、輸入ならび輸出リンパ管ともに食塩負荷によって有意な変化は見られなかった。一方、%Dmin では、輸入リンパ管においてのみ HSD 群が NSD に比較して有意に高値を示した。
- (3) 輸入リンパ管において、HSD 群の amplitude と ejection fraction は、NSD に比較して有意に低値を示した。一方、輸出リンパ管において amplitude および ejection fraction は両群間で差は見られなかった。
- (4) 輸出リンパ管において、HSD 群の frequency は、NSD に比較して有意に高値を示した。一方、輸入リンパ管において frequency は両群間で差は見られなかった。
- (5) 輸入リンパ管において、HSD 群の SVI と frequency x SVI は、NSD に比較して有意に低値を示した。一方、輸出リンパ管において SVI と frequency x SVI は両群間で差は見られなかった。

本プロトコールにおいて、世界に先駆けてマウスのリンパ節輸入および輸出リンパ管機能解析に成功した。そして HSD は、ICR マウス腸骨リンパ節輸入リンパ管の収縮頻度増加によるポンプ作用増強を誘起することが判明し、HSD に対するリンパ節リンパ循環系の適応反応性を初めて提示した。

プロトコール 3

NaCl およびマニトールによる浸透圧負荷

- (1) NaCl による浸透圧負荷は、浸透圧依存性に両群の %frequency を減少させた。また、%frequency は両群間において有意な差がみられなかった。
- (2) NaCl による浸透圧負荷は、浸透圧依存性に両群の %SVI を増加させた。また、%SVI は両群間において有意な差がみられなかった。
- (3) NaCl による浸透圧負荷は、両群の %frequency x SVI に影響を与えなかった。
- (4) マニトールによる浸透圧負荷は、浸透圧依存性に両群の %frequency を減少させた。また、HSD 群の %frequency は、NSD に比べて有意に高値を示した。
- (5) マニトールによる浸透圧負荷は、浸透圧依存性に NSD 群の %SVI を減少させたが、HSD 群の %SVI を増加させた。また、HSD 群の %SVI は、NSD に比べて有意に高値を示した。

- (6) マニトールによる浸透圧負荷は、浸透圧依存性に NSD 群の %frequency x SVI を減少させたが、HSD 群では 80mOsm/L においてのみ %SVI を減少させた。また、HSD 群の %frequency x SVI は、NSD に比べて有意に高値を示した。

NPPB (Cl⁻チャンネル阻害薬) およびカプサゼピン (TRPV チャンネル阻害薬) の反応性

- (1) NPPB (10 μ M) は、NSD 群に収縮停止作用を惹起し、HSD 群の %frequency を減少させた。10 μ M の NPPB においてのみ両群間に有意な差がみられた。
- (2) NPPB (10 μ M) は、NSD 群に収縮停止作用を惹起したが、HSD 群の %SVI には影響を与えなかった。10 μ M の NPPB においてのみ両群間に有意な差がみられた。
- (3) カプサゼピン (10 μ M) は、NSD 群に収縮停止作用を、HSD 群の %frequency の増加 (0.3 μ M) と減少を惹起した。両群間において有意な差がみられなかった。
- (4) カプサゼピンは、NSD 群に有意な %SVI 減少を、HSD 群の %frequency の増加 (0.3 μ M) と減少を惹起した。両群間において有意な差がみられなかった。

以上の結果から、HSD は、ICR マウス集合リンパ管の浸透圧感受性 Cl⁻チャンネルおよび TRPV チャンネルの反応性を変調させることが判明した。

まとめ

高食塩負荷に対する集合リンパ管の適応反応 (図 4)

高食塩負荷 (毛細リンパ管過形成)

循環血漿量
毛細血管床における滲過 \uparrow & 再吸収
組織間隙液量
リンパ産生
リンパ流量 & リンパ管内圧
集合リンパ管壁伸展
集合リンパ管収縮力
リンパ輸送能

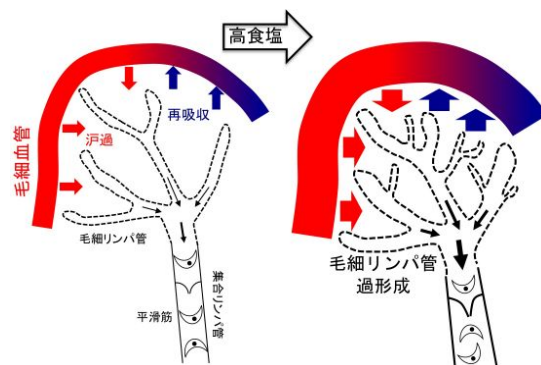


図 4

また、この作用機序の一部に、高食塩負荷による集合リンパ管平滑筋の浸透圧感受性変化、Cl⁻チャンネルと TRPV チャンネルの反応性変調が関与する。従って、集合リンパ管平滑筋 Cl⁻チャンネルと TRPV チャンネルを標的とした化合物は、食塩感受性高血圧症治療のターゲットとなる可能性

が示唆された。

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) Mizuno R, Isshiki M, Ono N, Nishimoto M, Fujita T. A high-salt diet differentially modulates mechanical activity of afferent and efferent collecting lymphatics in murine iliac lymph nodes. *Lymphat Res Biol*. in press
<http://www.liebertpub.com/overview/lymphatic-research-and-biology/114/> (査読有)
- (2) Mizuno R, Isshiki M, Ono N, Nishimoto M, Fujita T. A high salt diet alters pressure-induced mechanical activity of the rat lymphatics with enhancement of myogenic characteristics. *Lymphat Res Biol*. 2015 Mar; 13(1): 2-9. doi: 10.1089/lrb.2014.0028. (査読有)

(学会発表) (計 1 件)

- (1) 水野理介、一色政志、西本光宏、藤田敏郎、堀正敏、尾崎博. 高食食負荷はマウス集合リンパ管の収縮頻度を増強する. 第 157 回日本獣医学会学術会議. 2014 年 9 月 9 日～12 日. 北海道大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 理介 (MIZUNO RISUKE)

東京大学大学院農学生命科学研究科

特任准教授

研究者番号: 30273080