

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06745

研究課題名（和文）心血管病におけるリンパ管新生療法の展開研究

研究課題名（英文）Translational research of lymphangiogenesis for cardiovascular diseases

研究代表者

清水 優樹 (Shimizu, Yuuki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90801887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：我が国でも乳がんをはじめとした術後のリンパ浮腫で悩まされる患者の存在は多く、これら癌に対しての手術療法の拡大やその後の生命予後の延長と共に、今後はさらに多くの方がリンパ浮腫を発症することが予想される。リンパ浮腫に対する対策は現在のところリンパマッサージや弾性ストッキングなどの理学療法が中心であり、有効な根本的治療は存在していない。従って、本研究の目的は、マウスリンパ浮腫モデルを用いて、難治性リンパ浮腫に対する新規リンパ管新生療法の開発とその分子メカニズムを明らかにすることであり、本助成期間においては「硫化水素を用いたリンパ浮腫に対する治療的リンパ管新生」に着目して、その可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管病に対してリンパ管新生を調節することを標的とした、いわゆる「治療的リンパ管新生」研究を進めていく事により、これまで有効な治療法が存在しなかった難治性心血管病に対する別の角度からの病態の解明と理解（学術的意義）、および新たなアプローチによる新規治療法の開発につながる（社会的意義）。本研究により、「硫化水素を用いたリンパ浮腫に対する治療的リンパ管新生」を小動物（哺乳類）において検証し、トランスレーショナルリサーチとしての成果を得ることができた。今後は本研究を発展させ、大型動物での検証、臨床導入への応用などが期待される。

研究成果の概要（英文）：Lymphedema is one of the serious clinical problems which can occur after surgical resection of malignant tumors such as breast cancer or intra-pelvic cancers. However, no effective treatment options exist at present. Diallyl trisulfide (DATS) is an organic polysulfide found in garlic oil and able to release H<sub>2</sub>S through interactions with biological thiols, including glutathione. So, DATS can act as a H<sub>2</sub>S donor. Previously we reported that DATS can promote angiogenesis in hind limb ischemia. However, it is currently unknown whether H<sub>2</sub>S can augment lymphangiogenesis and improve lymphedema.

In a present project, our data documented that DATS functions as a novel regulator of lymphatic-vascular responses to lymphedema and importantly, therapeutic approaches aimed at augmenting exogenous H<sub>2</sub>S using H<sub>2</sub>S-releasing agents could be potentially useful for treating secondary lymphedema.

研究分野：血管生物学

キーワード：リンパ管新生 2次性リンパ浮腫 硫化水素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 我が国でも乳がんをはじめとした術後の2次性リンパ浮腫で悩まされる患者の存在は多く、手術による根治療法の拡大や生命予後の延長と共に、今後はさらに多くの方が発症することが予想される。
- (2) これらリンパ浮腫に対する対策は、現在のところリンパマッサージや弾性ストッキングなどの理学療法が中心であり、有効な根本的治療は存在していない。
- (3) 難治性リンパ浮腫に対する「新規治療法の開発」が求められている。
- (4) 硫化水素は、一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)と同様に体内に微量に存在し、生体内では生理的にも病理的にも作用を有する重要な分子であることが近年知られつつあり、第3のガス伝達物質として注目されている。
- (5) 心疾患あるいは血管病において硫化水素は血管新生を促し、保護的役割を果たすということに関してはこれまでの我々の報告を含めて、いくつもの報告がある一方、硫化水素が“リンパ管新生”を調節するのか否かに関する知見は皆無である。

### 2. 研究の目的

#### (1) 硫化水素によるリンパ管形成促進効果の検討:

本研究において、発生学的にも性質的にも血管内皮細胞と類似する「リンパ管内皮細胞」に着目し、硫化水素がリンパ管内皮細胞に対して直接的にリンパ管形成を促す作用を有するか否かを検討することを目的とした。

#### (2) 「硫化水素を用いたリンパ浮腫に対する治療的リンパ管新生」の開発:

有効かつ根治療法のない難治性2次性リンパ浮腫に対する新規療法の開発を目的とした。研究代表者が開発を目指している「リンパ管新生療法」とは、分断されたリンパ管ネットワークを再構築して、リンパ管機能を再生させるものであり、その治療コンセプトからは根本的治療が期待できる治療と言える。

### 3. 研究の方法

(1) 今回、治療標的とする硫化水素は、気体(ガス)であり臨床応用として使用する際にはその保管や取り扱いが障害となることが予想されるが、本研究において、硫化水素を生体内で増加させる戦略としては“硫化水素ドナー”として知られるdiallyl trisulfide (DATS)を用いての治療開発に取り組んだ。これまで、研究代表者は、DATSを用いてマウス虚血肢モデルでの血管新生促進効果と血流回復効果を報告している。

(2) マウス尾部リンパ浮腫モデルを作成し、生理食塩水(コントロール)投与群あるいはDATS(硫化水素ドナー)投与群(各群n=10)の2群に無作為に割り付けた。DATS投与の濃度及び方法は既存の他の疾患モデルで報告されたプロトコルを参考に、リンパ浮腫作成1日目より1回/日の頻度で術後10日目まで腹腔内投与し、その後、①尾部直径の計測、②局所から得られた凍結切片を免疫染色(LYVE1, Podoplanin)による新生リンパ管の数、をそれぞれ経時的に評価(第1、3、7、14、28病日)することによ

り、DATSがリンパ管新生促進作用を有するか否かを検討した。また、さらには局所の炎症細胞の集積についても免疫染色(F4/80)を用いて評価検討した。

(3) vitroの実験で、リンパ管内皮細胞(Lymphatic endothelial cell: LEC)にDATS添加の有無がリンパ管形成能(増殖能:WST-1 proliferation assay、管腔形成能:Tube formation assay)を直接的に増強するか否かをそれぞれ評価した。また、その際に誘導される関連シグナルの有無をウェスタンブロットにて検討した。

(4) 内因性の硫化水素の発生に関与する主要酵素の一つであるcystathionine  $\gamma$ -lyase(CSE)遺伝子欠損マウスを用いて硫化水素の機能低下時によるリンパ管新生への影響を検討する目的で、マウス尾部リンパ浮腫モデルを作成し、野生型マウスを対照群としてリンパ浮腫、新生リンパ管数などを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス尾部リンパ浮腫モデルを作成し、硫化水素ドナーであるdiallyl trisulfide (DATS)をマウスに投与すると、対照群に比して治療群では有意にリンパ浮腫の程度が軽減された(図1)。

(2) また、その際に局所のリンパ管新生を伴ってリンパ浮腫が改善していることを突き止めた(図2)。

図1. 尾部リンパ浮腫モデル

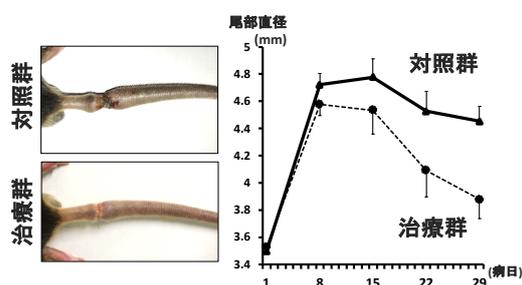
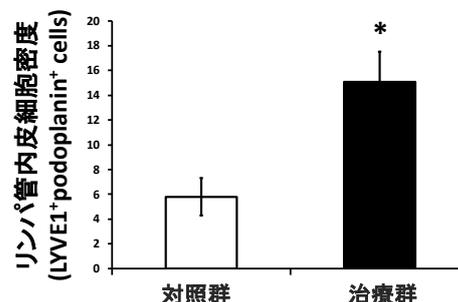


図2. 新生リンパ管数



(3) 第28病日においてリンパ浮腫組織部位では、対照群でリンパ管内腔の著明な拡大が観察されたが、治療群ではその拡張が改善していた( $p=0.00034$ )。また、同組織でマクロファージの浸潤は対照群では依然残存していたが、治療群では有意にそれらが改善していることが観察された( $p=0.00001$ )。これらの所見は、新生リンパ管が機能的に働き、末梢の組織リンパ液や炎症細胞のドレナージが行われたことが示唆された。

(4) これらの作用機序として、硫化水素による直接作用なのか否かを検討する目的で、リンパ管内皮細胞(LEC)を用いDATSを添加することにより、管腔形成能・増殖能を検討すると、容量依存性にそれらが増強することが明らかとなった。

また、その際の関連シグナル探索目的でウェスタンブロットを用いた検討において、LECにDATSを添加することにより、Akt、及びeNOSのリン酸化が容量依存的に増強することが判明した。今後は、シグナルの阻害実験などを追加することにより詳細な検討を行っていく予定である。

(5) 硫化水素の機能阻害実験(loss of functional study)として行ったノックアウトマウスを用いた検討では、体内硫化水素産生不全マウスにおいて、尾部リンパ浮腫モデルを作成すると、対照群と比してその

後のリンパ管新生が減弱し、リンパ浮腫が増悪することが示唆された。引き続き、同検証実験を積み重ねると共に、救済実験などを計画していく予定である。

以上の結果から、硫化水素はリンパ管新生を促し、リンパ浮腫疾患モデルにおいて治療的リンパ管新生につながる可能性が示唆された。

また、今回の研究から得られた成果をもとに、今後は引き続き中型動物などでも検証し、臨床導入を目指したトランスレーショナルリサーチに繋げていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

1. Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla KL, Pantner Y, Nicholson CK, Ishii M, Brunnhoelzl D, Mauria R, Husain A, Naqvi N, Murohara T, Calvert JW. Impact of Lymphangiogenesis on Cardiac Remodeling Following Ischemia and Reperfusion Injury. *J Am Heart Assoc.* Oct 2;7(19):e009565, 2018. (査読有り)
2. Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla KL, Nicholson CK, Koczor CA, Wang R, Lewis W, Shiva S, Lefer DJ, Calvert JW. Hydrogen sulfide regulates cardiac mitochondrial biogenesis via the activation of AMPK. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Mar;116:29-40. (査読有り)

[学会発表] (計 3件)

- ① 清水優樹、脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管再生療法、第17回フットケア学会年次学術集会(名古屋) 2019年
- ② 浦鐘月、清水優樹、室原豊明、Lymphangiogenesis Contributes to the Ischemia Induced Angiogenesis via Clearance of Inflammation in Hind Limb Ischemia、第83回日本循環器学会学術集会(横浜) 2019年
- ③ Yvanna Pantner, Yuuki Shimizu et al. , Inducing Expression of the Cleaved Form of DJ-1 Attenuates Ischemic-Induced Heart Failure, ISHR 2018年

[図書] (計 2件)

- ① 清水優樹、室原豊明、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ: 動脈硬化 UPDATE 2019年、p462-465 (総ページ数 120 頁)
- ② 近藤和久、林田竜、清水優樹、柴田玲、室原豊明、日本再生医療学会雑誌、再生医療 2017年、p333-339 (総ページ数 120 頁)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当せず。

(2)研究協力者

研究協力者氏名:室原 豊明

ローマ字氏名:(MUROHARA, toyoaki)

※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。