

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659119

研究課題名(和文)食塩感受性高血圧発症抑制マシナリーとして作用するリンパ管新生の役割解明と治療応用

研究課題名(英文)Lymphangiogenesis as a regulator of fluid homeostasis in pathological settings

研究代表者

馬嶋 正隆 (Majima, Masataka)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管は、細胞外液量の恒常性維持に重要な役割を果たす。本研究では、Na負荷に伴い皮膚でリンパ管が新生し、多くのNaを保持し、食塩感受性高血圧の発症に拮抗する役割を發揮する機構の存在を検証した。本研究では、特にプロスタグランジン(PG)に注目し、食塩負荷に伴ってPG依存性にリンパ管新生が誘導されるか否か、食塩感受性高血圧の発症を抑制するマシナリーとして意義があるか否かを、高血圧モデルを作成し検討したが、結果はネガティブであった。しかし、あわせて検討した腹膜炎モデルでは、PG依存性に腹膜炎に伴うリンパ管新生が腹水の回収を増強することが判明し、治療標的として意義が大きいことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We had tested the roles of an inducible prostaglandin E synthase, mPGES-1 in facilitation of inflammation-induced lymphangiogenesis (IL) elicited by lipopolysaccharide (LPS). With LPS i.p. injections, lymphatics in diaphragm were widened and Lyve-1-positive ladder-structured lymphatics were increased temporally in comparison with vehicle-treated wild type mice (WT). This increase of lymphangiogenesis was accompanied with increased expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C/D. In mPGES-1 knockout mice (KO), IL was suppressed with reduced expressions of VEGF-C/D. When FITC-dextran was injected into peritoneal cavities, the residual amount of FITC-dextran was reduced significantly in WT with LPS treatment. This reduction was significantly restored in mPGES-1 KO. These results suggested that mPGES-1 had significant roles in facilitation of lymphangiogenesis active in fluid drainage during IL, and that this enzyme will be a novel target for controlling IL.

研究分野：薬理学

キーワード：プロスタノイド リンパ管新生 ホメオスタシス 体液 高血圧 炎症 LPS COX-2

1. 研究開始当初の背景

高血圧は自覚症状を伴わず、突然、脳卒中や心筋梗塞を起こす例が少なくなく、しばしばサイレントキラーと呼ばれる。きちんと血圧をコントロールする、さらに発症を予防することが重要な生活習慣病の一つである。高血圧の多くは、原因が明らかでない本態性高血圧であり、両親から受け継いだ遺伝的素因が、生まれてから成長し、高齢化するまでの食事、ストレスなどの様々な環境因子によって修飾されて、高血圧を発生させると言われている。日本人の高血圧の多くは、食塩過剰摂取に伴って血圧が上昇するいわゆる食塩感受性高血圧である。我々は、20年以上にわたり、腎でのカリクレイン・キニン系が、食塩過剰摂取時に腎Na排泄を増大させ、安全弁のごとく機能することを報告してきた。さらに、腎でのカリクレイン・キニン系が脆弱であると、食塩過剰摂取時に体内にNaが貯留し、特に血圧維持のための興奮性の細胞、すなわち血管平滑筋や自律神経細胞等で細胞内Na濃度の増大を来し、細胞内ストアーからのCa動員の増強を介して、ノルアドレナリンやアンギオテンシンなどの昇圧物質に対する感受性が高まることを、キニン系欠損Brown Norway Katholiekラットを用いて明らかにしてきた。また、同様のメカニズムでプロスタグランジン(PG)が抗高血圧作用を発揮することも知られている。

一方、リンパ管は、免疫応答に加え、細胞外液量の恒常性維持に重要な役割を果たすが、最近になり、病態時に血管と同様に新生することが明らかにされ、リンパ管新生因子、がんやリンパ浮腫といった病態での役割につき解明が進められている。

食塩が過剰に摂取された場合でも、血中のNa、Cl濃度は厳密にコントロールされ、循環血液量および組織細胞外液量を増やす反応が起こる。特に腎からNa排泄能に問題がある場合は、結果として細胞内のNa濃度も増大してくる。最近、皮膚等のリンパ管に高濃度のNaが保持されるという説が提唱された。代表者らは、Na負荷に伴いリンパ管が新生し、多くのNaを保持し、食塩感受性高血圧の発症に拮抗する役割を発揮する機構の存在を着想した。すなわち、リンパ管新生が細胞内のNa濃度増大、血圧増加を緩衝し降圧に貢献することが想定される。

加えて、炎症時の血管透過性亢進に伴う滲出液の動態を胸膜炎モデルで長年解析してきた。あわせて腹膜炎モデルでの腹水の貯留とその制御因子についても解析をしてきた。炎症に伴ってリンパ管新生が増強されることを我々は最近報告している。以上の成果より、腹膜炎に伴うリンパ管新生が腹水の回収を制御することも容易に推定される。

2. 研究の目的

リンパ管は、細胞外液量の恒常性維持に重要な役割を果たす。本研究では、Na負荷に伴いリンパ管が新生し、多くのNaを保持し、食塩感受性高血圧の発症に拮抗する役割を発揮する機構の存在を検証する。すなわち、リンパ管新生が細胞内のNa濃度増大、血圧増加を緩衝し降圧に貢献する機構を調べる。本研究では、PGに注目し、

(1) 食塩負荷に伴ってリンパ管新生が誘導されるか否か、

(2) 食塩負荷を感知してリンパ管新生を引き起こす細胞・分子機構、

(3) リンパ管新生を制御することが、事実、食塩感受性高血圧の発症を抑制するマシナリーとして治療的意義があるか否かを、高血圧モデルを作成し解明する。

(4) あわせて、腹膜炎モデルで腹膜炎に伴うリンパ管新生が腹水の回収を制御するか否か調べる。

3. 研究の方法

C57/B16 マウスを用い、1-2%NaCl 含有食塩水あるいは4-8%NaCl 含有飼料でナトリウムを負荷し全身血圧の変動、皮膚ホールマウント試料を材料に、Lyve-1抗体でリンパ管を染色、リンパ管密度の評価を行った。

同じく、C57/B16 マウスを用い、大腸菌由来のLPSを25µg腹腔内に投与(1回/2日)し、横隔膜のホールマウント試料を作成し、Lyve-1抗体でリンパ管を染色、リンパ管密度の評価を行った。必要に応じ、リンパ管新生因子のreal time PCRでmRNAの定量的評価を行った。

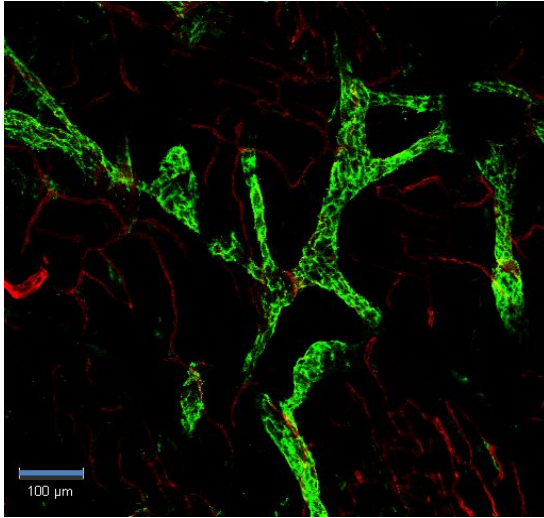
4. 研究成果

以下の研究成果が得られ、国際会議、国際誌に成果の発信を行った。

(1) 食塩負荷モデル

雄性野生型C57/B16マウス(8週令)に、1%および2%のNaClを含む蒸留水を飲用水としてNaCl負荷を行った(一般固形試料でその間飼育)。負荷後、1週間、2週間で全身血圧をtail cuffで測定したが、蒸留水の対照飼育雄性野生型C57/B16マウスのそれと有意な差はなかった。PE10カテーテルをNaCl負荷マウスに無麻酔無拘束下でindwellingして全身血圧をモニターしても、負荷後、1週間、2週間での全身血圧の増加は見られず、蒸留水の対照野生型マウスのそれと有意な差はなかった。4%および8%NaCl含有飼料でナトリウムを負荷して全身血圧の変動を同様に評価したが、0.2%の一般飼育用飼料で飼育した対照野生型マウスのそれと有意な差はなかった。

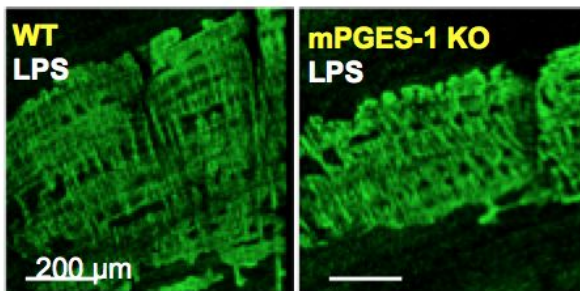
1%のNaClを含む蒸留水を飲用水として



NaCl 負荷を行った野生型マウスの皮膚組織サンプルを固定し、ホルマリン標本を作成、Lyve-1 抗体で毛細リンパ管を染色（付図は対照例でリンパ管は green に、血管は CD31 抗体で赤く染色される）したが、1%NaCl 負荷を行った野生型マウスの皮膚組織と蒸留水飼育の対照野生型マウスの染色像と有意な差はなかった。Lyve-1 陽性リンパ管密度でも両飼育群で有意な差はなかった。

(2) LPS 誘発腹膜炎モデル

LPS をマウス腹腔内に投与すると、横隔膜に梯子状のリンパ管が新生する（付図、green）。このリンパ管新生は、COX-2 阻害薬投与により抑制され、mPGES-1 ノックアウトマウスで抑制されていた（付図）。横隔膜組織に浸潤したマクロファージ、T 細胞が VEGF-C/D を産生していることが判明した。成果は、現在投稿中である。



PG 受容体欠損マウスで検討したところ、EP3 ノックアウトマウスに加え、意外にも TP ノックアウトマウスで LPS 投与後の横隔膜でのリンパ管新生が抑制されることが判明した。TP アゴニストでマクロファージ、T 細胞を *in vitro* で刺激すると VEGF-C/D を産生することが判明した。TP 受容体のリンパ管新生増強作用は全くの新知見である。TP の flox マウスの作成に取り組み成功した。今後、Cre マウスとの交配により、細胞特異的な TP の役割につき検討を行う予定にしている。

(3) 2 次性リンパ浮腫モデル

上記、LPS 誘発腹膜炎モデルの成果を受け、さらに追加で、2 次性リンパ浮腫モデルでのリンパ流およびリンパ管新生における PG の役割を評価した。

がん治療に伴う 2 次性のリンパ浮腫に悩む患者は多く、保存的な治療も精力的に試みられてはいるが、現在でも同病態の本質的な治療方策は乏しい。病態時のリンパ管新生を制御する生体内活性物質の解析と治療への応用研究の必要性は極めて大きい。

我々は、2 次性のリンパ浮腫をミミックするマウス尻尾基部皮下組織全周搔爬モデルを開発し、末梢に生じる浮腫を、尾部径を計測することで経時的に評価した。野生型のマウスでは、尾部径は搔爬後 2 週をピークに増大し、その後、尻尾創傷部分にリンパ管が新生すると急速に浮腫が減少した。リンパ管新生によるリンパ流の再疎通は、尾端部に FITC dextran を注入しリンパ管造影を行い、機能的なリンパ管新生を経時的に評価することで確認できる。このモデルで、COX-2 由来の内因性 PG がリンパ管新生増強作用を持つことが明らかになった。搔爬創傷部分で尻尾の横断面を Lyve-1 抗体で染色し、新生リンパ管を評価しても COX-2 依存性にリンパ管新生が生じていることが判明した。尻尾創傷部位で形成される肉芽組織の構成細胞を経時的に調べると、創傷作成後に主に増えてくるのはマクロファージであり、その多くは COX-2 発現細胞であった。*In vitro* でマクロファージを PGE₂ で刺激すると VEGF-C の産生量が劇的に増えた。2 次性リンパ浮腫に PG アナログが有効であることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

Amano H., Ito Y., Eshima K., Kato S., Ogawa F., Hosono K., Oba K., Tamaki H., Sakagami H., Shibuya M., Narumiya S., Majima M. Thromboxane A2 induces blood flow recovery via platelet adhesion to ischemic regions. *Cardiovascular Res.* 2015 DOI:10.1093/cvr/cvv139

Kamata M, Hosono K, Fujita T, Kamata K, Majima M. Role of cyclooxygenase-2 in the development of interstitial fibrosis in kidneys following unilateral ureteral obstruction in mice. *Biomed Pharmacother.* 2015 Mar;70:174-80. doi: 10.1016/j.biopha.2015.01.010. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25776498

Minamino T, Ito Y, Ohkubo H, Shimizu Y, Kojo K, Nishizawa N, Amano H, Narumiya S, Koizumi W, Majima M. Adhesion of platelets through thromboxane A2 receptor signaling facilitates liver repair during acute

- chemical-induced hepatotoxicity. *Life Sciences*. 2015 Apr 25. pii: S0024-3205(15)00172-1. doi: 10.1016/j.lfs.2015.03.015. [Epub ahead of print] PMID: 25921763
- Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Amano H, Shichiri M, Majima M. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- β 1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother*. 2014, Oct 31. pii: S0753-3322(14)00149-8. doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.020. [Epub ahead of print] PMID: 25677561.
- Oba K, Hosono K, Amano H, Okizaki S, Ito Y, Shichiri M, Majima M. Downregulation of the proangiogenic prostaglandin E receptor EP3 and reduced angiogenesis in a mouse model of diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2014 Oct;68(8):1125-33. doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.022. Epub 2014 Oct 31. PMID:25465154
- Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Tamaki H, Ogawa F, Iyoda A, Shibuya M, Kumagai Y, Satoh Y, Majima M. The role of vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling in compensatory contralateral lung growth following unilateral pneumonectomy. *Laboratory Investigation*. 2014 Feb 2. doi: 10.1038/labinvest.2014.159.
- Ogawa F, Amano H, Eshima Y, Ito Y, Matsui Y, Hosono K, Kitasato H, Iyoda A, Iwabuchi K, Kumagai Y, Satoh Y, Narumiyi S, Majima M. Prostanoid induces premetastatic niche in regional lymph nodes. *J. Clin. Invest*. 2014 Nov 3;124(11):4882-94. doi: 10.1172/JCI73530.
- Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, Eshima K, Kojo K, Okizaki S, Hirata M, Shibuya M, Watanabe M, Majima M. VEGFR1-positive macrophages facilitate liver repair and sinusoidal reconstruction after hepatic ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2014 Aug 27;9(8):e105533. doi: 10.1371/journal.pone.0105533. eCollection 2014. PMID: 25162491
- Kurashige C, Hosono K, Matsuda H, Tsujikawa K, Okamoto H, Majima M. Roles of receptor activity-modifying protein 1 in angiogenesis and lymphangiogenesis during skin wound healing in mice. *FASEB J*. 2014 Mar;28(3):1237-47. doi: 10.1096/fj.13-238998. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24308973
- Sato T, Amano H, Ito Y, Eshima K, Minamino T, Ae T, Katada C, Ohno T, Hosono K, Suzuki T, Shibuya M, Koizumi W, Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the up regulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1+ CXCR4+ cells recruited from bone marrow. *J Gastroenterol*. 2013 Aug 24. doi: 10.1007/s00535-013-0869-z. PMID: 23982810
- Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, Mishima T, Hirata M, Hosono K, Shibuya M, Yokomizo T, Shimizu T, Watanabe M, Majima M. Leukotriene B4 type-1 receptor signaling promotes liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury through the enhancement of macrophage recruitment. *FASEB J*. 2013 Aug;27(8):3132-43. doi: 10.1096/fj.13-227421. Epub 2013 Apr 29. PMID: 23629862
- Amano H, Ito Y, Ogawa F, Eshima K, Suzuki T, Oba K, Matsui Y, Kato S, Fukui T, Nakamura M, Kitasato H, Fukamizu A, Majima M. Angiotensin II type 1a signaling facilitates tumor metastasis formation through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. *Am J Pathol*. 2013 Feb;182(2):553-64. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.026.
- Fujita T, Ishihara K, Yasuda S, Nakamura T, Maeda M, Kobayashi M, Sahashi K, Ikeda Y, Kumagai Y, Majima M. In vivo kinetics of indoxyl sulfate in humans and its renal interaction with angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jun;341(3):626-33. doi: 10.1124/jpet.111.187732. Epub 2012 Mar 2. PMID: 22389425
- Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Suzuki T, Ogawa F, Iyoda A, Satoh Y, Kato S, Nakamura M, Kitasato H, Narumiya S, Majima M. Thromboxane A2 receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin mediated interaction of platelets with tumor cells and endothelial cells. *Cancer Sci*. 2012 Apr;103(4):700-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02200.x. Epub 2012 Feb 2. PMID: 22296266
- Minamino T, Ito Y, Ohkubo H, Hosono K, Suzuki T, Sato T, Ae T, Shibuya A, Sakagami H, Narumiya S, Koizumi W,

Majima M. Thromboxane A(2) receptor signaling promotes liver tissue repair after toxic injury through the enhancement of macrophage recruitment. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;259(1):104-14. doi: 10.1016/j.taap.2011.12.013.

Kashiwagi S, Hosono K, Suzuki T, Takeda A, Uchinuma E, Majima M. Role of COX-2 in lymphangiogenesis and restoration of lymphatic flow in secondary lymphedema. Lab Invest. 2012;91(9):1314-25. doi: 10.1038/labinvest.2011.84.

他、10件。全て査読あり。

〔学会発表〕(計67件)

M Majima, Roles of Arachidonic Acid Metabolites in Angiogenesis. Gordon Research Conference; Endothelial Cell Phenotypes in Health & Disease. 2014/7/6-11, Girona, Spain.

M Majima, Prostanoids as Regulators of Pathological Lymphangiogenesis. Gordon Research Conference; Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease. 2014/3/9-14, Lucca (Barga), Italy.

M Majima, Novel insights into sPLA2s in health and disease. The 16th GEM-10th GERLI meeting: from membranes to pathologies. 2013.11.11-14, Saint-Jean Cap Ferrat, France.

M Majima, Microsomal prostaglandin E synthase-1 as a regulator of angiogenesis. Gordon Research Conference; Angiogenesis. 2013/08/4-9, Newport, USA.

M Majima, Prostanoids regulate tumor stromal profiles via specific G-protein coupled receptors. 4th International conference on tumor-host interaction and Angiogenesis 2013/06/2-5, Ascona, Switzerland.

M Majima, Roles of thromboxane receptor signaling in enhancement of angiogenesis. 17th International Vascular Biology Meeting (IVBM) 2012 2012/6/2-5, Wiesbaden, Germany.

M Majima, Roles of prostaglandins in enhancement of angiogenesis and lymphangiogenesis during the developments of cancers and inflammation. Keystone Symposium: Inflammation during Carcinogenesis 2012/5/20-25, Dublin, Ireland.

M Majima, Roles of prostaglandins in enhancement of angiogenesis and lymphangiogenesis in pathological

conditions. Gordon Research Conference: Molecular Mechanisms in Lymphatic Functions & Disease 2012/3/4-9, Ventura, USA.

M Majima, Roles of prostaglandins in enhancement of angiogenesis and lymphangiogenesis in pathological conditions. Keystone Symposium: Angiogenesis. 2012/1/16-21, Snowbird, USA.

他、58件。

〔図書〕(計5件)

標準薬理学(第7版)飯野正光、鈴木秀典編、馬嶋正隆、23章免疫・炎症系、2015年3月、559-606頁。医学書院。

「最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用-」遺伝子医学MOOK 24号、馬嶋正隆、病態時の血管・リンパ管新生と脂質メディエーター、2013年5月、253-259頁。メディカルドウ社。

他、3件。

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬嶋 正隆 (MAJIMA, Masataka)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 70181641

(2) 研究分担者

北里 英郎 (KITASATO, Hidero)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 90195256