HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける低酸素誘導因子の影響に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	星野, 善允
Description	配架番号：2782
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15464号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90011
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HOSHINO_Yoshitada_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　星　野　善　允

学 位 論 文 題 名

マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける低酸素誘導因子の影響に関する研究
(Study of the effects of hypoxia inducible factor in a mouse hindlimb lymphedema model)

【背景と目的】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。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。

【材料と方法】第一章において，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-1α 安定化薬である Roxadustat(DMSO 中 25 mg/kg)を投与する実験群(n = 6)，HIF-1α 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。

第二章において，第一章と同様のマウス 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-1α；HIF-1α，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。

【結果】第一章において, 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($p < 0.01$)。創傷作成から 4 日時点での創傷閉鎖割合は，Sham ope 群(78.2±4.6 %)に対し，LE 群(34.8±3.0 %)，Roxadustat 投与群(50.0±1.6 %)， YC-1 投与群(22.8±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。

創傷作成から 7 日時点での創傷閉鎖割合は，Sham ope 群(96.5±2.1 %)に対し，LE 群 (67.8±3.1 %)，YC-1 投与群(53.6±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±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($p < 0.05$)。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 投与群は浮腫が増加していた。この傾向は創傷作成時から閉創時に至るまで認められた。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±9.0 μm 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($p < 0.05$)。

第二章において，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($p < 0.05$)。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低下し，この所見は手術後 2 週以降において有意であった($p < 0.05$)。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($p < 0.05$)。リンパ管内腔面積は，コントロール群(1,385±163 μm^2)に比べて Roxadustat 投与群(334±38 μm^2)で有意に小さかった($p < 0.05$)。また，HIF-1α、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)($p < 0.05$)。

【考察】第一章において, マウス後肢リンパ浮腫モデルに創傷を作成するための条件, 術式について検討した。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遷延し，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-1α 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-1α 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。

第二章において，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】第一章において， 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-1α 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。

第二章において， 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。