



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15464
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90050
Type	doctoral thesis
File Information	HOSHINO_Yoshitada.pdf



学 位 論 文

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)

2 0 2 3 年 3 月

北 海 道 大 学

星 野 善 允

Yoshitada Hoshino

学 位 論 文

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)

2 0 2 3 年 3 月

北 海 道 大 学

星 野 善 允

Yoshitada Hoshino

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第一章 創傷治癒モデルとしてのマウス後肢リンパ浮腫モデルの妥当性の検討	
緒言	9 頁
方法	11 頁
結果	15 頁
考察	21 頁
第二章 マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける低酸素誘導因子安定化薬の 影響の検討	
緒言	23 頁
方法	24 頁
結果	28 頁
考察	32 頁
総括および結論	35 頁
謝辞	37 頁
利益相反	38 頁
引用文献	39 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yoshitada Hoshino, Masayuki Osawa, Emi Funayama, Kosuke Ishikawa, Takahiro Miura, Masahiro Hojo, Yuhei Yamamoto, Taku Maeda
Therapeutic potential of the prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat in a mouse hindlimb lymphedema model
Lymphatic Research and Biology (2023 年 1 月 受理)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 星野善允, 石川耕資, 舟山恵美, 大澤昌之, 前田 拓, 山本有平
マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける創傷モデルの作製と低酸素応答因子・酸素環境の解析
第 30 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2021 年 10 月 7 日・東京
2. 星野善允, 石川耕資, 舟山恵美, 大澤昌之, 前田 拓, 山本有平
マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける低酸素ストレス応答の解析
第 42 回北大形成外科アカデミー, 2021 年 12 月 11 日・札幌

要旨

【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、創傷がし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-1 α 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 α 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-1 α ; HIF-1 α , 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 $\pm$ 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($78.2\pm4.6\%$)に対し、LE 群($34.8\pm3.0\%$), Roxadustat 投与群($50.0\pm1.6\%$), YC-1 投与群($22.8\pm3.2\%$)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($96.5\pm2.1\%$)に対し、LE 群($67.8\pm3.1\%$), YC-1 投与群($53.6\pm4.6\%$)はいずれも有意に減少した。また LE 群に対して Roxadustat 投与群($86.5\pm2.8\%$)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。この所見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 , $322\pm9.0\mu\text{m}$ 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($p<0.05$)。

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減弱し、この所見は手術後 2 週以降において有意であった ($p < 0.05$)。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 ($1,385 \pm 163 \mu\text{m}^2$) に比べて Roxadustat 投与群 ($334 \pm 38 \mu\text{m}^2$) で有意に小さかった ($p < 0.05$)。また、HIF-1 α , 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-1 α 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 α 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-1 α 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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA	analysis of variance
DMSO	dimethylsulfoxide
HE	hematoxylin and eosin
HIF	hypoxia inducible factor
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
HRE	hypoxia response element
ICG	indocyanine green
JPEG	Joint Photographic Experts Group
LE	lymphedema
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1
NDP	NanoZoomer Digital Pathology
PDE	photo dynamic eye
PHD	prolyl hydroxylase domain
Prox1	prospero homeobox protein 1
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
SEM	standard error of the mean
VEGF-C	vascular endothelial growth factor-C
VEGFR-3	vascular endothelial growth factor receptor-3
VHL	von Hippel-Lindau

緒言

【リンパ浮腫治療の現状】

リンパ浮腫は、リンパ液輸送能力の低下に起因し、局所的な間質液の蓄積、炎症、および結合組織の脂肪変性を特徴とする難治性の疾患である(Alitalo et al., 2005)。世界で約2億人が罹患しているとされ(Grada and Phillips, 2017)、固形癌治療において行われる所属リンパ節郭清手術の合併症としても重要である。症状として、痛み、疲労感、免疫低下による繰り返す感染症、創傷治癒の遅延などがあり、患者の日常生活動作を著しく低下させる。根治療法は存在せず、現在の治療は破壊されたリンパ系の再構築に焦点を当てたものは少なく、圧迫療法や徒手リンパドレナージなどの保存療法が中心となっている(Barufi et al., 2021; Dayan et al., 2018)。近年、外科的治療としてリンパ管静脈吻合術や、血管柄付きリンパ節移植術(Becker et al., 2006; Kong et al., 2022)などの有効性が報告されているが、いずれも手術適応は限られており、国際的に標準化された治療プロトコルは確立していない。

また、臨床においてリンパ浮腫患者は皮膚のバリア機能の低下により特に創傷ができやすく(Hettrick and Aviles, 2022)、さらに創傷治癒が遅延するため頻繁に蜂窩織炎などの合併を引き起こし、治療に難渋することが多い。リンパ液輸送機能が低下した状態では、浸透圧異常による細胞障害、免疫低下、感染、線維化など複雑な病態のもとに創傷治癒が遅延するとされ(Mallon and Ryan, 1994; Yoshida et al., 2019)、このような随伴症状の治療の観点からも、リンパ浮腫の有効な治療法の開発が望まれている。

【HIFについて】

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、酸素感受性HIF-1 α と構成的に発現するHIF-1 β サブユニットを含むヘテロ二量体構造である(Wang et al., 1995)。HIFの制御機構において重要な役割を持つサブユニットであるHIF-1 α は1992年にSemenzaらによって発見され(Semenza and Wang, 1992)、近年ではさらにその構造と制御機構の解明が進んでいる。

HIF-1 α は、正常酸素濃度下ではprolyl hydroxylase domain ; PHDによってプロリン残基が水酸化され、von Hippel-Lindau ; VHLタンパクによるユビキチン化を経て、プロテアソームにより速やかに分解される。しかし、低酸素下ではPHDによる水酸化が起こらないために、HIF-1 α は分解されることなく安定化し、HIF-1 β と結合して核内のhypoxia response element ; HREに結合することで様々な標的遺伝子を活性化する(Bruno et al., 2021)。標的遺伝子は非常に多岐にわたり、細胞増殖、血管やリンパ管新生、糖代

謝, 細胞外マトリックスの代謝, 鉄代謝, pH 調節, などに関する多くの遺伝子を転写活性化する(Semenza, 2003)。

【HIF の活性調整薬について】

① Roxadustat (HIF-1 α 安定化薬)

Roxadustat は, 低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素阻害薬であり, HIF-1 α の水酸化を阻害することで HIF-1 α の分解を抑制し, HIF-1 α の発現を安定化する作用を有する。本邦では 2019 年に慢性腎臓病による貧血の経口治療薬として承認され使用が開始された。その他, 動物実験において皮膚の創傷(Tang et al., 2018; Zhu et al., 2019), 心疾患(Deguchi et al., 2020), 網膜疾患(Liu et al., 2016), 脊髄損傷(Wu et al., 2016), パーキンソン病(Li et al., 2018), 悪性腫瘍(Koyama et al., 2017; Nishide et al., 2019)などに対して治療効果があることが報告されている。

② YC-1 (HIF-1 α 阻害薬)

YC-1 [3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzylindazole] は, 可溶性グアニリルシクラーゼを活性化して血小板凝集や血管収縮を抑制することから, もともと循環障害の治療薬として開発されたが(Galle et al., 1999; Teng et al., 1997), その後 HIF-1 α の活性を阻害する作用が発見され, 低酸素における標的薬として研究対象となっている。HIF-1 α の活性を阻害する機序は未だ不明な点もあるが, HIF-1 α の転写活性化領域を阻害することが分かっている(Huh et al., 2011; Li et al., 2008)。また, 肝癌, 子宮頸癌, 肺癌などの異なるヒト癌の異種移植モデルにおいて, HIF-1 α 発現の低下により血管新生を阻害し, 腫瘍成長を阻害することによる生存期間の延長効果(Yeo et al., 2003)や, 低酸素状態の肺がん細胞に対する放射線の抗腫瘍効果を増強することが報告されている(Ikezawa et al., 2017)。

【創傷と HIF の関連について】

創傷では, 血管の損傷および酸素需要の増加に伴い, 局所の組織は低酸素状態となる。相対的な低酸素状態は HIF の安定化をもたらす, 血管新生, 線維芽細胞の増殖と遊走, 炎症細胞のリクルート, 筋線維芽細胞の分化, 代謝リプログラミングなどの創傷治癒に関わる複数の段階で機能する(Ruthenborg et al., 2014)。これまでに, 薬剤による HIF-1 α の安定化が動物モデルの皮膚潰瘍および糖尿病動物モデルの難治性皮膚潰瘍の治癒を促進することが示されている(Tang et al., 2018; Zhu et al., 2019)。しかし, リンパ浮腫における難治性創傷に対して, 薬剤による HIF-1 α の安定化および阻害がどのような影響を与えるかについては, 渉猟した限り検討されていない。

【目的】

1. マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて創傷モデルを作製し，HIF の活性調整薬が創傷治癒に及ぼす影響を検討する。
2. マウス後肢リンパ浮腫モデルに HIF の活性調整薬を投与し，リンパ浮腫局所の形態・機能に与える影響を形態学的，組織学的，分子生物学的に検討する。

第一章

創傷治癒モデルとしてのマウス後肢リンパ浮腫モデルの妥当性の検討

1.1 緒言

1.1.1 背景

薬剤による HIF-1 α の安定化が、動物実験において皮膚潰瘍(Tang et al., 2018)や、糖尿病性潰瘍(Zhu et al., 2019)などに対して創傷治癒促進効果を発揮することが報告される中、リンパ浮腫における難治性潰瘍に対する HIF-1 α の活性調整薬の効果を検討した研究はない。

これまでに、リンパ浮腫の動物モデルは、ウサギの耳(Huang and Hsin, 1983)、マウスの尾部(Jiang et al., 2020; Zampell et al., 2012)、などで作製されてきたが、これらはリンパ節切除を伴わず、ヒトのリンパ浮腫に類似したモデルとは言えなかった。そのため、臨床に即したリンパ浮腫の動態を反映している動物モデルの開発が求められてきた(Frueh et al., 2016; Hadamitzky and Pabst, 2008)。リンパ機能の再構築を研究するための最も費用対効果の高いモデルは、リンパ節やリンパ管へのアクセスの容易さなどから、ラットの後肢(Wang and Zhong, 1985)などの齧歯類の肢にリンパ浮腫が作製されたものであるという報告があるが(Frueh et al., 2016)、ラットよりも試薬や研究ツールが豊富なマウスで検討することが、未だ病態が解明されていないリンパ浮腫の研究においては有効であると考えられる。

当教室ではこれまでに、より臨床に即したリンパ浮腫モデルの作製を目的に、世界初のリンパ節切除を行ったマウス後肢リンパ浮腫モデルとして、単径部に放射線を照射して浅リンパ管を処理し、同単径の皮膚を全周性に切除して深部のリンパ管を結紮し、膝窩リンパ節と単径リンパ節を切除し、皮膚に全周性のギャップができるよう単径切開部の皮膚縁を下床の筋肉に縫合固定する方法(Oashi et al., 2012)を報告した。このモデルは安定的にリンパ浮腫が持続するモデルであったが、放射線照射による骨髄抑制や、分子生物学的検討における影響が懸念されたため、その改良版として、単径の皮膚を全周性に切除し、単径リンパ節を周囲の脂肪組織を含めて切除し、膝窩リンパ節の前後のリンパ管を結紮後に、膝窩リンパ節を周囲の脂肪組織を含めて切除し、シリコンシートを単径切開部の皮膚間に下床の筋肉と縫合固定するという放射線照射を用いない方法(Iwasaki et al., 2017)を開発した。後者のリンパ浮腫モデルは、ヒトに近いリンパ浮腫を模倣しており、放射線の影響を考慮しなくて良いため、従来のモデルよりも創傷治癒における研究および、分子生物学的研究に適していると考えられる。

これまでに、動物のリンパ浮腫モデルにおける創傷治癒を詳細に研究したものはなく、本モデルを使用してリンパ浮腫における創傷モデルを作製し、評価することが妥当であるか検討し、さらに低酸素誘導因子調整薬剤がリンパ浮腫における創傷治癒に及ぼす影響を検討することとした。

1.1.2 目的

マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて創傷モデルを作製し、HIFの活性調整薬が創傷治癒に及ぼす影響を検討する。

1.2 方法

1.2.1 動物実験計画

本研究は、動物実験計画「HIF-1 α 調整薬剤による慢性創傷における影響の解明および治療効果の検証」(承認番号 20-0147)の一研究として行った。「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、その他関係法令等に基づき、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」(平成 19 年 4 月 1 日海大達第 61 号)に従って研究を遂行した。

1.2.2 動物実験施設

本研究は、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて行った。マウスの飼育は、3 階小動物飼育実験エリアの小動物飼育室にて 12 時間明暗サイクルの人工蛍光管理、固形飼料および自動給水用ノズルによる標準飲食管理下に行った。動物実験は、3 階解析実験エリアの共同生体試料解析室 2 にて行った。

1.2.3 使用動物・機器・試薬

雄の C57BL/6N マウス(ブリーダー：Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan；販売：Sankyo Labo Service Corporation, Inc., Sapporo, Japan)を 7-9 週齢で購入した。馴化のため入舎後 1 週間の予備飼育期間を設け、8-10 週齢で実験に用いた。

全ての処置・手術は、実験動物麻酔装置(Laboratory Animal Anesthesia System; Shinano Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、イソフルラン(Forane[®] Inhalant Liquid; AbbVie Inc., Tokyo, Japan)2.5%吸入による全身麻酔下に行った。手術の 1 日前、サージカルクリッパー(3M Surgical Clipper; 3M Health Care, Borken, Germany)およびチオグリコール酸を含む除毛フォーム(Ask Hair Remove; Manet Co., Tokyo, Japan)を用いて、体毛を除毛した。

手術は、手術用顕微鏡(S100/OPMI[®] pico; Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen, Germany)を用いて、4 倍もしくは 10 倍の視野にて行った。縫合糸は、6-0 ナイロン糸(Crownjun Nylon Suture, Polyamide Monofilament Non-absorbable; Kono Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan)および 10-0 ナイロン糸(Keisei Medical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いた。

注射は、27 ゲージの注射針付シリンジ(Myjector, syringe with an injection needle, for insulin; Terumo, Tokyo, Japan)を用いて行った。単径・膝窩リンパ節を可視化するため、2%パテントブルー(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)溶液を用いた。HIF-1 α の調整薬剤として、Roxadustat(Selleck, Houston, TX, USA)、YC-1(Selleck, Houston, TX, USA)および dimethylsulfoxide；DMSO(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)を腹腔内注射に使用した。

写真は、デジタル一眼レフカメラ(EOS Kiss X8; Canon Inc., Tokyo, Japan)にマクロレンズ(EF 50 mm f/2.5 Compact Macro Lens, Canon Inc.)および接写専用ストロボ(Macro Ring Lite MR-14EX, Canon Inc.)を装着して撮影した。

組織スライドは、バーチャルスライドスキャナ(NanoZoomer S210, Hamamatsu Photonics K.K.)を用いてスキャンした。デジタルデータは、パーソナルコンピュータ(MacBook Pro, 15-inch, 2016, version 11.6.4; Apple Inc., Cupertino, CA, USA)を用いて、画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology (NDP).view2 (Hamamatsu Photonics K.K.)上で観察した。

1.2.4 予備実験

1.2.4.1 マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製

当教室が報告したマウス後肢リンパ浮腫モデル(Iwasaki et al., 2017)の作製法に従い、マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製を行った。マイクロサージャリーを含む手技であり、ある程度の習熟を要すると予想されたため、再現性のあるモデル作製のために、マウス3匹を使用し、①除毛方法、②術中体位、③兎径の皮膚切開と皮下剥離の範囲、④膝窩・兎径リンパ節、リンパ管の同定法、の項目につき予備実験を行った。

1.2.4.2 皮膚潰瘍の作成

マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製を行ったのち、後肢浮腫部位に創傷を作成するため、マウス9匹を用いて①潰瘍のサイズおよび部位、②潰瘍作成のタイミング、の項目につき、予備実験を行った。

【実験1】

マウス3匹を用いて、リンパ浮腫作製後4日目にデルマパンチ(生検トレパン; Kai Industries, Seki, Japan)を用いて、直径6 mmおよび8 mmの皮膚全層欠損創をリンパ浮腫が生じた左後肢外側部に1ヵ所作成した。

【実験2】

マウス2匹を用いて、リンパ浮腫作製後4日目にデルマパンチを用いて、直径8 mmの皮膚全層欠損創を左後肢外側部スプリント固定部から6 mm末梢側の部位に1ヵ所作成した。

【実験3】

マウス4匹を用いて、リンパ浮腫作製術後4, 7, 10, 14日目にそれぞれデルマパンチを用いて、直径8 mmの皮膚全層欠損創を左後肢外側部スプリント固定部から6 mm末梢側の部位に1ヵ所作成した。

1.2.5 本実験

1.2.5.1 実験計画

予備実験において、後肢リンパ浮腫モデル作製手技にある程度の習熟を要した。本実験では24匹のマウスを用いて後肢リンパ浮腫創傷モデルを18匹、また、左単径部の皮膚切開のみを行った Sham ope 群を6匹作製した。

1.2.5.2 モデル作製手技および薬剤投与

予備実験を参考に、マウス後肢リンパ浮腫モデルに皮膚全層欠損を作成するモデルを以下の方法で作製した。マウスを腹臥位とし、2%濃度のパテントブルー(Wako, Osaka, Japan)をマウスの後肢の左足蹠に皮内注射した。眼科用曲剪刀を用いて左単径を全周性に切開して、左膝窩リンパ節周囲まで皮下組織を愛護的に剥離し露出した。左膝窩リンパ節に流出入するリンパ管を10-0 ナイロンで結紮処理した後、左膝窩リンパ節と周囲の脂肪組織を一塊として摘出した。この際、摘出組織の周囲の神経・血管を損傷しないようにした。その後、仰臥位とし、左単径リンパ節と周囲の脂肪組織を摘出した。3mm幅の長方形型のシリコン製のスプリントを1mm厚のシリコンシート(Tigers Polymer, Osaka, Japan)を使用して作製した。作製したシリコンスプリントを左単径の皮膚と筋肉に6-0 ナイロンで縫合固定して後肢リンパ浮腫モデルを作製した。また、Sham ope 群として、左単径部に全周の皮膚切開のみを加えた群を作製した。

リンパ浮腫作製または皮膚切開手術後4日目に、デルマパンチを用いて左後肢のシリコンスプリントから6mm離れた部位に直径8mmの皮膚全層欠損創を作成した。

上記で作製した後肢リンパ浮腫マウスを、Roxadustat (DMSO 中 25mg/kg) (Zhu et al., 2019)を投与する実験群 ($n=6$)、YC-1 (DMSO 中 30mg/kg) (Yeo et al., 2003)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。Sham ope 群 ($n=6$)には、同量の DMSO を手術日を含み2日ごとに腹腔内注射を最大2週間行った。

1.2.5.3 創傷閉鎖日数ならびに創傷閉鎖割合の評価

創傷を毎日観察し、閉創までの日数を記録した。また、0, 4, 7, 10, 14 日目に一眼レフカメラを用いて撮影した。創傷面積を ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して解析し、創傷閉鎖割合を以下の数式を用いて算定した。

$$\text{創傷閉鎖割合} = [1 - (\text{残存潰瘍面積} / \text{初期潰瘍面積})] \times 100\%$$

1.2.5.4 組織学的検討

リンパ浮腫作製手術後 4 日目に、麻酔下に創傷を作成する際に切除した左大腿部のリンパ浮腫部の皮膚を、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)に浸漬して固定した。

【パラフィン包埋・薄切】

自動包埋装置(Excelsior™ ES, Thermo Fisher Scientific)を用いて、以下の方法でパラフィン包埋組織標本を作製した。アルコール(80% 30 分, 95% 45 分, 100% 60 分・60 分・75 分・90 分・120 分)で脱水, キシレン(60 分・90 分・90 分)で透徹, パラフィン(60 分・90 分・90 分)で包埋した。

滑走式ミクロトーム(Retortome; Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Asaka, Saitama, Japan)を用いて、パラフィン包埋組織標本を切片厚 4 μm に薄切し、以下の手順で Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行った。

【HE 染色】

キシレン I・II (2 層各 5 分), エタノール(100%, 95%, 80%, 70%各 3 分)で脱パラフィン後, 流水水洗した。ティッシュ・テック 2 倍カラッツツィヘマトキシリン(Sakura Finetek Co., Ltd.)に 7 分浸し, 流水水洗を 10 分行った。1%塩酸 70%エタノールで分別を 30 秒行い, 流水水洗後, 1%エオシン Y 液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan)に 2 分浸した。1~2 秒水洗後, エタノール(70% 20 秒)で分別, エタノール(100% 1 分, 100% 3 分, 100% 3 分)で脱水, キシレン I・II・III (3 層各 5 分)で透徹した。標本用封入剤 NEW M・X (Matsunami Glass Industry, Ltd., Kishiwada, Osaka, Japan)を用いて封入した。

【浮腫組織の皮膚厚の測定】

HE 染色したスライド切片において皮膚の厚さを測定して、浮腫の程度を評価した(各群 $n=6$)。表皮から真皮と脂肪の境界部位までの距離を画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology (NDP).view2 上で観察して測定した。

1.2.5.5 統計学的検討

統計解析には、統計ソフトウェア JMP(ver.16.0.0 ; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)を用いた。多群間の検定では、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。

1.3 結果

1.3.1 予備実験

1.3.1.1 マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製

1.3.1.1.1 除毛の範囲，タイミング

除毛の範囲は，左単径皮膚切開から頭側に皮下剥離するため，両側下半身全体に行い，単径リンパ節の位置する下腹部まで除毛する方法が有用であった。除毛のタイミングは，泡状の除毛剤が液状化した状態で用いた際，除毛翌日に皮膚障害が発生した($n=1$)ため，本実験では除毛フォームが液状化していないことを確認し，手術前日に除毛を行い，手術当日に皮膚障害がないことを確認した後に実験を開始することにした。

1.3.1.1.2 体位

体位は，腹臥位(2%パテントブルー溶液注射，左膝窩リンパ節および周囲脂肪組織の切除)，仰臥位(左単径リンパ節および周囲脂肪組織の切除)，右側臥位(外側シリコンスプリントの固定)，仰臥位(内側シリコンスプリントの固定)の順に体位変換することが最も効率的であった。リンパ節および周囲脂肪組織切除，および顕微鏡を用いたリンパ管の処理の際に，術野を確保するため虫ピンで皮膚を固定した場合は，創縁の皮膚が挫滅するため，両側後肢をテープで下床に固定することにより，術野を確保しつつ後肢の皮膚に対して愛護的な手術操作が施行可能であった。

1.3.1.1.3 単径の皮膚切開と皮下剥離の範囲

単径部の創部から単径および膝窩リンパ節および周囲脂肪を切除するために皮下剥離する際，皮下の毛細血管を含む疎性結合組織を皮弁側につけない場合，術後4日目に表皮の壊死が認められた個体があった($n=1$) (図1)。本実験では，皮下の毛細血管を含む疎性結合組織を皮弁につけるように挙上することにした。



図1. 表皮壊死が認められた左後肢

1.3.1.1.4 膝窩・単径リンパ節の同定法

マウスのリンパ流として、腹部・外陰部から単径リンパ節に流入する経路と、後肢から膝窩リンパ節に流入する経路(Kawashima et al., 1964)を参考に、2%パテントブルー溶液 5 μ L を後肢の左足蹠に皮下注射することで、染色された膝窩リンパ節，輸入および輸出リンパ管を同定することが可能であった(図 2)。なお，単径リンパ節は染色されていなくても肉眼的に同定可能であった。

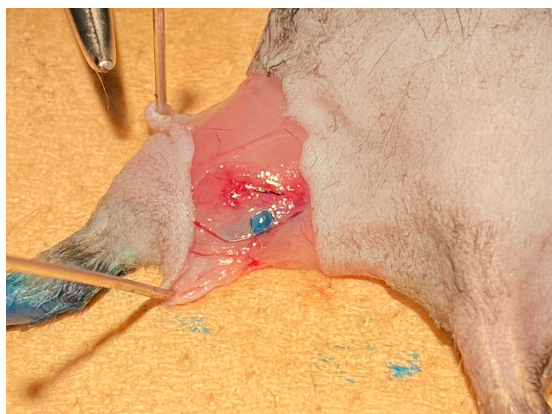


図 2. マウス後肢リンパ浮腫モデルのパテントブルーによる膝窩リンパ節の染色。

1.3.1.2 皮膚潰瘍の作成

1.3.1.2.1 皮膚潰瘍サイズの検討

リンパ浮腫を生じた大腿部に作成した 6mm 径の創部は 7 日，8mm 径の創部は 11 日で上皮化した。過去のマウス背部創傷モデルにおける報告(Takahashi et al., 2021)でも，上皮化までの期間が短い場合には創傷治癒期間に有意差が得られない可能性があるため，本実験では 8mm の創傷作成を行うことにした。また，創傷の部位がシリコンスプリントに近接した場合，治癒過程において鼠径部の切開創と連続して創部の評価が不可能となることがあった($n=1$) (図 3A)。スプリントから 6mm 離して皮膚欠損を作成することで，直径 8mm の創部が単径部の創部と連続することなく上皮化するまで評価可能であった(図 3B, C)。このため，本実験ではスプリントから 6mm 離して創傷を作成することとした。

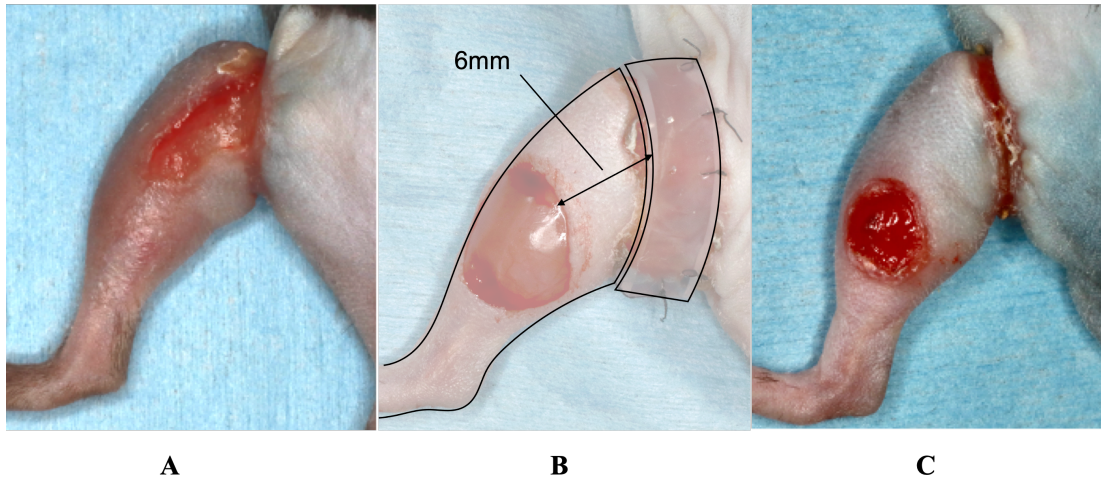


図 3. (A)後肢リンパ浮腫モデルに直径 8mm の創傷を作成後 7 日目の創部。(B)シリコンスプリントから 6mm 離して創傷を作成するデザイン。(C)シリコンスプリントから 6mm 離して直径 8mm の創傷を作成後 7 日目の創部。

1.3.1.2.2 皮膚潰瘍作成タイミングの検討

リンパ浮腫作製手術後 4, 7, 10, 14 日に作成した創傷は, それぞれ 12, 10, 7, 7 日で上皮化した。リンパ浮腫作製手術後 4 日目に創傷を作成したものが最も上皮化にかかる日数が遷延した。この結果より, 本実験においてもリンパ浮腫作製後 4 日目に潰瘍を作成することとした。

1.3.2 本実験

1.3.2.1 モデル作製手技

全てのマウスが創離開などの術後合併症なく, 術後 3 週で安楽死させるまで生存した。マウス後肢リンパ浮腫モデル作製の手術時間は, 一人で行って約 90 分を要した。手術操作を加えた範囲に解剖学的変異は認めなかった。

1.3.2.2 創傷閉鎖日数ならびに創傷閉鎖割合

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 4A, 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 4A, 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($86.5 \pm 2.8\%$)は有意に増加したが(* $p < 0.01$)、YC-1 投与群は有意に減少した(* $p < 0.05$) (図 4A, 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 投与群は浮腫が増加していた。この所見は創傷作成時から創傷閉鎖時まで認められた (図 4A)。

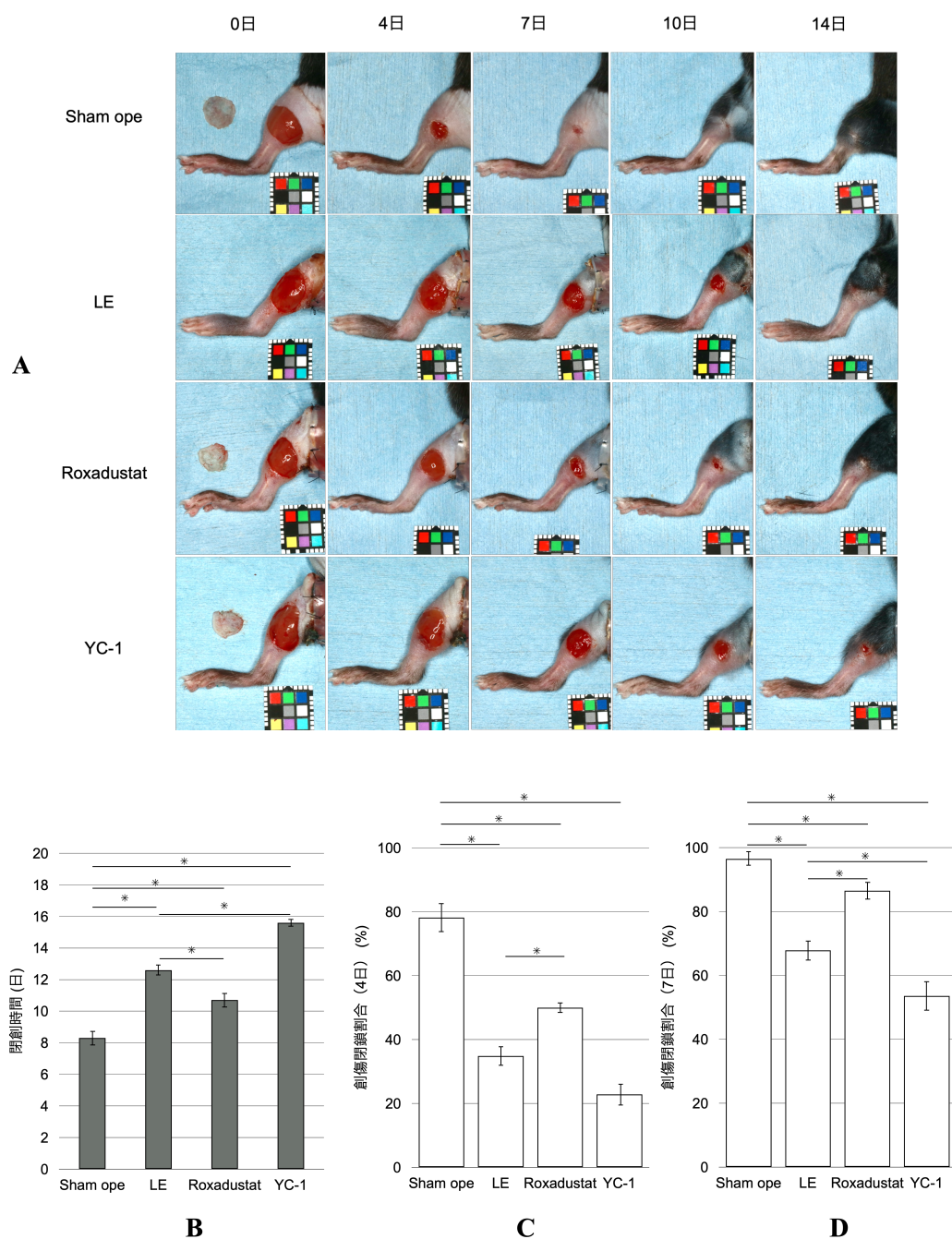


図 4.(A)創傷治癒の経過写真。LE 群に比して、Roxadustat 投与群は肉眼的に浮腫が改善し、YC-1 投与群は浮腫が増悪した。(B)各群の創傷閉鎖日数。Roxadustat 投与群が LE 群に比して有意に短縮し(* $p < 0.01$)、YC-1 投与群では有意に延長した(* $p < 0.01$)。error bar=SEM。(C)創傷作成から 4 日目の創傷閉鎖割合。LE 群に比して Roxadustat 投与群は有意に増加したが(* $p < 0.05$)、YC-1 投与群は有意差がなかった。error bar=SEM。(D)創傷作成から 7 日目の創傷閉鎖割合。LE 群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

1.3.2.4 浮腫組織のHE染色による組織学的検討と皮膚厚測定

リンパ浮腫作製手術後4日目において、各群で表皮から脂肪境界部までの距離(皮膚厚)に差があった(図5A)。Sham ope 群, LE 群, Roxadustat 群, YC-1 投与群の皮膚厚はそれぞれ, 203 ± 4.8 , 275 ± 4.3 , 208 ± 16.6 , $322 \pm 9.0 \mu\text{m}$ であった。Sham ope 群に比して, LE 群は皮膚厚が有意に増加した(* $p < 0.01$)。LE 群に比して, Roxadustat 投与群の皮膚厚は有意に減少し(* $p < 0.01$)、YC-1 投与群の皮膚厚は有意に増加した(* $p < 0.05$) (図5B)。

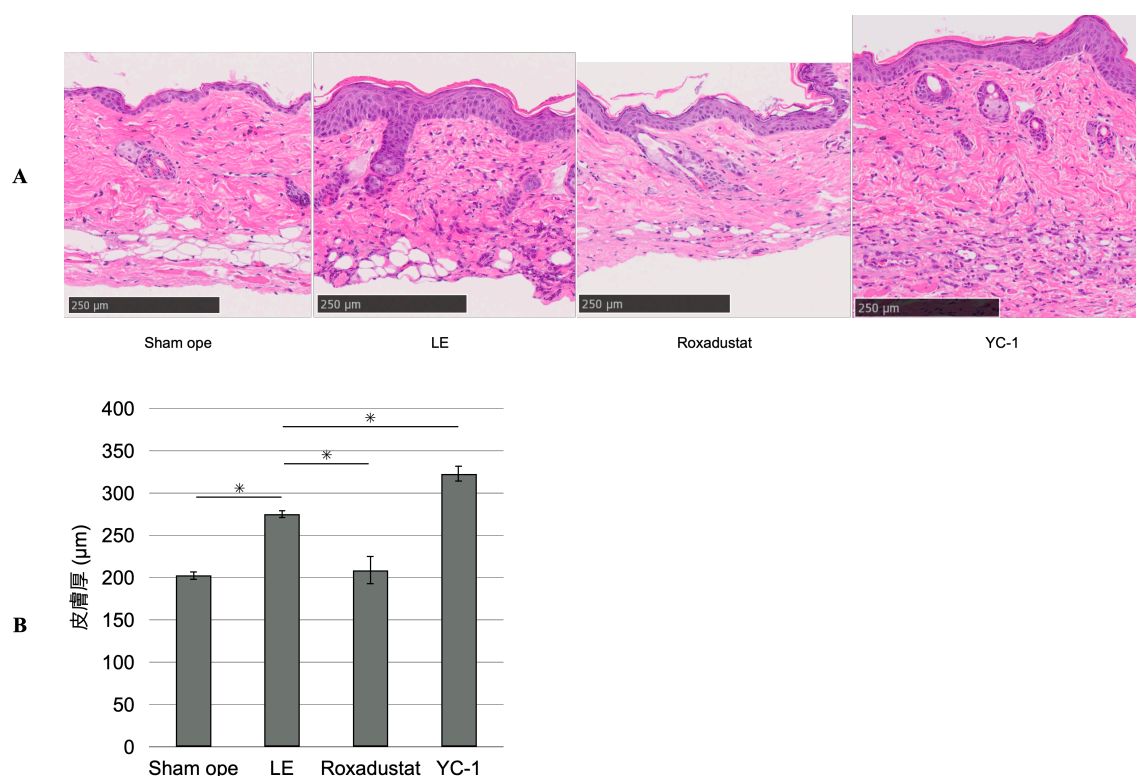


図5.(A) リンパ浮腫作製手術後4日目の各群の皮膚のHE染色像。scale bar=250μm。
(B) 各群の皮膚厚。Roxadustat 投与群が LE 群に比して有意に皮膚厚が減少し(* $p < 0.01$)、YC-1 投与群では有意に皮膚厚が増加した(* $p < 0.05$)。error bar=SEM。

1.4 考察

本研究はマウス後肢リンパ浮腫に創傷を作成し、リンパ浮腫モデルにおいて有意な創傷治癒遅延を確認した初めての報告である。

過去にも本研究と異なる方法でマウス後肢リンパ浮腫を作製し、皮膚全層欠損を作成して創傷治癒におけるリンパ流の動態を研究した報告があるが、リンパ浮腫による創傷治癒遅延はなかったとされている(Komatsu et al., 2017)。既報で用いられたモデルでは、マウス後肢リンパ浮腫を作製する際に単径リンパ節とその周囲組織のみを切除しており、膝窩リンパ節の切除を伴っていないことや、放射線照射やスプリントによる浅リンパ管の処理がないモデルであることから浮腫の持続時間が短く、創傷の直径が4mmであることから創傷治癒期間が比較的短いため、有意差が得られなかった可能性がある。

本実験で使用したマウス後肢リンパ浮腫モデルは、肉眼的浮腫が4日目をピークに1ヵ月程度持続し、蛍光リンパ管造影では半年間程度リンパ流のうっ滞が持続することが確認されている(Iwasaki et al., 2017)。本研究で作成した創傷の直径は8mmであり、予備実験において最も治癒が遅延したリンパ浮腫作製手術後4日目に創傷を作成したことで、さらに創傷治癒期間が延長し、リンパ浮腫組織における創傷治癒遅延を再現できたと考えられる。

また、上記で作製した創傷モデルに Roxadustat および YC-1 を投与した場合、それぞれ創傷治癒が促進および、遅延することが示された。同時に、リンパ浮腫モデル作製手術後4日目の創傷作成前の時点から創傷治癒に至る経過において、Roxadustat 投与群においては肉眼的な浮腫の改善と有意な皮膚厚の減少が認められ、YC-1 投与群は肉眼的な浮腫の増悪と有意な皮膚厚の増加が認められた。これまでに、リンパ浮腫において HIF 関連薬剤を使用した研究はほぼないが、尾部リンパ浮腫モデルにおいて YC-1 を投与すると、VEGF-C などのリンパ管新生因子の低下を伴って、浮腫が増悪するという報告があり(Zampell et al., 2012)、本研究の結果と矛盾しなかった。しかし、Roxadustat の浮腫に対する改善効果は本研究で得られた新しい知見であり、リンパ浮腫の薬剤治療の選択肢として更なる検討に値すると考えられた。

一方、本研究で得られた知見には検討すべき限界と重要な課題がある。第一に、後肢リンパ浮腫モデルは浮腫部皮下に間質液が貯留しており、間質液が創傷作成時に皮膚全層欠損を作成することによって漏出するため、リンパ浮腫における創傷の局所の解析において、分子生物学的な再現性が保たれない可能性がある。近年、実験動物におけるリンパ浮腫の寛解は、リンパ管新生によるものに加えて、リンパ管閉塞部位における間質内でのリンパ流の移動や、瘢痕の量などにも影響されると報告されている(Mendez et al., 2012; Ongstad et al., 2010; Uzarski et al., 2008)。本研究に使用した後肢リンパ浮

腫モデルにおいては、リンパ節郭清術後に左単径部にシリコンスプリントを留置して癒痕形成を促し、間質からのリンパ液の排水を減少させることで後肢のリンパ浮腫が持続する仕組みとなっており、スプリントを留置せずにリンパ浮腫を作製した場合は、皮膚、皮下組織におけるリンパ浮腫に関連した増殖因子の発現に再現性を認めなかった(Iwasaki et al., 2017)。

動物におけるリンパ浮腫モデルでは、浮腫が自然に寛解することが多いため(Frueh et al., 2016)、創傷による間質液の排出がリンパ浮腫の持続を阻害する可能性がある。故に、本創傷モデルは本来のマウス後肢リンパ浮腫モデルよりも、間質液の排出により早くリンパ浮腫が寛解する可能性があり、ヒトでよく見られる慢性浮腫における創傷の病態を反映するものではない可能性がある。

第二に、創傷閉鎖日数および創傷閉鎖割合は、浮腫の変化による影響が大きいと考えられた。マウスの創傷治癒ではヒトよりも創収縮が起こりやすく、肉芽増生や表皮形成が起きにくいという報告があり(Galiano et al., 2004)、周径変化による皮膚の伸縮が創部治癒に与える影響が大きいと予想される。

創傷治癒研究の次手として、各群の創傷治癒過程における創傷局所の組織を採取し、血管新生や線維化、その他創傷治癒因子の解析を考慮したが、これに先んじてリンパ浮腫組織自体に与える影響を解析する必要があると考えられた。

そこで第二章では、第一章で得られた **Roxadustat** による肉眼的浮腫の改善効果および皮膚厚の減少効果に着目し、後肢の周径およびリンパ流の経時的変化や、組織学的変化、分子生物学的変化など、**Roxadustat** がリンパ浮腫組織に与える影響を検討することにした。

第二章

マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける 低酸素誘導因子安定化薬の影響の検討

2.1 緒言

2.1.1 背景

第一章において、マウス後肢リンパ浮腫モデルに HIF-1 α の安定化薬である Roxadustat を投与することにより、浮腫後肢周径が肉眼的に改善し、皮膚厚が有意に減少した。

リンパ浮腫と低酸素誘導因子との関連を研究した報告は少ないが、マウス尾部リンパ浮腫においては、リンパ液のうっ滞と炎症が HIF-1 α を安定化させ、HIF-1 α の高発現をもたらし、これが修復性リンパ管形成に必要であることが示されている(Zampell et al., 2012)。また、HIF-1 α はリンパ管内皮細胞における VEGF-C と VEGFR-3 の発現を誘導し、リンパ管形成を促進することが報告されている(Han et al., 2019; Zampell et al., 2012)。さらに、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおける YC-1 による HIF-1 α の阻害は、VEGF-C などのリンパ管新生因子の減少を伴って浮腫を増悪させることが報告されており(Zampell et al., 2012)、HIF-1 α がリンパ浮腫の病態生理において重要な役割を担っていることが示唆されている。しかし、薬剤による HIF-1 α の安定化が、リンパ浮腫にどのような影響を与えるかについては、渉猟した限り検討されていない。

そこで、マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて Roxadustat が与える影響を、浮腫の後肢周径、リンパ流、リンパ管の形態、リンパ管新生因子の発現について評価することで、より詳細に検討することにした。

2.1.2 目的

マウス後肢リンパ浮腫モデルに HIF-1 α 安定化薬(Roxadustat)を投与し比較することで、リンパ浮腫局所の形態・機能に与える影響を形態学的、組織学的、分子生物学的に検討する。

2.2 方法

2.2.1 動物実験計画

36匹の後肢リンパ浮腫モデルマウスを作製し、以下の2群に分け、下記の方法で各群を比較した。各群はRoxadustat投与群($n=18$)、コントロール群($n=18$)とした。

2.2.2 動物モデルおよび薬剤投与

第一章と同様の方法でマウス後肢リンパ浮腫モデルを作製し、Roxadustat(DMSO中25 mg/kg)を投与する実験群と、コントロール群(DMSO)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。合計36匹のマウスを使用し、28日目(12匹は浮腫評価および蛍光リンパ管造影用)、7日目(12匹は組織学的検討用)、4日目(12匹はRNA単離用)にマウスを頸椎脱臼により安楽死させた。

2.2.3 後肢周径比の測定による浮腫の評価

後肢のリンパ浮腫の程度を、手術後0, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28日目に定量的に評価した(各群 $n=6$)。Yoshidaらの報告(Yoshida et al., 2015)を参考に、腓腹筋筋腱移行部(musculotendinous junction of the gastrocnemius muscle)をマーキングし、生食で濡らした3-0絹糸で半結紮した後に結紮部を切り、糸を透明のプラスチックテープ(3M, Minneapolis, MN, USA)に貼付し、長さを測定精度0.05mmのノギス(Shinwa Sokutei, Niigata, Japan)で計測した(図6)。各時点で周径を両側で測定し、周径比を以下のように算出した。

$$\text{周径比} = (\text{浮腫側の後肢周径} / \text{健側の後肢周径}) \times 100\%$$

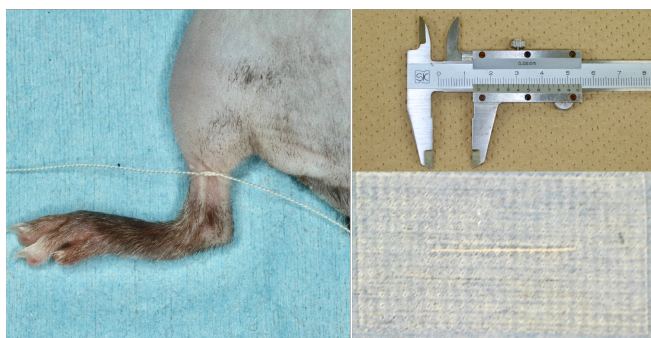


図6. 後肢周径の計測法。

2.2.4 蛍光リンパ管造影によるリンパ流の評価

リンパ流の評価のため、近赤外蛍光物質である indocyanine green (ICG; Diagnogreen® for Injection 25 mg; Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan ; 2.5 mg/mL in distilled water) および赤外観察カメラシステム (Photodynamic Eye, PDE; Hamamatsu Photonics K.K.) を用いた。PDE は赤外発光ダイオードから発する近赤外光によって、血管・リンパ管内で主にリポタンパクと結合した ICG を励起し、発せられた近赤外蛍光をハンディタイプのカメラユニットにより検出することで、モニタ上で ICG をリアルタイムに可視化する医療用機器である (Ishikawa et al., 2013; Marshall et al., 2010)。PDE はアシストアームシステム (ASSISTO® Holders and Clamp Sockets; GEOMED® Medizin-Technik GmbH & Co., Tuttlingen, Germany) によって、マウスの 20cm 上方に固定して用いた。

以上の装置を用いて、コントロール群と Roxadustat 投与群の後肢のリンパ構造を、手術後 4 週間にわたり 1 週間ごとに蛍光リンパ撮影により比較した (各群 $n=6$)。撮影前にマウスをイソフルランで麻酔し、残存毛を除去した。ICG 溶液 5 μ L を 27 ゲージ針で両足に皮下注入し、PDE を用いて ICG 溶液注入後 15 分時点において画像を取得した。リンパ浮腫においては、リンパ管から皮膚にリンパ液が逆流する現象である dermal backflow が生じるため、皮膚に逆流したリンパ液が蛍光により可視化される。可視化された蛍光領域の、後肢大腿部に占める面積の割合 (被覆率) を、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて以下の方法で計測した。得られた JPEG 画像において、半径のスプリント装着部遠位部から腓腹筋筋腱移行部までの範囲の外周を“Freehand selections”で囲んで後肢の大腿部領域を選択した (図 7A)。その後画像を 8bit グレースケールに変換した (図 7B)。この画像を用いて、“Threshold”コマンドにより、最小値 164, 最大値 255 の閾値設定で色を二値化した (図 7C)。“Analyze Particles”コマンドにより、Size 1-Infinity, Circularity 0.00-1.00 の設定で、%Area を計測した。

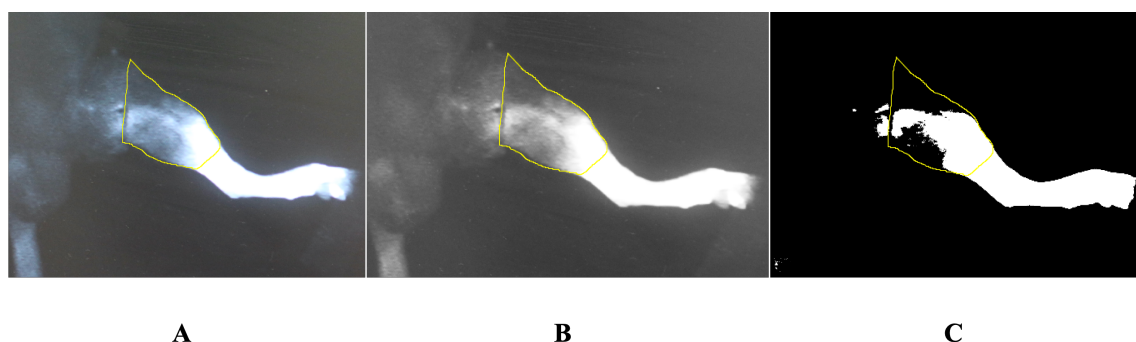


図 7. マウス後肢リンパ浮腫モデルの蛍光リンパ管造影画像。

(A) ImageJ を用いて大腿領域を選択後の画像。(B) ImageJ を用いて 8bit グレースケールに変換した画像。(C) ImageJ を用いて閾値を設定 (最小値 164, 最大値 255) し、二値化した画像。

2.2.5 免疫組織化学染色によるリンパ管形態の評価

各群 6 匹のマウスを手術後 7 日目に安楽死させた。創傷治癒による炎症の影響を最小限にするため、単徑部創傷の 6mm 遠位から皮膚切片を採取した。標本は 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。リンパ管内皮細胞の局在を確認するために、免疫組織化学染色を行った。一次抗体は、lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 ; LYVE-1 に対する抗体 (LYVE-1; Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA) を用いた。二次抗体は Histofine (Histofine MAX-PO Kit; Nichirei, Tokyo, Japan) を用い、3,3'-diaminobenzidine で処理した。スライドのデジタル画像はホールスライドスキャナー (NanoZoomer S210) で撮影し、NanoZoomer Digital Pathology (NDP).view2 で観察した。既報(Kato et al., 2005)に準じ、リンパ管は内皮に免疫陽性細胞が観察でき、かつ内腔を有するものと定義した。リンパ管は、プレパラートをランダム化した後、筆頭著者以外の 2 名の検者が同定し、両者が上記の条件でリンパ管と判定したものを評価に用いた。LYVE-1 で染色した切片を低倍率(40 倍)でスキャンし、最も多くのリンパ管を含む hot spot を同定した。各切片内の 5 つの hot spot を高倍率(200 倍)で測定し、各 hot spot 内のリンパ管の数を算出した。また、各 hot spot のリンパ管内腔の平均面積を ImageJ を用いて算出した。

2.2.6 Quantitative polymerase chain reaction ; qPCR によるリンパ管新生因子の発現の評価

2.2.6.1 RNA 抽出

RNA 抽出のために、各群から 6 匹のマウスを手術後 4 日目に安楽死させ、左後肢(単徑部創傷から 6mm 遠位の部位)から皮膚および皮下組織を採取して凍結保存した。凍結保存した組織は、Micro Smash MS-100 (TOMY, Tokyo, Japan) を使用して破碎した後、スピンカラム法にて total RNA を抽出した。ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐために DNase 処理を行った。一連の操作に用いた試薬は QIA shredder, RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, RNase-Free DNase Set (いずれも QIAGEN, Hilden, Germany) である。得られた RNA 濃度は分光光度計 (Nano Drop ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて測定した。

2.2.6.2 逆転写反応

1 μ g の total RNA から逆転写反応により cDNA を作成した。逆転写酵素として High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) による逆転写反応条件は 37°C・60 分, 95°C・5 分, 4°C・ ∞ とした。

2.2.6.3 qPCR

初期熱変性 95°C・10 分，熱変性 95°C・15 秒，アニーリング伸長反応 60°C・1 分×40 サイクルのプロトコールで qPCR を行った。PCR 装置は StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。cDNA 5μl および Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 10μl を含む total 20μl のリアクションミックスを用い，インターカレーション法により PCR 増幅産物生成量を測定し， $\Delta\Delta CT$ 法により解析した。内在性コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH を用いた。使用したプライマーを表 1 に示す。

表 1 (使用したプライマー)

Gene	Accession number	Primer sequences	Size (bp)
<i>Hif-1a</i>	NM_010431.2	MA216271-F: TGC GTGCATGTCTAATCTGTTC MA216271-R: AAGATTCTGACATGCCACATAGCTC	102
<i>VEGF-C</i>	NM_009506.2	MA241730-F: TGCTGCTGCACATTATAACACAGA MA241730-R: CGGACACACATGGAGGTTTAAAGA	149
<i>VEGFR-3</i>	NM_008029.3	MA227448-F: TGGGCGACAGGGTTCTCATA MA227448-R: GACATGGTGGCTCTGGTCTAACTC	85
<i>Prox1</i>	NM_008937.3	MA209433-F: AGCCAGTGTTTAATCTTTGCATCC MA209433-R: AACCATTTGCCTGCTCATTCC	145
<i>GAPDH</i>	NM_008084.3	MA050371-F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA MA050371-R: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	150

2.2.7 統計学的検討

統計解析には，統計ソフトウェア JMP(ver.16.0.0)を用いた。2 群間の差の比較には，t-test を用いた。複数の実験から得られた結果は平均±SEM で表した。 $P<0.05$ を有意差ありとした。

2.3 結果

2.3.1 モデル作製手技

全てのマウスが手術後、創部の壊死や離開などの合併症なく、手術後 4, 7, 28 日で安楽死させるまで生存した。本モデル作製の手術時間は約 80 分を要した。

2.3.2 後肢周径比の測定による浮腫の評価

Roxadustat 投与群およびコントロール群では、それぞれ手術後 21 日目および 28 日目に浮腫が肉眼的に消失した(図 8A)。後肢周径比は両群とも手術後 4 日で最大となり、その後 100%に漸近した。コントロール群では、当教室の先行研究(Iwasaki et al., 2017)と同様に手術後 28 日目に 100%に達したが、Roxadustat 投与群では手術後 21 日目に 100%に達した。手術後 2 日目から 24 日目において、Roxadustat 投与群ではコントロール群に比して周径比が有意に減少した(* $p < 0.05$) (図 8B)。

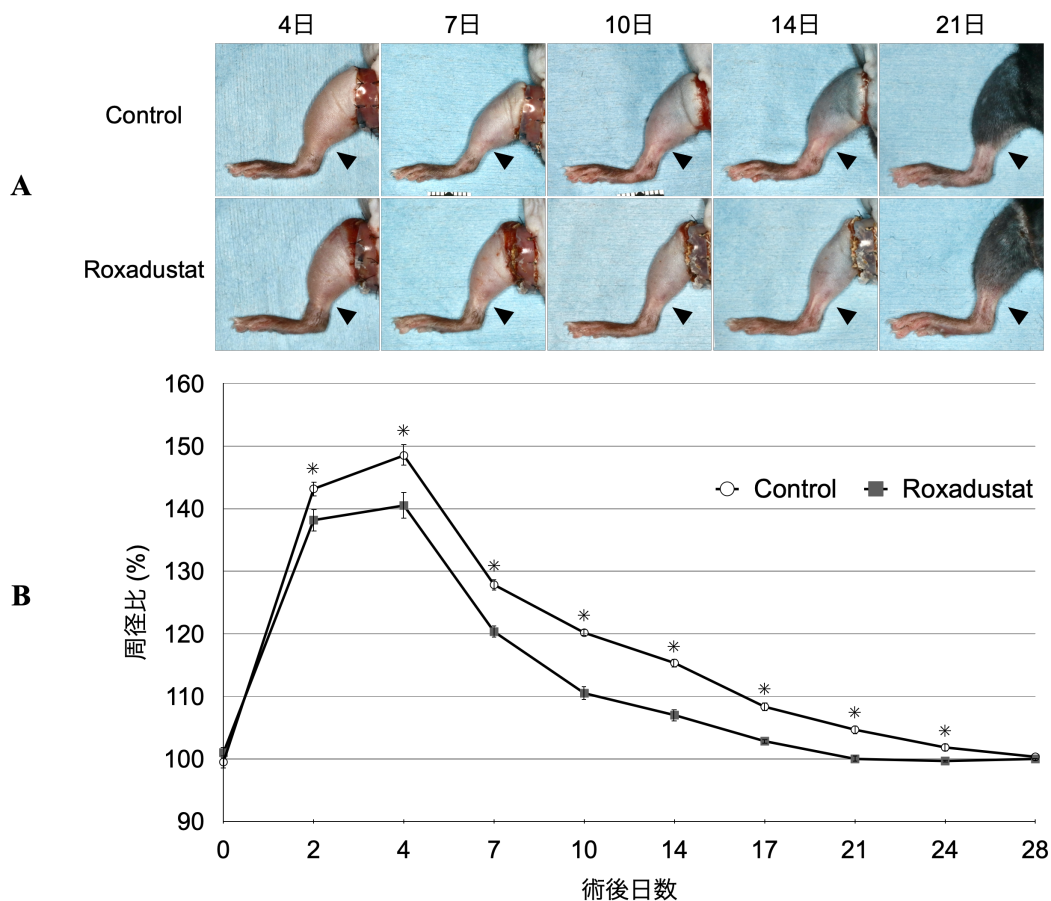


図 8. (A)両群のマウス後肢リンパ浮腫モデル。後肢周径は腓腹筋の筋腱接合部で測定した(黒矢じり)。(B)周径比の経時的評価。Roxadustat 投与群ではコントロール群に比して周径比が減少した。この所見は手術後 2 日目から 24 日目まで統計学的に有意であった(* $p < 0.05$)。error bar=SEM。

2.3.3 蛍光リンパ管造影によるリンパ流の評価

コントロール群では、手術後1週から4週まで浮腫側の後肢全体にびまん性の **dermal backflow** が認められた。一方、Roxadustat 投与群では **dermal backflow** が認められたが、コントロール群に比べ蛍光は減弱した(図 9A)。手術後 1, 2, 3, 4 週における蛍光領域の被覆率は、Roxadustat 投与群(それぞれ 70.2 ± 1.9 , 45.5 ± 5.9 , 49 ± 6.4 , $47.3 \pm 2.7\%$)でコントロール群(それぞれ 71.1 ± 3.9 , 67.6 ± 5.3 , 72.9 ± 5.8 , $72.5 \pm 7.1\%$)より低く、この所見は手術後2週以降で統計学的に有意であった(* $p < 0.05$) (図 9B)。

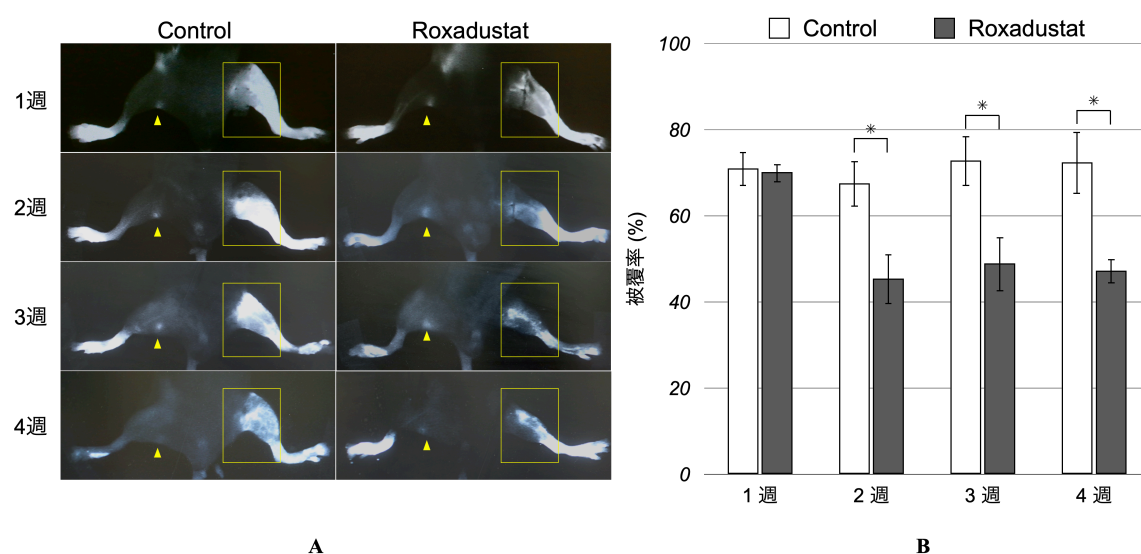


図 9. (A) 手術後 1 から 4 週目の各群の蛍光リンパ造影画像。リンパ浮腫を作製した左後肢では、どちらの群においても **dermal backflow** が広範囲に観察された(黄色の四角内)。Roxadustat 投与群では **dermal backflow** が観察されたが、コントロール群に比べ蛍光は減弱した。健側の後肢では、膝窩リンパ節(黄矢じり)が確認された。(B) 後肢浮腫部における蛍光領域の被覆率。手術後 2 週以降において、コントロール群に比して Roxadustat 投与群は有意に被覆率が減少した(* $p < 0.05$)。error bar=SEM。

2.3.4 免疫組織化学染色によるリンパ管形態の評価

手術後7日目の皮膚、皮下組織において、コントロール群に比べ、Roxadustat投与群ではリンパ管数が増加し(図10A, B), リンパ管内腔面積が減少した(図10A, C)。LYVE-1陽性リンパ管数は、コントロール群(5.2 ± 0.4)に比べ、Roxadustat投与群(8.5 ± 0.5)で有意に増加した(* $p < 0.05$) (図10B)。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、Roxadustat投与群($334 \pm 38 \mu\text{m}^2$)で有意に減少した(* $p < 0.05$) (図10C)。

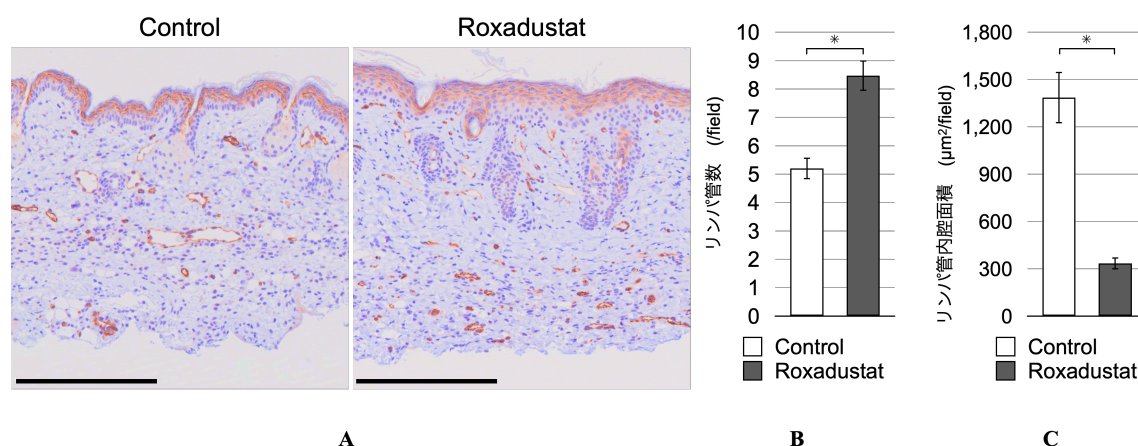


図10. (A)手術後7日目のコントロール群(左)およびRoxadustat投与群(右)におけるLYVE-1免疫組織化学染色。scale bar=250 μm 。(B)リンパ管数は、コントロール群に比してRoxadustat投与群で有意に増加した(* $p < 0.05$)。error bar=SEM。(C)リンパ管内腔面積は、コントロール群に比してRoxadustat投与群で有意に減少した(* $p < 0.05$)。error bar=SEM。

2.3.5 qPCRによるリンパ管新生因子の発現の評価

手術後4日目の皮膚、皮下組織において、HIF-1 α , VEGF-C, VEGFR-3, Prox1の相対mRNA発現量は、Roxadustat投与群ではコントロール群に比して有意に増加した(それぞれ 1.6 ± 0.2 , 4.3 ± 0.7 , 2.5 ± 0.3 , 2.8 ± 0.4) (* $p < 0.05$) (図11)。

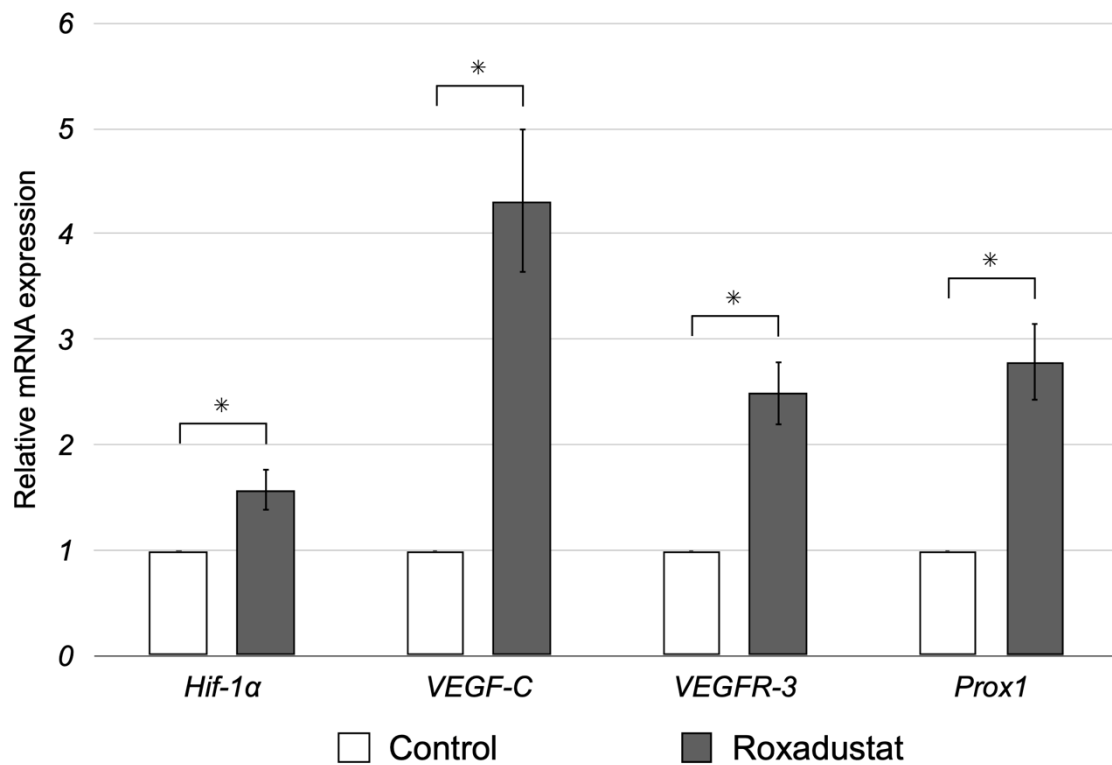


図 11. 皮膚および皮下組織のリアルタイム PCR 分析により，手術後 4 日目に HIF-1 α , VEGF-C, VEGFR-3, および Prox1 が，コントロール群に比して Roxadustat 投与群で有意に高いレベルで発現した (* $p < 0.05$)。error bar=SEM。

2.4 考察

本研究は、動物リンパ浮腫モデルに HIF-1 α 安定化薬である Roxadustat を投与し、浮腫の改善効果を検討した初めての報告である。

臨床におけるリンパ浮腫の重症度の指標として、皮膚の肥厚、皮下組織の腫脹、皮下組織の線維化、患肢の形状、炎症、運動機能などがある(International Society of Lymphology Executive Committee, 2020)。そこで、マウス後肢リンパ浮腫において評価可能な項目として、第一章で評価した肉眼的形態の観察および皮膚厚の評価に加えて、第二章では、後肢の周径およびリンパ流の評価、また組織学的検討としてリンパ管の形態、分子生物学的検討としてリンパ管新生因子の発現について評価した。

後肢リンパ浮腫の程度を評価するための後肢の体積・周径の定量法として、水置換法による体積計測(Shioya et al., 2016)、CT による体積測定(Wiinholt et al., 2020)、周径測定(Iwasaki et al., 2017)、健側との周径比の測定(Oashi et al., 2012)、などが報告されている。水置換法は測定誤差が大きく浮腫の評価に適さないという報告(Pan et al., 2006)があることや、CT を使用する方法は比較的長時間の鎮静が必要であるため、本研究では簡便かつ正確な計測法として、周径測定と健側比測定による浮腫の定量を行った。後肢リンパ浮腫の周径測定部位については、踵から 5mm または 6mm の位置での計測(Iwasaki et al., 2017; Oashi et al., 2012; Yoshida et al., 2015)などの報告があるが、本研究では各時点での解剖学的整合性を担保するために、過去の報告(Hayashida et al., 2017)を参考に腓腹筋の筋腱接合部で周径測定を行い、さらに個体差や実験期間中のマウスの成長を考慮し、健側との周径比を計測することで評価した。

本研究において、浮腫の程度を示す周径比は、コントロール群に比して Roxadustat 投与群で減少し、観察期間において有意に持続した。また、蛍光リンパ管造影によるリンパ流の評価では、コントロール群では手術後 4 週間にわたりリンパ流のうっ滞を示す dermal backflow が後肢全体にびまん性に残存していたのに対し、Roxadustat 投与群では 2 週以降に有意に蛍光を呈する領域の面積が減少していた。このことから、Roxadustat 投与群ではリンパ液のうっ滞が改善し、周径が減少することが示された。また、dermal backflow の程度と臨床的重症度には正の相関があると報告されており(Yamamoto et al., 2011)、本研究の結果はこの報告と矛盾しなかった。

組織学的には、リンパ浮腫の初期にリンパ管の拡張が報告されており(Weber et al., 2022)、マウス後肢リンパ浮腫モデルでの先行研究においても、皮膚および皮下のリンパ管の拡張を認めている(Iwasaki et al., 2017)。本研究では、Roxadustat 投与群ではコントロール群に比べて手術後 7 日目の皮膚および皮下のリンパ管数が有意に多く、その内腔面積が有意に小さいことが確認された。このことから、Roxadustat 投与群ではリン

パ管新生がコントロール群に比して顕著であり、リンパ液のうっ滞を示すリンパ管の拡張が改善することが示唆された。

Roxadustat は、HIF-1 α の発現を安定化する作用を有する新機序の薬剤であり、HIF は非常に多様な下流遺伝子に対する転写活性効果を持つため、様々な疾患治療の標的として注目されている。動物実験においては皮膚創傷治癒(Tang et al., 2018; Zhu et al., 2019), 心疾患(Deguchi et al., 2020), 網膜疾患(Liu et al., 2016), 脊髄損傷(Wu et al., 2016), パーキンソン病(Li et al., 2018), 悪性腫瘍増殖(Koyama et al., 2017; Nishide et al., 2019)などで治療効果が示されるなど、研究報告が相次いでいる。

HIF-1 α は、リンパ管内皮細胞の VEGF-C と VEGFR-3 の発現を誘導しリンパ管形成を促進する(Han et al., 2019; Zampell et al., 2012), また Prox1 の転写活性化により VEGFR-3 の発現を増加させることでリンパ管形成を促進する(Zhou et al., 2013)と報告されている。逆に、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて HIF-1 α を阻害すると VEGF-C の低下を伴い、浮腫が増悪することが報告されている(Zampell et al., 2012)。本研究においては、Roxadustat 投与群で HIF-1 α , VEGF-C, VEGFR-3, Prox1 の mRNA 発現が有意に上昇したことから、Roxadustat は HIF-1 α の発現を安定化し、VEGF-C, VEGFR-3, Prox1 などの発現上昇を介してリンパ管形成を促進した可能性があると考えられた。

VEGF-C はリンパ管形成における重要な制御因子であり、VEGFR-3 シグナルを介してリンパ管内皮細胞の分化、生存、移動など幅広いプロセスを制御している(Dayan et al., 2018)。そのため、過去にも VEGF-C を標的としてリンパ機能の改善を目指した研究がなされており、VEGF-C の局所投与またはアデノウイルスベクターによる遺伝子治療が、原発性および続発性リンパ浮腫の動物モデルにおいてリンパ管形成を促進し浮腫を軽減することが示されている(Baker et al., 2010; Hartiala and Saarikko, 2016)。しかし、VEGF-C 療法の臨床応用は、VEGF-C が腫瘍の微小環境の重要な制御因子として作用し、再発や転移のリスクを高める可能性があることから妨げられてきた(Brown et al., 2022; Dayan et al., 2018; Skobe et al., 2001)。

一方、Roxadustat は、非発がん性(Beck et al., 2017)であり、VEGF 感受性の自然発症乳がん動物モデルにおいても腫瘍の発生、進行、転移を促進しないことが報告されている(Seeley et al., 2017)。さらに、Roxadustat はマクロファージによる悪性腫瘍の貪食を促進することにより腫瘍の増殖を抑制する(Nishide et al., 2019), 悪性腫瘍モデルマウスにおいて化学療法に対する感受性を高め腫瘍増殖を抑制する(Koyama et al., 2017)などの抗腫瘍効果に関する報告もあることから、固形癌の手術後に生じるリンパ浮腫に対して有利な特性を有する可能性がある。また現在、非骨髄性悪性腫瘍の化学療法を受けている患者の貧血治療を対象とした第2相試験(NCT04076943)が進行中であり、悪性腫瘍に対する影響の報告が待たれる。

以上より第一章および第二章の結果をまとめると、Roxadustat は、マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて、リンパ管新生因子である VEGF-C, VEGFR-3, Prox1 の mRNA 発現およびリンパ管数を増加させ、皮膚厚の減少、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いる。また、Roxadustat はすでに慢性腎臓病による貧血の新規治療薬として薬事承認され使用されており、リンパ浮腫に対する臨床応用へ向けた治験のハードルは低いと考えられる。

本研究には、次に述べる限界がある。第一に、本研究で使用した後肢リンパ浮腫マウスモデルは、慢性リンパ浮腫モデルではなく、急性リンパ浮腫に近いモデルであることである。ヒトのリンパ浮腫は緩徐に進行し、自然には消退しないが、動物モデルではしばしば自然に消退する。本モデルでは、肉眼的な浮腫は約 1 ヶ月で消退する。したがって、このモデルは解剖学的にヒトのリンパ浮腫に近似しているが、病態の経過を含め、完全な模倣ではないことである。第二に、Roxadustat は、先述の通りいくつかの動物実験データから発癌性や癌促進性を示さないことが示されているが、本研究においても VEGF-C を含むリンパ管新生因子の増加を認めており、臨床場面における悪性腫瘍に対する安全性を確保するためには、基礎実験および臨床試験によるさらなる安全性の確認が必要である。

3 総括および結論

3.1 本研究から得られた新知見

第一章

- ・ マウス後肢リンパ浮腫モデルの後肢に創傷を作成するモデルを作製した。
- ・ マウス後肢リンパ浮腫モデルで作成した創傷は、Sham ope 群に作成した創傷に比して治癒が遅延した。
- ・ マウス後肢リンパ浮腫モデルで作成した創傷は Roxadustat および YC-1 の投与によりそれぞれ治癒が促進、遅延した。
- ・ マウス後肢リンパ浮腫モデルの肉眼的浮腫および皮膚厚が Roxadustat および YC-1 の投与により減少、増加した。

第二章

- ・ Roxadustat 投与により、マウス後肢リンパ浮腫モデルの後肢周径、リンパ流のうっ滞が改善した。
- ・ Roxadustat 投与により、マウス後肢リンパ浮腫モデルの後肢皮膚、皮下のリンパ管数が増加し、拡張したリンパ管内腔面積が減少した。
- ・ Roxadustat 投与により、リンパ管新生因子の mRNA 発現量が増加した。

3.2 新知見の意義

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は、創傷治癒遅延を再現できることが示された。また、作製したマウス後肢リンパ浮腫創傷モデルに対する HIF-1 α の活性調整薬の投与が、リンパ浮腫局所の肉眼的所見、皮膚厚に影響していることを示し、浮腫の変化が創傷治癒期間に影響している可能性が示唆された。特に、Roxadustat による浮腫の肉眼的改善および皮膚厚の減少は、リンパ浮腫に対する治療的效果として捉えることができると考えられた。

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、リンパ管新生因子である VEGF-C, VEGFR-3, Prox1 の mRNA 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いる。

3.3 今後の展開

まずは、リンパ浮腫における Roxadustat の作用機序のさらなる解明のため、*in vitro* においてリンパ管内皮細胞に対する Roxadustat の影響を検討する必要がある。具体的には、リンパ管内皮細胞を培養し、Roxadustat 添加群とコントロール群を作製し、リンパ管内皮細胞の増殖能、遊走能、管腔形成能などの評価を行い比較することで、より詳細な基礎的データを得ることができると予想される。また、リンパ浮腫はリンパ管機能不全に加えて、炎症、線維化などが関わる複雑な病態を有している。HIF-1 α はリンパ管新生のみならず多数の生理活性因子において作用するため、リンパ浮腫改善効果のさらなる機序の解明が望まれる。特に、最近では Roxadustat の腎線維化に対する改善効果(Zheng et al., 2022)、肺線維化に対する改善効果(Huang et al., 2020)などが報告されており、リンパ浮腫の慢性化に関わる病態である線維化に関して、効果や作用機序の解明が期待される。

3.4 今後の課題

本研究では HIF-1 α の安定化薬である Roxadustat が、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の増加とリンパ管数の増加を伴って後肢周径やリンパ流の改善効果、および皮膚厚の減少効果を発揮し、リンパ浮腫の新たな治療法となる可能性を示した。

臨床応用にむけた課題として、リンパ浮腫がリンパ節郭清手術のような癌治療の合併症である場合が多いことを考慮すると、腫瘍細胞が局所に残存している場合において、リンパ管新生因子が増加することの安全性の問題が懸念される。今後、安全性確立のため、本リンパ浮腫モデルに悪性腫瘍を移植したモデルを作製し、腫瘍の転移、増殖等に対する薬剤の効果を検討することが必要であると考えられる。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP20K09841 の助成を受けたものである。

本研究の全般において御指導，御助言をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・山本有平教授，舟山恵美准教授，大澤昌之先生，ならびに前田 拓先生，石川耕資先生，三浦隆洋先生に心より深謝申し上げます。

地方独立行政法人 埼玉県立病院機構 埼玉県立がんセンター 皮膚科・大芦孝平先生ならびに医療法人 徹慈会 形成外科・皮膚科 東手城クリニック 院長・岩寄大輔先生には，動物実験モデルの作製および研究方法につきまして的確な御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

また，病理組織学的検査および実験結果の解析において多大なるご協力をいただいた石川耕資先生ならびに北條正洋先生に，重ねて深く感謝申し上げます。

本研究の全般において温かい御支援をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・澤口恵美学術研究秘書に感謝申し上げます。

動物実験において施設の管理やマウスの飼育を行っていただいた北海道大学 大学院医学研究院 附属動物実験施設・土佐紀子先生ならびに技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。

免疫組織化学染色において多大なる御協力をいただいた株式会社モルフォテクノロジー・船山貴智代表取締役 に深く感謝申し上げます。

最後に，これまで北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室において研究に携わってこられた全ての皆様に心より感謝の意を表します。

(順不同)

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T.V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946-953.
- Baker, A., Kim, H., Semple, J.L., Dumont, D., Shoichet, M., Tobbia, D., and Johnston, M. (2010). Experimental assessment of pro-lymphangiogenic growth factors in the treatment of post-surgical lymphedema following lymphadenectomy. *Breast Cancer Res* 12, R70.
- Barufi, S., Pereira de Godoy, H.J., Pereira de Godoy, J.M., and Guerreiro Godoy, M.F. (2021). Exercising and Compression Mechanism in the Treatment of Lymphedema. *Cureus* 13, e16121.
- Beck, J., Henschel, C., Chou, J., Lin, A., and Del Balzo, U. (2017). Evaluation of the carcinogenic potential of roxadustat (FG-4592), a small molecule Inhibitor of hypoxia-Inducible factor prolyl hydroxylase in CD-1 mice and Sprague Dawley rats. *Int J Toxicol* 36, 427-439.
- Becker, C., Assouad, J., Riquet, M., and Hidden, G. (2006). Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 243, 313-315.
- Brown, S., Dayan, J.H., Coriddi, M., Campbell, A., Kuonqui, K., Shin, J., Park, H.J., Mehrara, B.J., and Kataru, R.P. (2022). Pharmacological treatment of secondary lymphedema. *Front Pharmacol* 13, 828513.
- Bruno, S., Mancini, M., De Santis, S., Monaldi, C., Cavo, M., and Soverini, S. (2021). The Role of Hypoxic Bone Marrow Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia and Future Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci* 22.
- Dayan, J.H., Ly, C.L., Kataru, R.P., and Mehrara, B.J. (2018). Lymphedema: Pathogenesis and novel therapies. *Annu Rev Med* 69, 263-276.
- Deguchi, H., Ikeda, M., Ide, T., Tadokoro, T., Ikeda, S., Okabe, K., Ishikita, A., Saku, K., Matsushima, S., and Tsutsui, H. (2020). Roxadustat markedly reduces myocardial ischemia reperfusion injury in mice. *Circ J* 84, 1028-1033.
- Frueh, F.S., Gousopoulos, E., Rezaeian, F., Menger, M.D., Lindenblatt, N., and Giovanoli, P. (2016). Animal models in surgical lymphedema research--a systematic review. *J Surg Res* 200, 208-220.
- Galiano, R.D., Michaels, J.t., Dobryansky, M., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 12, 485-492.

- Galle, J., Zabel, U., Hubner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C., and Schmidt, H.H. (1999). Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* 127, 195-203.
- Grada, A.A., and Phillips, T.J. (2017). Lymphedema: Pathophysiology and clinical manifestations. *J Am Acad Dermatol* 77, 1009-1020.
- Hadamitzky, C., and Pabst, R. (2008). Acquired lymphedema: an urgent need for adequate animal models. *Cancer Res* 68, 343-345.
- Han, T., Yan, J., Chen, H., Ji, Y., Chen, J., Cui, J., Shen, W., and Zou, J. (2019). HIF-1 α contributes to tube malformation of human lymphatic endothelial cells by upregulating VEGFR-3. *Int J Oncol* 54, 139-151.
- Hartiala, P., and Saarikko, A.M. (2016). Lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. *J Reconstr Microsurg* 32, 10-15.
- Hayashida, K., Yoshida, S., Yoshimoto, H., Fujioka, M., Saijo, H., Migita, K., Kumaya, M., and Akita, S. (2017). Adipose-derived stem cells and vascularized lymph node transfers successfully treat mouse hindlimb secondary lymphedema by early reconnection of the lymphatic system and lymphangiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 139, 639-651.
- Hettrick, H., and Aviles, F. (2022). All edema is lymphedema: progressing lymphedema and wound management to an integrated model of care. *Wound Manag Prev* 68, 8-15.
- Huang, G.K., and Hsin, Y.P. (1983). An experimental model for lymphedema in rabbit ear. *Microsurgery* 4, 236-242.
- Huang, H., Wang, X., Zhang, X., Wang, H., and Jiang, W. (2020). Roxadustat attenuates experimental pulmonary fibrosis in vitro and in vivo. *Toxicol Lett* 331, 112-121.
- Huh, J.W., Kim, S.Y., Lee, J.H., and Lee, Y.S. (2011). YC-1 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Pulm Pharmacol Ther* 24, 638-646.
- Ikezawa, Y., Sakakibara-Konishi, J., Mizugaki, H., Oizumi, S., and Nishimura, M. (2017). Inhibition of Notch and HIF enhances the antitumor effect of radiation in Notch expressing lung cancer. *Int J Clin Oncol* 22, 59-69.
- International Society of Lymphology Executive Committee (2020). The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema: 2020 Consensus Document of the International Society of Lymphology. *Lymphology* 53, 3-19.
- Ishikawa, K., Sasaki, S., Furukawa, H., Nagao, M., Iwasaki, D., Saito, N., and Yamamoto, Y. (2013). Preliminary experience with intraoperative near-infrared fluorescence imaging in percutaneous sclerotherapy of soft-tissue venous malformations.

- Dermatol Surg 39, 907-912.
- Iwasaki, D., Yamamoto, Y., Murao, N., Oyama, A., Funayama, E., and Furukawa, H. (2017). Establishment of an acquired lymphedema model in the mouse hindlimb: Technical refinement and molecular characteristics. *Plast Reconstr Surg* 139, 67e-78e.
- Jiang, X., Tian, W., Granucci, E.J., Tu, A.B., Kim, D., Dahms, P., Pasupneti, S., Peng, G., Kim, Y., Lim, A.H. et al. (2020). Decreased lymphatic HIF-2alpha accentuates lymphatic remodeling in lymphedema. *J Clin Invest* 130, 5562-5575.
- Kato, T., Prevo, R., Steers, G., Roberts, H., Leek, R.D., Kimura, T., Kameoka, S., Nishikawa, T., Kobayashi, M., Jackson, D.G. et al. (2005). A quantitative analysis of lymphatic vessels in human breast cancer; based on LYVE-1 immunoreactivity. *Br J Cancer* 93, 1168-1174.
- Kawashima, Y., Sugimura, M., Hwang, Y.C., and Kudo, N. (1964). The lymph system in mice. *Jap J Vet Res* 12, 69-78.
- Komatsu, E., Nakajima, Y., Mukai, K., Urai, T., Asano, K., Okuwa, M., Sugama, J., and Nakatani, T. (2017). Lymph Drainage During Wound Healing in a Hindlimb Lymphedema Mouse Model. *Lymphat Res Biol* 15, 32-38.
- Kong, X., Du, J., Du, X., Cong, X., and Zhao, Q. (2022). A meta-analysis of 37 studies on the effectiveness of microsurgical techniques for lymphedema. *Ann Vasc Surg*.
- Koyama, S., Matsunaga, S., Imanishi, M., Maekawa, Y., Kitano, H., Takeuchi, H., and Tomita, S. (2017). Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model. *Sci Rep* 7, 45621.
- Li, S.H., Shin, D.H., Chun, Y.S., Lee, M.K., Kim, M.S., and Park, J.W. (2008). A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{alpha}. *Mol Cancer Ther* 7, 3729-3738.
- Li, X., Cui, X.X., Chen, Y.J., Wu, T.T., Xu, H., Yin, H., and Wu, Y.C. (2018). Therapeutic potential of a prolyl hydroxylase Inhibitor FG-4592 for Parkinson's diseases in vitro and in vivo: Regulation of redox biology and mitochondrial function. *Front Aging Neurosci* 10, 121.
- Liu, H., Zhu, H., Li, T., Zhang, P., Wang, N., and Sun, X. (2016). Prolyl-4-hydroxylases inhibitor stabilizes HIF-1alpha and increases mitophagy to reduce cell death after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 1807-1815.
- Mallon, E.C., and Ryan, T.J. (1994). Lymphedema and wound healing. *Clin Dermatol* 12, 89-93.
- Marshall, M.V., Rasmussen, J.C., Tan, I.C., Aldrich, M.B., Adams, K.E., Wang, X., Fife,

- C.E., Maus, E.A., Smith, L.A., and Sevic-Muraca, E.M. (2010). Near-infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update. *Open Surg Oncol J* 2, 12-25.
- Mendez, U., Brown, E.M., Ongstad, E.L., Slis, J.R., and Goldman, J. (2012). Functional recovery of fluid drainage precedes lymphangiogenesis in acute murine foreleg lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H2250-2256.
- Nishide, S., Matsunaga, S., Shiota, M., Yamaguchi, T., Kitajima, S., Maekawa, Y., Takeda, N., Tomura, M., Uchida, J., Miura, K. et al. (2019). Controlling the phenotype of tumor-infiltrating macrophages via the PHD-HIF axis inhibits tumor growth in a mouse model. *iScience* 21, 205.
- Oashi, K., Furukawa, H., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Saito, A., and Yamamoto, Y. (2012). A new model of acquired lymphedema in the mouse hind limb: A preliminary report. *Ann Plast Surg* 69, 565-568.
- Ongstad, E.L., Bouta, E.M., Roberts, J.E., Uzarski, J.S., Gibbs, S.E., Sabel, M.S., Cimmino, V.M., Roberts, M.A., and Goldman, J. (2010). Lymphangiogenesis-independent resolution of experimental edema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H46-54.
- Pan, D., Han, J., Wilburn, P., and Rockson, S.G. (2006). Validation of a new technique for the quantitation of edema in the experimental setting. *Lymphat Res Biol* 4, 153-158.
- Ruthenborg, R.J., Ban, J.J., Wazir, A., Takeda, N., and Kim, J.W. (2014). Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells* 37, 637-643.
- Seeley, T.W., Sternlicht, M.D., Klaus, S.J., Neff, T.B., and Liu, D.Y. (2017). Induction of erythropoiesis by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors without promotion of tumor initiation, progression, or metastasis in a VEGF-sensitive model of spontaneous breast cancer. *Hypoxia (Auckl)* 5, 1-9.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447-5454.
- Shioya, R., Furukawa, H., Murao, N., Hayashi, T., Oyama, A., Funayama, E., Yamamoto, Y., and Saito, N. (2016). Prevention of lymphedematous change in the mouse hindlimb by nonvascularized lymph node transplantation. *Ann Plast Surg* 76, 442-445.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D.G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L.,

- Alitalo, K., Claffey, K., and Detmar, M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7, 192-198.
- Takahashi, H., Ohnishi, S., Yamamoto, Y., Hayashi, T., Murao, N., Osawa, M., Maeda, T., Ishikawa, K., Sakamoto, N., and Funayama, E. (2021). Topical Application of Conditioned Medium from Hypoxically Cultured Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Wound Healing in Diabetic Mice. *Plast Reconstr Surg* 147, 1342-1352.
- Tang, D., Zhang, J., Yan, T., Wei, J., Jiang, X., Zhang, D., Zhang, Q., Jia, J., and Huang, Y. (2018). FG-4592 accelerates cutaneous wound healing by epidermal stem cell activation via HIF-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem* 46, 2460-2470.
- Teng, C.M., Wu, C.C., Ko, F.N., Lee, F.Y., and Kuo, S.C. (1997). YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol* 320, 161-166.
- Uzarski, J., Drelles, M.B., Gibbs, S.E., Ongstad, E.L., Goral, J.C., McKeown, K.K., Raehl, A.M., Roberts, M.A., Pytowski, B., Smith, M.R. et al. (2008). The resolution of lymphedema by interstitial flow in the mouse tail skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1326-1334.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.
- Wang, G.Y., and Zhong, S.Z. (1985). A model of experimental lymphedema in rats' limbs. *Microsurgery* 6, 204-210.
- Weber, E., Agliano, M., Bertelli, E., Gabriele, G., Gennaro, P., and Barone, V. (2022). Lymphatic collecting vessels in health and disease: A review of histopathological modifications in lymphedema. *Lymphat Res Biol*.
- Wiinholt, A., Gerke, O., Dalaei, F., Bucan, A., Madsen, C.B., and Sorensen, J.A. (2020). Quantification of tissue volume in the hindlimb of mice using microcomputed tomography images and analysing software. *Sci Rep* 10, 8297.
- Wu, K., Zhou, K., Wang, Y., Zhou, Y., Tian, N., Wu, Y., Chen, D., Zhang, D., Wang, X., Xu, H. et al. (2016). Stabilization of HIF-1alpha by FG-4592 promotes functional recovery and neural protection in experimental spinal cord injury. *Brain Res* 1632, 19-26.
- Yamamoto, T., Narushima, M., Doi, K., Oshima, A., Ogata, F., Mihara, M., Koshima, I., and Mundinger, G.S. (2011). Characteristic indocyanine green lymphography findings in lower extremity lymphedema: the generation of a novel lymphedema severity staging system using dermal backflow patterns. *Plast Reconstr Surg* 127,

1979-1986.

- Yeo, E.J., Chun, Y.S., Cho, Y.S., Kim, J., Lee, J.C., Kim, M.S., and Park, J.W. (2003). YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 95, 516-525.
- Yoshida, S., Hamuy, R., Hamada, Y., Yoshimoto, H., Hirano, A., and Akita, S. (2015). Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model. *Regen Med* 10, 549-562.
- Yoshida, S., Koshima, I., Hamada, Y., Sasaki, A., Fujioka, Y., Nagamatsu, S., Yokota, K., Harima, M., and Yamashita, S. (2019). Lymphovenous Anastomosis Aids Wound Healing in Lymphedema: Relationship Between Lymphedema and Delayed Wound Healing from a View of Immune Mechanisms. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 8, 263-269.
- Zampell, J.C., Yan, A., Avraham, T., Daluvoy, S., Weitman, E.S., and Mehrara, B.J. (2012). HIF-1alpha coordinates lymphangiogenesis during wound healing and in response to inflammation. *FASEB J* 26, 1027-1039.
- Zheng, F., Zhang, P., Zhao, M., Wang, J., Xu, X., Zhang, C., and Zhang, L. (2022). Effect of Roxadustat on Factors Associated with Renal Fibrosis and Efficacy. *Comput Math Methods Med* 2022, 4764254.
- Zhou, B., Si, W., Su, Z., Deng, W., Tu, X., and Wang, Q. (2013). Transcriptional activation of the Prox1 gene by HIF-1alpha and HIF-2alpha in response to hypoxia. *FEBS Lett* 587, 724-731.
- Zhu, Y., Wang, Y., Jia, Y., Xu, J., and Chai, Y. (2019). Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1alpha/VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 27, 324-334.

(引用文献数 64)