

主論文の要旨

## **Hydrogen Sulfide Attenuates Lymphedema Via the Induction of Lymphangiogenesis Through a PI3K/Akt-Dependent Mechanism**

〔 硫化水素はPI3K/Aktシグナル依存的にリンパ管新生を促進し、  
リンパ浮腫を軽減する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 循環器内科分野

(指導：室原 豊明 教授)

鈴木 淳也

## 【緒言】

二次性リンパ浮腫はがん治療におけるリンパ節郭清、放射線療法などによりリンパ管システムの機能不全が引き起こされ、四肢の浮腫を来す疾患である。容姿の問題だけでなく、繰り返す疼痛や感染などにより著しい QOL の低下を来す疾患である。今後がん治療の進歩によりがんサバイバーが増えるとともに二次性リンパ浮腫患者も増加する事が予想される。しかしリンパ浮腫に対する根治的な治療で推奨度の高いものは限定的で、弾性ストッキングの着用や運動、スキンケアなど理学的な治療が中心となっており、新たな治療の確立が期待されている。

そこで私達が注目したのが硫化水素 ( $H_2S$ ) である。硫化水素は生体内に微量に存在するガス分子で、一酸化窒素や一酸化炭素と同様にガス情報伝達物質として作用する事が知られている。硫化水素は生体内において恒常性の維持に重要な役割を担っており、抗酸化作用、免疫や代謝の調整、血管新生や血管拡張など幅広い作用を持つ。私達の研究グループでは以前に下肢虚血モデルにおいて硫化水素のドナーである diallyl trisulfide (DATS) を投与する事で血管新生を促進し、下肢虚血が改善される事を報告している。しかしリンパ管新生における硫化水素の作用は未解明であり、本研究ではリンパ管新生における硫化水素の生理活性作用の解明と、リンパ浮腫に対するリンパ管新生療法への治療応用を目的として研究を行った。

## 【方法と結果】

硫化水素は生体内においていくつかの酵素により生成される事が判明しているが、まず私たちは主に心血管系において硫化水素を生成する Cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) に注目し研究を行った。まず CSE の全身性遺伝子欠損 (グローバル knockout: KO) マウスにおいてリンパ浮腫モデルを作製し評価を行った。リンパ浮腫モデルでは、尻尾の表層をほぼ全周性に電気メスで焼灼し、皮下組織のリンパ管ネットワークを途絶させ人工的にリンパ浮腫を作製した。1 か月間観察を行い、尻尾の径などを測定した。まず術後 7 日目の尻尾組織における硫化水素濃度を測定すると、CSE-KO マウスでは野生型のマウスに比べ硫化水素濃度が低い事がわかった (Fig.1A)。そして CSE-KO マウスのリンパ浮腫モデルでは、野生型マウスと比べ、術後 21 日目以降においてより強いリンパ浮腫が認められた (Fig.1B, 1C)。また術後 28 日におけるリンパ浮腫組織の免疫染色による観察により、CSE-KO マウスの手術部位では LYVE-1/Podoplanin により二重染色されるリンパ管内皮細胞が少なくリンパ管新生が抑制されている事が示された (Fig.1D, 1E)。また遠位部においてより強い炎症細胞集積を認めた (Fig.1F, 1G)。また尻尾組織における Akt リン酸化を調べると、野生型マウスではリンパ浮腫を作製することでリン酸化が促進されているが、CSE-KO マウスではその促進が抑えられている事が示された (Fig.1H, 1I)。

次に野生型のリンパ浮腫モデルマウスに対して、硫化水素のドナーである DATS を投与し検討を行った。リンパ浮腫作成後、DATS を連続 10 日間腹腔内投与した所、術後 7 日目において血中およびリンパ浮腫組織中の硫化水素濃度は DATS 投与群にて上

昇する事が示された (Fig.2A, 2B)。また術後 21 日目以降、DATS 投与群においてリンパ浮腫が軽減することが示された (Fig.2C, 2D)。術後 28 日目におけるリンパ浮腫組織の免疫染色による観察により、DATS 投与群ではより多くのリンパ管内皮細胞が観察され、リンパ管新生が促進されている事が示された (Fig.2E, 2F)。また DATS 投与群において手術部位末梢のリンパ管内腔が小さく (Fig.2G, 2H)、炎症細胞集積も抑えられている事が示された (Fig.2I, 2J)。また尻尾組織における Akt のリン酸化を調べると、DATS 投与群においてよりリン酸化が促進されている事が示された (Fig.2K, 2L)。

続いてヒトリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell: LECs) において DATS の効果を検討した。まず LECs に DATS を添加する事で細胞内の硫化水素濃度が上昇する事を確認した (Fig.3A)。また増殖能 (Fig.3B) や管腔形成能 (Fig.3C, 3D) が DATS により促進される事が示された。さらに、Akt のリン酸化および PROX1 の発現も DATS 投与群において濃度依存的に促進される事が示された (Fig.3E, 3F, 3G)。

続いて PI3K/Akt 阻害薬である Wortmannin を用いた実験を行った。LECs に対して DATS とともに Wortmannin を同時に添加したところ、DATS 単剤投与により促進される Akt のリン酸化は、Wortmannin を同時添加した群では促進が見られなかった (Fig.4A, 4B)。同様に増殖能、遊走能についても評価したところ、DATS 単剤の添加では促進されるが、Wortmannin を同時添加したところ促進効果の一部がキャンセルされる結果が示された (Fig.4C, 4D, 4E)。

最後に野生型マウスのリンパ浮腫モデルに対して、リンパ浮腫作成後連続 10 日間、DATS とともに Wortmannin を腹腔内投与し検討を行った。先に示したように DATS 単剤を投与した群では control 群と比べリンパ浮腫の改善が見られたが、Wortmannin を同時投与した群では改善が見られなくなった (Fig.5A, 5B)。また術後 28 日目におけるリンパ浮腫組織の免疫染色による観察により、DATS 単剤投与群ではリンパ管内皮細胞が多く認められリンパ管新生が促進されたことが示されたが、Wortmannin を同時投与した群ではその促進効果の一部がキャンセルされる結果が示された (Fig.5C, 5D)。炎症細胞の集積についても DATS 単剤投与により抑制されたが、Wortmannin を同時投与した群ではその改善作用の一部がキャンセルされる結果が示された (Fig.5E, 5F)。尻尾組織における Akt のリン酸化についても評価を行うと、DATS 単剤投与群では Akt のリン酸化が促進されているが、Wortmannin を同時投与した群ではその促進作用が一部キャンセルされる結果が示された (Fig.5G, 5H)。この結果から DATS による治療的なリンパ管新生促進効果は、少なくとも部分的に Akt シグナルに依存した作用であることが示唆された。

## 【考察】

本研究において、(1) CSE-KO マウスのリンパ浮腫モデルにおいて、組織中の硫化水素濃度が減少し、リンパ管新生が抑制され、リンパ浮腫が増悪する事、(2) 野生型マウスのリンパ浮腫モデルに対して DATS を投与すると血中及びリンパ浮腫組織中の硫化水素濃度が上昇し、リンパ管新生を促進しリンパ浮腫が改善する事、(3) DATS により

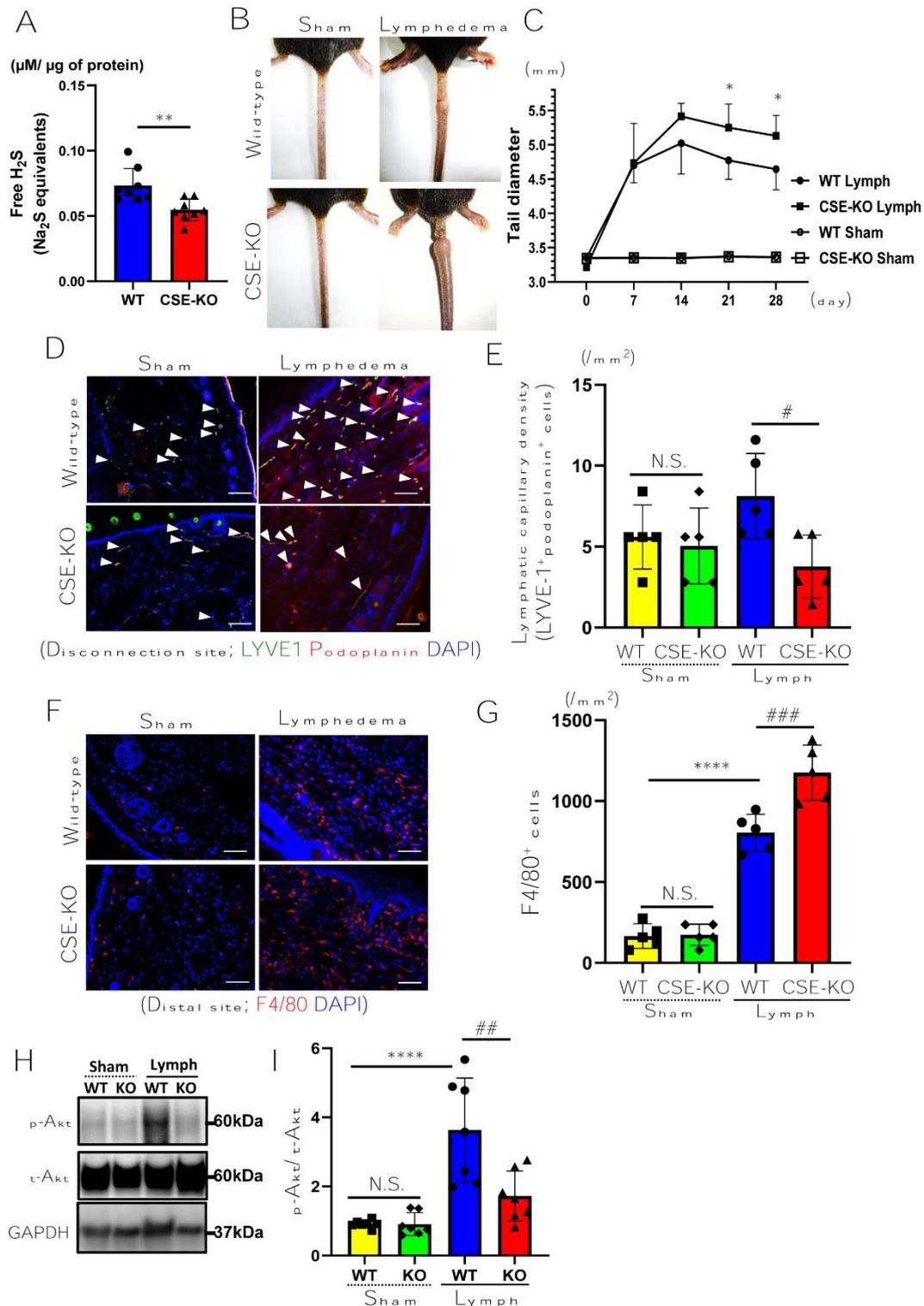
LECs の増殖能、遊走能、管腔形成能が促進される事、(4)PI3K/Akt シグナルの阻害により DATS によるリンパ管新生促進作用の一部がキャンセルされる事が示された。

硫化水素はこれまで心筋虚血再灌流モデルや下肢虚血モデルにおいて血管新生を促進する事が報告されている。しかしリンパ浮腫に対する硫化水素の効果についてはほとんど報告がなく、本研究は *in vivo* および *in vitro* においてリンパ管新生を促進する事を報告した最初の研究である。

DATS はニンニク油に含まれる物質で、生理的条件下にて硫化水素を遊離する。本研究では DATS の持続的な投与により血中および局所組織中の硫化水素濃度が上昇し、修復性リンパ管新生を促進させ、リンパ液の貯留と局所の炎症反応を軽減し、リンパ浮腫を改善する事が示された。

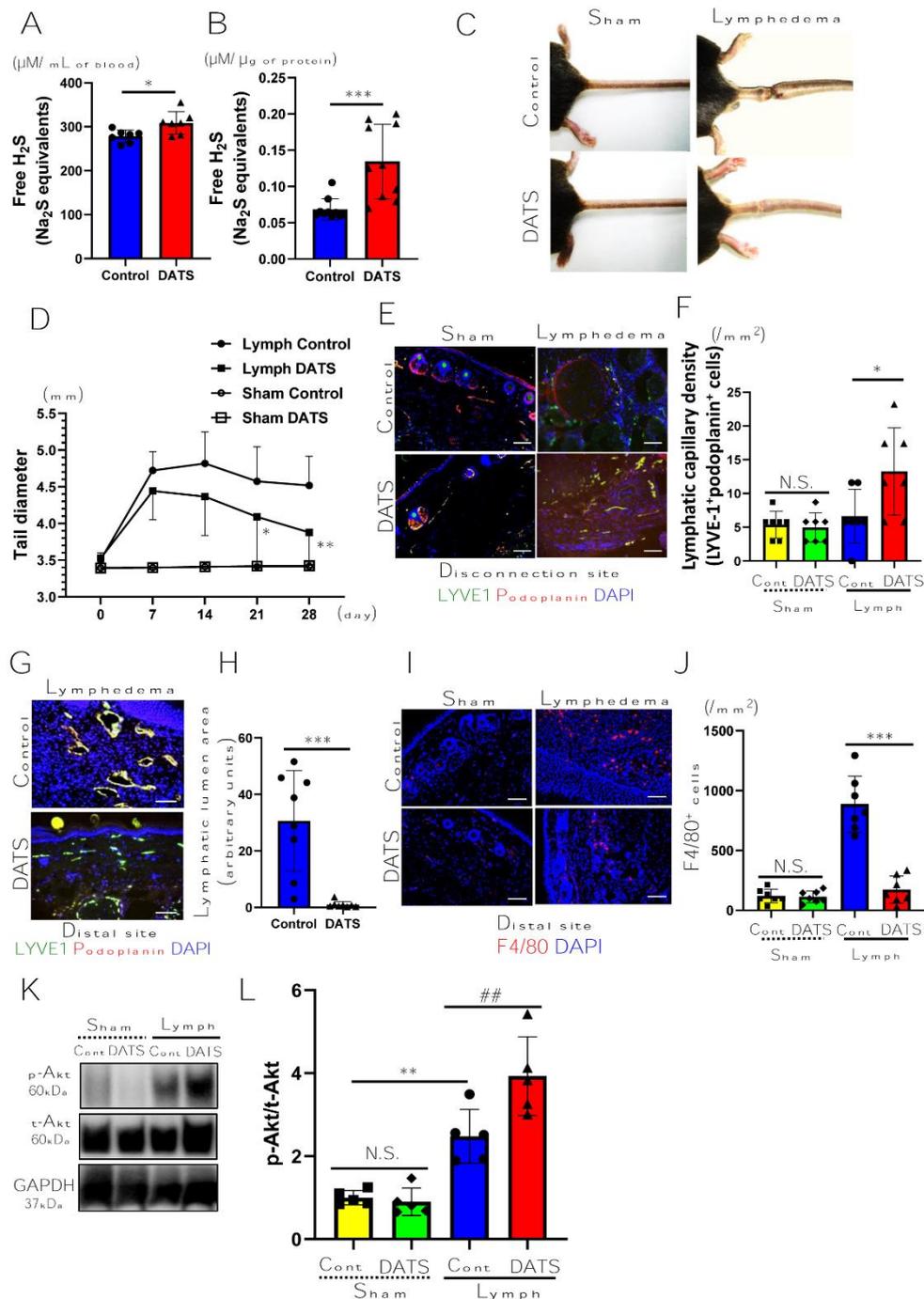
### 【結論】

硫化水素は、少なくとも部分的に PI3K/Akt シグナル依存的に修復的リンパ管新生を促進し、二次性リンパ浮腫を軽減する。さらに DATS のような硫化水素のドナーを用いた治療的リンパ管新生療法が、二次性リンパ浮腫の治療戦略となり得ることが示唆された。



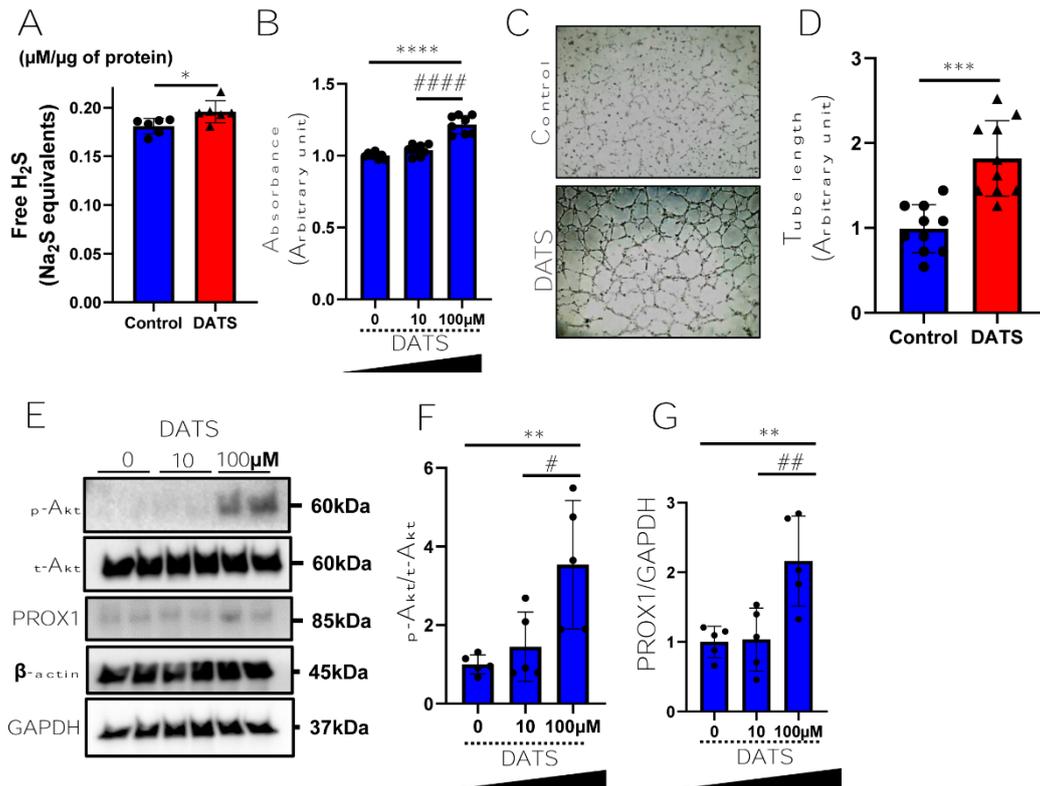
**Figure1. CSE の欠失はリンパ管新生を抑制し、リンパ浮腫を増悪させる。**

**A** 野生型マウスと CSE-KO マウスの尻尾組織における硫化水素濃度. \*\* $P < 0.01$  vs WT by unpaired Student t-test. **B** リンパ浮腫モデルの尾部写真. **C** リンパ浮腫作成後の尻尾径の経時的変化. \* $P < 0.05$  vs the respective WT-Lymph by 2-way ANOVA and Sidak's post hoc tests. **D** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. LYVE-1(green)/Podoplanin(red). 白矢頭:LYVE-1/Podoplanin 二重染色細胞. **E** 新生リンパ管密度(LYVE-1/Podoplanin 二重染色細胞)の定量評価. Bars: 100 μm. Data are mean±SEM. \* $P < 0.05$  vs WT-Lymph by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **F** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. F4/80(red) **G** F4/80 陽性細胞密度の定量評価. Bars: 100 μm. Data are mean±SEM. \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs WT-Sham and ### $P = 0.0005$  vs WT-Lymph by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **H** phospho-Akt(p-Akt), total Akt(t-Akt)のウェスタンブロットング写真. **I** 定量的評価(p-Akt/t-Akt). Data are mean±SEM (n=7 each). \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs WT-Sham and ## $P < 0.001$  vs CSE-KO-Lymph by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests.



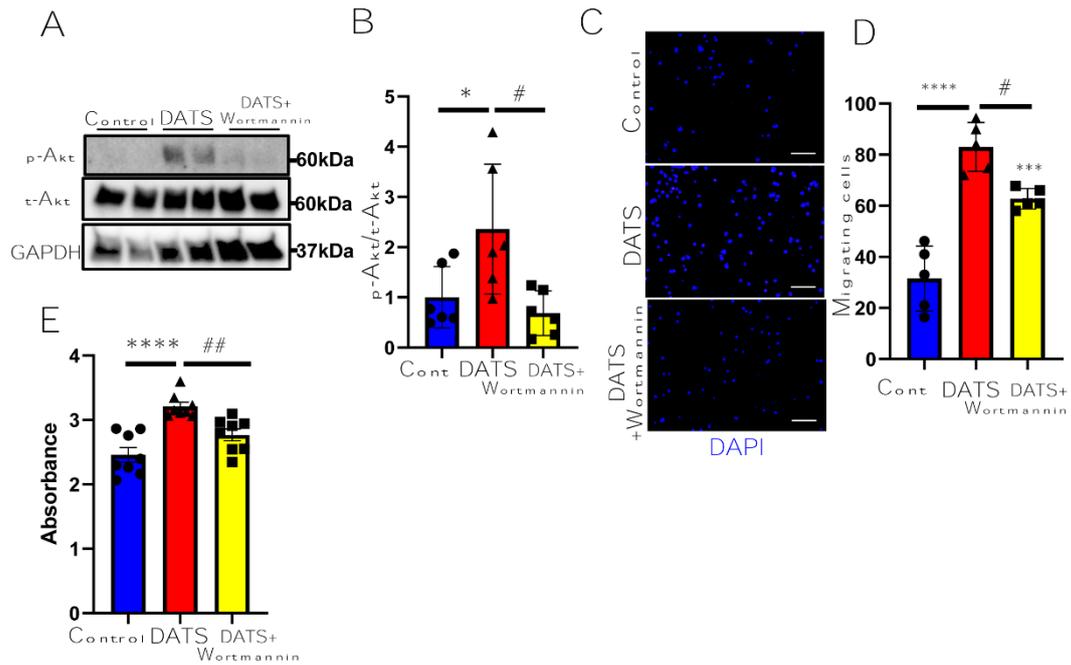
**Figure 2. DATS 投与はリンパ浮腫組織においてリンパ管新生を促進する。**

**A, B** 血中(A)およびリンパ浮腫組織中(B)の硫化水素濃度. Data are mean±SEM (n=7 each). \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001 vs control by 2-tailed Mann-Whitney U test. **C** リンパ浮腫モデルの尾部写真. **D** リンパ浮腫作成後の尻尾径の経時的変化. Data are mean±SEM (n=10 for Sham-[Vehicle] Control; n=10 for Sham-DATS; n=11 for Lymph-[Vehicle] Control; n=10 for Lymph-DATS). \*P<0.05 and \*\*P<0.01 vs the respective WT by 2-way ANOVA and Sidak post hoc tests. **E** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. LYVE-1(green)/Podoplanin (red). **F** 新生リンパ管密度(LYVE-1/Podoplanin 二重染色細胞)の定量評価. Bars: 100 μm. \*P<0.05 vs Lymph-Control by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **G** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. LYVE-1(green)/Podoplanin (red). **H** リンパ管内腔の評価. Bars: 100 μm. \*\*\*P<0.001 vs control by 2-tailed Mann-Whitney U test. **I** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. F4/80(red). **J** F4/80 陽性細胞密度の定量評価. \*\*\*P<0.001 vs Lymph-Control by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **K** p-Akt, t-Akt のウエスタンブロッティング写真. **L** 定量的評価(p-Akt/t-Akt). Data are mean±SEM (n=5 each). \*\*P<0.01 vs Sham-Control and ##P<0.01 vs Lymph-DATS by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests.



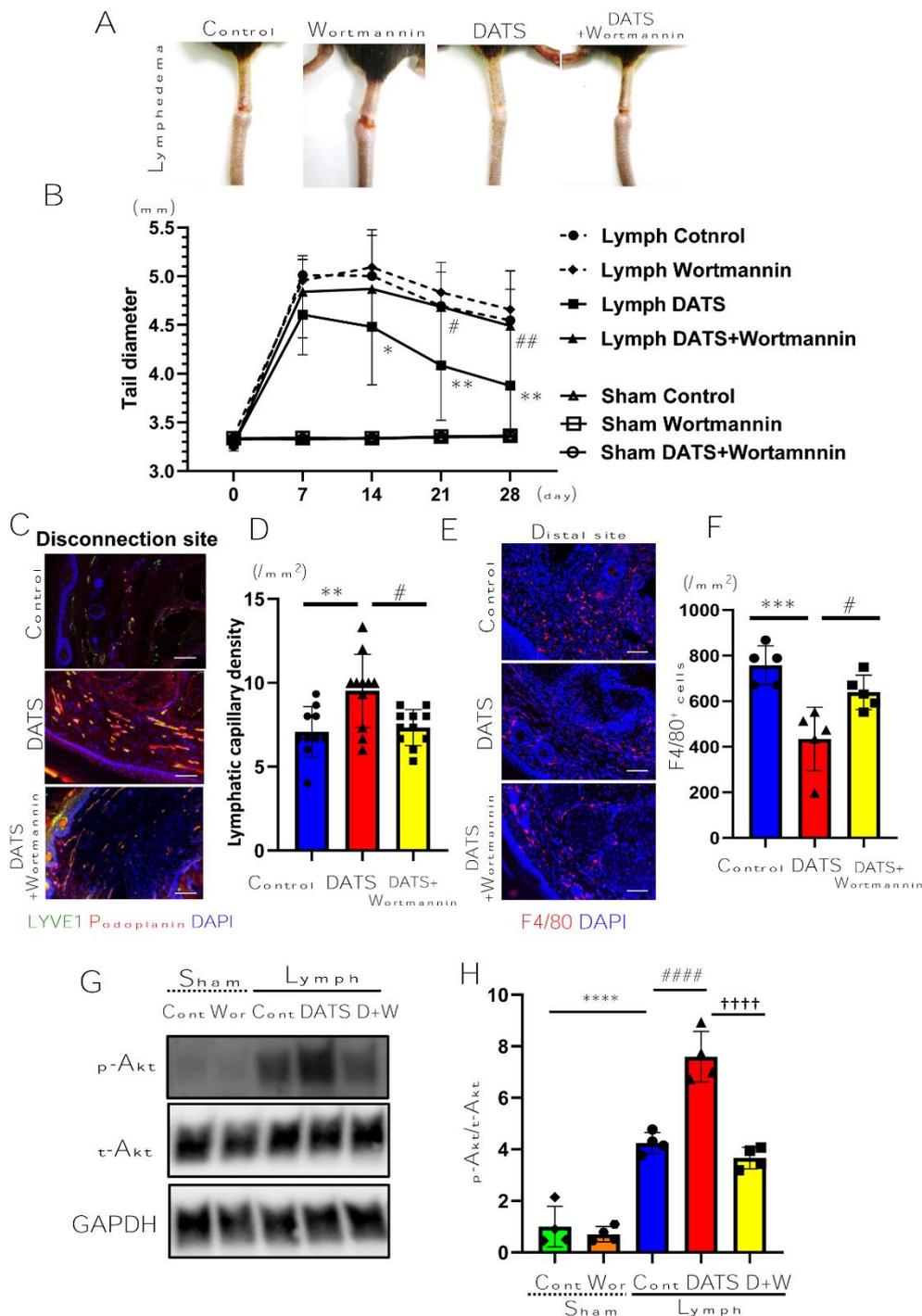
**Figure3. DATS はリンパ管内皮細胞の増殖能、管腔形成能、Akt のリン酸化を促進する。**

**A** リンパ管内皮細胞(LECs)の硫化水素濃度. Data are mean±SEM (n=6 each). \*P<0.05 vs control by Student t test. **B** LECs の WST-1 proliferation assay 結果. \*\*\*\*P<0.0001 vs 0 μmol/L, #####P<0.0001 vs 10 μmol/L by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **C** LECs の管腔形成写真. **D** 管腔形成能の定量評価. Data are mean±SEM (n=10 each). \*\*\*P<0.001 vs control by Student t test. **E** p-Akt, t-Akt, PROX1 のウエスタンブロッティング写真. **F** 定量評価(p-Akt/t-Akt). Data are mean±SEM (n=7 each). \*\*P<0.01 vs 0 μmol/L and #P<0.05 vs 10 μmol/L by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **G** 定量評価(PROX1/GAPDH). Data are mean±SEM (n=5 each). \*\*P<0.01 vs 0 μmol/L and ##P<0.01 vs 10 μmol/L by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests.



**Figure4. PI3K/Akt シグナルが in vitro での DATS によるリンパ管形成に関わっている。**

**A** p-Akt, t-Akt のウエスタンブロッティング写真. **B** 定量評価(p-Akt/t-Akt). Data are mean±SEM (n=5 for each). \*P<0.05 vs control and #P<0.05 vs DATS by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **C** 遊走細胞の DAPI による免疫染色写真. Bars: 100 μm. **D** 遊走細胞の定量評価. Data are mean±SEM (n=6 for each). \*\*\*P<0.001 and \*\*\*\*P<0.0001 vs control and #P<0.05 vs DATS by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **E** LECs の WST-1 proliferation assay 結果. \*\*\*\*P<0.0001 vs control and ##P<0.01 vs DATS by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests.



**Figure 5. PI3K/Akt シグナルの阻害は in vivo において DATS によるリンパ管新生促進作用を阻害する。**

**A** リンパ浮腫モデルの尾部写真. **B** リンパ浮腫作成後の尻尾径の経時的変化. Data are mean±SEM (n=9 for Lymph-Control, Lymph-Wortmannin, Lymph-DATS, and Lymph-DATS+Wortmannin; n=5 for Sham-[Vehicle] Control, Sham-Wortmannin, and Sham-DATS+Wortmannin). \*P<0.05 and \*\*P<0.01 vs respective Lymph-(Vehicle) Control; #P<0.05 and ##P<0.01 vs respective Lymph-DATS by 2-way ANOVA and Sidak post hoc tests. **C** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. LYVE-1(green)/Podoplanin (red). **D** 新生リンパ管密度(LYVE-1/Podoplanin 二重染色細胞)の定量評価. Bars: 100 μm. Data are mean±SEM (n=11 for each). \*\*P<0.01 vs control and #P<0.05 vs DATS samples by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **E** リンパ浮腫モデルの尾組織の免疫染色写真. F4/80(red). **F** F4/80 陽性細胞密度の定量評価. Bars: 100 μm. \*\*\*P<0.001 vs control and #P<0.05 vs DATS by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests. **G** p-Akt, t-Akt のウエスタンブロッティング写真. **H** 定量的評価(p-Akt/t-Akt). Data are mean±SEM (n=4 each). \*\*\*\*P<0.0001 vs Sham-Control, #####P<0.0001 vs Lymph-Control, and ††††P<0.0001 vs Lymph-DATS by 1-way ANOVA and Tukey post hoc tests.