

神奈川工科大学

健康生命科学研究所

研究報告

第 13 号

2022 年度

研究推進機構

目次

- ・ マウス尻尾リンパ浮腫モデルにおけるアラキドン酸代謝物トロンボキサンの
リンパ管新生増強作用(リンパ管の可塑性を制御する生理活性物質の疾患治療への応用)
臨床工学科 馬嶋正隆
臨床工学科 松田康広
臨床工学科 渡邊紳一
臨床工学科 西村宗修
管理栄養学科 澤井淳
- ・ 地球温暖化抑制に向けたバイオマス資源からのテレフタル酸製造技術の開発
応用バイオ科学科 仲亀誠司

マウス尻尾リンパ浮腫モデルにおけるアラキドン酸代謝物トロンボキサンのリンパ管新生増強作用（リンパ管の可塑性を制御する生理活性物質の疾患治療への応用）

研究者名；馬嶋正隆（臨床工学科）、松田康広（臨床工学科）、渡邊紳一（臨床工学科）、西村宗修（臨床工学科）、澤井 淳（管理栄養学科）

1. 研究の目的

リンパ管およびその所属リンパ節を含むリンパ組織は、生体内の恒常性の維持や免疫応答などという生理的に重要な役割を担っている。加えて、浮腫や悪性腫瘍の転移などの病的状態にも関与している重要な器官である。病態時にはリンパ管およびリンパが流入する所属リンパ節において、ダイナミックな構造および機能変化が見られ、神経系が外界の刺激などによって機能的、構造的な変化を起こすのと同様に、リンパ組織においてもいわゆる『可塑性』が認められる。リンパ管の存在は 100 年以上前から明らかにされていたにもかかわらず、本格的に生体内生成機構や機能調節因子に関する研究が進みはじめたのはここ 10 数年ほどであり、現在も次々に新しい発見が続くホットな研究領域である。

リンパ管は末梢組織において血管から漏れ出した組織液（間質液）を吸み出して静脈へと還流することで、体液の恒常性維持を担っている。また最近、眼のシュレム管がリンパ管であることが判明し（JCI 2014）、リンパ管機能不全が緑内障の発症因子であることが推定されている。さらにリンパ管は免疫担当細胞の動態を支えているのに加えて、多くのがんにおいてリンパ行性の転経路として重要で、所属リンパ節においては、免疫担当細胞の動員を伴うダイナミックな構造および機能変化が見られ、転移を増長するようなニッチェが形成される。しかし、このようなリンパ節組織の可塑性を制御する機序については、多くは未解明である。また、リンパ管に関わる病態として炎症は重要で、炎症反応に伴って高まった血管透過性亢進により漏れ出した血漿タンパクを回収するためにリンパ管新生が増強することは、想像に難くない。

これまで、内因性生理活性物質であるプロスタグランジン(PG)が、炎症時のリンパ管およびリンパ組織の可塑性を制御する因子であることを明らかにしてきた(P&T 2021)。増殖性の炎症のプロファイルを持つマトリゲル皮下移植モデルにおいて、PGE₂がEP3およびEP4受容体を介してリンパ管新生を増強すること(ATVB 2011)、創傷治癒モデルにおいても創傷部位におけるリンパ管新生がEP3およびEP4受容体シグナルにより増強すること(PLoSone 2016)を報告してきた。

本研究の初年度として、特にリンパ浮腫の治療方策を検討した。血小板凝集や気道平滑筋収縮に役割を持つアラキドン酸代謝物トロンボキサン(Thromboxane A₂, TXA₂)が、その受容体TPを介してリンパ管新生を増強するか否か、リンパ浮腫の発症に関与するか否か検討した。加えて、社会実装を目指した企業との連携研究を進めた。

2. 研究の必要性及び従来の研究

医療の高度化が進む現代においてもなお、多数の国民が難治性疾患に苦しんでいる。生命維持の基本は細胞周囲の環境の恒常性の維持にある。この細胞周囲の環境の構成因子であるリンパ管は、体液循環に関与し、リンパ管の機能不全はリンパ浮腫を引き起こす。がん治療時のリンパ節郭清に伴う2次性リンパ浮腫は極めて治療に抵抗性であり浮腫に悩む患者は多い。リンパ浮腫指導管理料、四肢のリンパ浮腫治療のための弾性着衣などに係る療養費が、平成20年度診療報酬改定に伴って保険適用が認められるようになった。多くの患者が存在することを端的に表している。本研究の成果は、多くのリンパ浮腫患者に福音となる。

また、本邦で死因の一位である悪性新生物（がん）においてリンパ行性転移は患者の予後の重要な決定因子である。現在のところ、高度リンパ節転移陽性の患者においては集学的治療によっても治療効果はいまだ満足できるレベルではない。本研究結果から、がんのリンパ行性転移を制御できれば患者に対する恩恵は計り知れない。リンパ管に関する研究の歴史はまだ浅く、これまで軽視されたリンパ管の組織機能に焦点をあて、関連する疾患発症に関わるメカニズムを解析、治療標的、治療的介入について研究を進めることは意義が大きい。

さらに本研究では、脂肪の吸収に大きな役割を持つリンパ管、特に小腸絨毛の中央にある乳糜管の機能調節を介して、肥満治療の方策にならないか検討を開始した。

いずれも、従来の研究が不足してきた分野であり、研究成果の社会還元の必要性は極めて高い。

3. 期待される効果

組織・臓器の実質的な循環を議論する微小循環学において、リンパ管研究は長く血管や血管内皮研究の陰に隠れた存在であった。また多くの日本人研究者が研究の先導をしてきた免疫学においても、研究の軸足はTリンパ球などの免疫担当細胞の機能解析にあり、リンパの流れやリンパ管を介した細胞動態は、興味の対象になってこなかった。

しかし、この10年ほどでリンパ学は飛躍的に進展した。リンパ管を同定するマーカーの特定に加え、リンパ管新生を増強するマスター遺伝子(Prox-1)や成長因子(VEGF-C/D)が相次いで海外の研究者によって発見され、これらの機能解析をもとにリンパ管の可塑性と疾患の関連を解析するのが世界の研究の潮流となっている。本研究では、生理活性脂質の受容体や合成系に注目し、ガス分子を含めた各種化合物による治療法の開発を目指している。この方向性は新鮮であり、リンパ管新生を討議する Gordon 会議からの講演招聘も多い。生理活性物質をツールにリンパ組織の可塑性制御によるリンパ浮腫を含めた病態治療を展開する。

本研究は、リンパ管およびその所属リンパ節を含むリンパ組織に焦点を当て、関連する難治性疾患の治療方策を解明するものである。インパクトに富むアプローチと言え、関連疾患に苦しむ多くの患者に対する恩恵は極めて大きく、その波及効果は大きい。

4. 研究の経過及び結果・評価

初年度は、リンパ浮腫における TP 受容体の役割を解析した。加えて、炭酸ガスシートを浮腫治療に用いる目的で、評価モデルの開発を行った。さらに、肥満治療の目的で神経ペプチド CGRP の高脂肪食飼育時の体重増加、脂肪吸収の動態を評価した。本報告では、多くの成果が得られたリンパ浮腫における TP 受容体の役割を中心に報告する。

マウス尻尾2次性リンパ浮腫における治療方策の検討

1) 研究方法の概要

我々のオリジナルモデルであるマウス尻尾基部皮下組織全周搔爬モデルを、リンパ管が可視化できる Prox1-GFP TG マウス(WT;野生型)と TXA2 受容体ノックアウトマウス(TP KO)(Prox1-GFP TG バックグラウンド)で作成し、末梢に生じる浮腫を尾部径を計測することで評価した。GFP の蛍光で新生リンパ管の経時的評価を行った。搔爬部分に新生してくるリンパ管のリンパ管径、リンパ管面積を評価した。リンパ管新生増強因子の VEGF-C および VEGF-D の発現を real time PCR で評価した。また、搔爬部分に集積するマクロファージの役割を解析した。

2) 2次性リンパ浮腫の経時変化

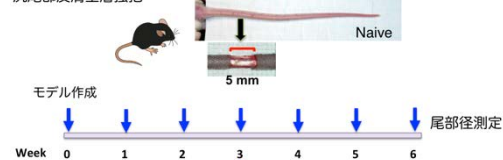
搔爬後、搔爬部位の末梢側で浮腫が認められた。野生型(WT)では尻尾径は2週後に最大値を示し、以後減少した。これに対し、TP 受容体ノックアウトマウス(TP KO)では、尻尾径の増大が持続し、3週目、4週目でWTに比べ有意に高値を示した。3週目では、搔爬部位での TXA2 合成酵素、

方法

実験動物 雄性 8週令
野生型マウス: C57/BL6 mice (WT)
TxA₂受容体欠損マウス: TP^{-/-} mice (TPKO)

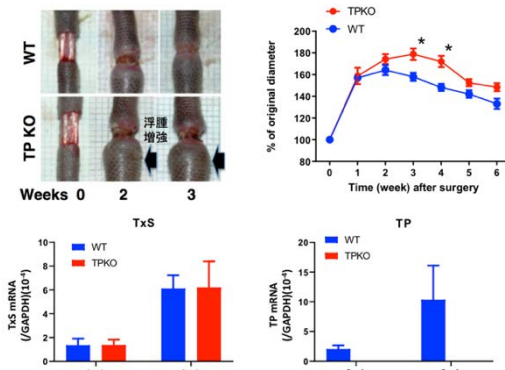
2次性リンパ浮腫モデル作成

尻尾基部皮膚全周搔爬

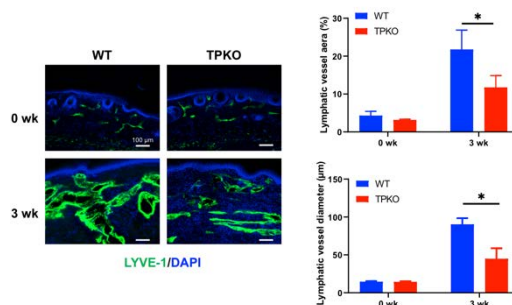


- ✓ リンパ管新生 (リンパ管密度、リンパ管面積)
- ✓ リンパ管新生因子 Real time RT-PCR
- ✓ マクロファージ集積

2次性リンパ浮腫はTPKOで増強した



新生リンパ管面積、リンパ管径はTPKOで減少した



TP 受容体の発現量が非搔爬組織に比べ増大していた。

3) 新生リンパ管の推移

搔爬部位でリンパ管内皮マーカーである Lyve-1 を免疫染色し、新生リンパ管の面積を単位断面積あたりで調べた。搔爬前の組織では、WT、TP KO でリンパ管面積に有意な差はないが、搔爬後3週目の組織では、有意に TP KO で WT に比べ新生リンパ管面積が低値を示した。新生リンパ管の径を評価しても、搔爬後3週目では、有意に TP KO で WT に比べ低値を示した。

4) VEGF アイソフォームの発現量の変化

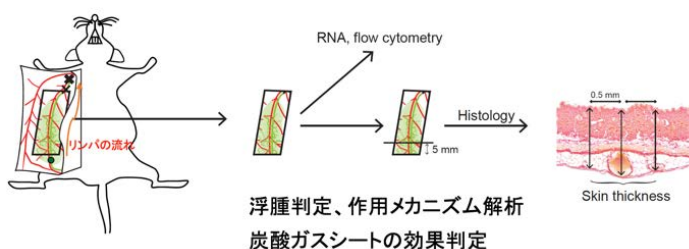
搔爬部位でリンパ管新生を増強する VEGF-C と VEGF-D の発現量を評価した。搔爬後3週目では、VEGF-D の発現量が有意に TP KO で WT に比べ低値を示した。これに伴って、VEGF3 型受容体の発現量、リンパ管のマスター遺伝子である Prox-1 の発現量が搔爬後3週目で、有意に TP KO で WT に比べ低値を示した。

5) マクロファージの搔爬部位への集簇とマクロファージ上の TP シグナルの役割

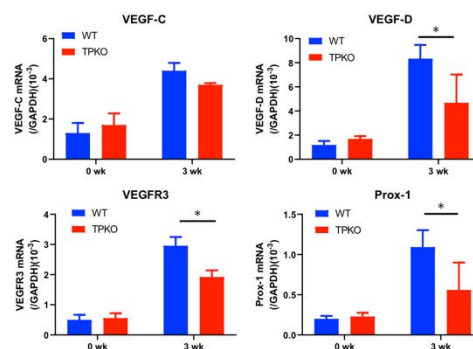
搔爬部位には、マクロファージの集簇が認められた。TP KO でその集簇が顕著であった。TP flox マウスを LysMCre マウスと交配して作成したマクロファージ特異的な TP KO マウスでは、コントロールマウスと比較して、尻尾径の増大が持続し、3週目、4週目、6週目で有意に高値を示した。併せて、マクロファージ特異的な TP KO マウスでは、コントロールマウスと比較して、VEGF-C/D および VEGFR3、Prox-1 の発現量が有意で低下していた。

結論；上記1)～5)の成果から、マウス尻尾2次性リンパ浮腫モデルでは、TP シグナルがリンパ管新生を増強し、浮腫を軽減していることが判明した。

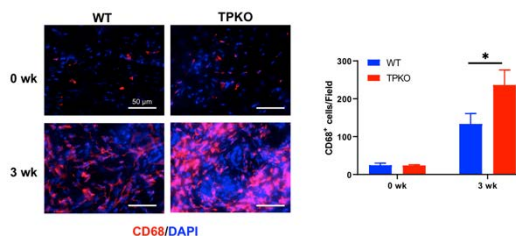
6) 腋窩リンパ節切除モデルでのリンパ浮腫における治療方策の検討：腋窩リンパ節を切除し末梢のリンパ管を結紮することにより、側腹部のリンパ浮腫を生じる新規モデルを開発することができた。同モデルで、VEGF-C/D の発現、リンパ管新生を結紮部位をサンプリングし経時的に解析する準備が整った。企業との共同研究で、同モデルで炭酸ガス徐放シートの浮腫抑制効果の検討を開始した（共同研究、契約済み）。TP アゴニスト、CGRP アナログによる治療効果も検討する。



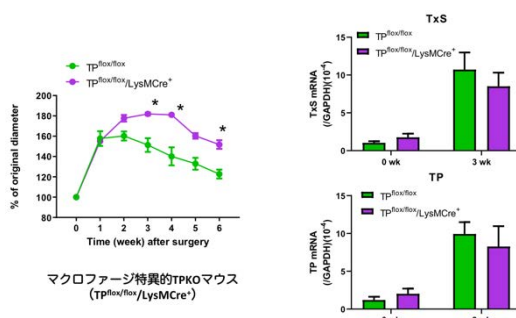
リンパ管新生因子、リンパ管内皮マーカー発現はTPKOで減少した



集簇マクロファージはTPKOで増加した



2次性リンパ浮腫はマクロファージ特異的TPKOで増強した



5. 今後の計画

最初の 1 年間でリンパ管、リンパ組織の可塑性の変調が基盤に存在する疾患モデル；① 2 次性リンパ浮腫モデル/LPS 腹膜炎モデル、②乳糜管機能解析モデルを対象に、1) 内因性脂質生成系および受容体の機能解析、2) 神経ペプチドの役割解析、3) 病態の評価をおこない、その後の 2 年間でリンパ管・リンパ組織可塑性の生理活性物質による制御が治療展開できるか分子基盤を解明する予定である。実施に難航する場合は、既に確立済みの脂質メディエーターの生成酵素（例えば mPGES-1）および受容体(BLT1、LPA 受容体など)を不活化した遺伝子改変マウスを用い、リンパ組織可塑性が病態の基盤に存在するその他の疾患モデルでも検討する予定としている。加えて、神経ペプチドなどの他因子との関連性も解析する予定である。基盤研究を基に、病態時のリンパ管・リンパ組織の可塑性を増強あるいは抑制する治療介入モデルを検討する。

本年度は、TP シグナルがリンパ浮腫モデルにおいてリンパ管新生を増強し、浮腫解消に寄与していることを、TPK0 を用いて示すことが出来た。さらに、生体内でプロスタグランジンの生成、神経ペプチドの CGRP の遊離を引き起こす炭酸ガスを治療ツールにすることを検討を開始した。株式会社花王との共同研究で、炭酸ガス徐放シートの病態治療への応用、特にリンパ浮腫に治療に応用することで、予備実験を進めている。知財の確保も迅速に行うことを考えている。加えて、脂質の吸収と肥満の制御に CGRP が重要であることも実験で確認できた。今後、詳細な検討を展開する予定である。がんのリンパ節転移、子宮内膜症、肝障害などにおけるリンパ管、リンパ組織の可塑性と病態制御のパイロットスタディも進めており、ポジティブな結果も得られている。今後、これらの研究領域にも展開の予定である。

6. 研究成果の発表

1. **Majima M**, Hosono K, Ito Y, Amano H, Nagashima Y, Matsuda Y, Watanabe S, Nishimura H. A biologically active lipid, thromboxane, as a regulator of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Biomed. Pharmacother.** 2023; in press **IF;7.419** 査読有り
2. Amano H, Eshima K, Ito Y, Nakamura M, Kitasato H, Ogawa F, Hosono K, Iwabuchi K, Uematsu S, Akira S, Narumiya S, **Majima M**. The microsomal prostaglandin E synthase-1/PGE2 axis induces recovery from ischemia via recruitment of regulatory T cells. **Cardiovasc Res.** 2022;cvac137. doi: 10.1093/cvr/cvac137. Epub ahead of print. PMID: 35986688. **IF;10.787** 査読有り
3. Satoh M, Iizuka M, **Majima M**, Ohwa C, Hattori A, Van Kaer L, Iwabuchi K. Adipose invariant NKT cells interact with CD1d-expressing macrophages to regulate obesity-related inflammation. **Immunology.** 2022;165(4):414-427. doi: 10.1111/imm.13447. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35137411. **IF;7.215** 査読有り
4. **Majima M**, Hosono K, Ito Y, Amano H. Biologically active lipids in the regulation of lymphangiogenesis in disease states. **Pharmacol Ther.** 2021;108011. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.108011. Epub ahead of print. PMID: 34614423. **IF;12.31** 査読有り
5. Yamane S, Amano H, Ito Y, Betto T, Matsui Y, Koizumi W, Narumiya S, **Majima M**. The role of thromboxane prostanoid receptor signaling in gastric ulcer healing. **Int J Exp Pathol.** 2021; 103(1):4-12. doi: 10.1111/iep.12410. PMID: 34655121. **IF;1.925** 査読有り
6. **Majima M**, Hosono K, Ito Y, Amano H, Nagashima Y, Matsuda Y, Watanabe S, Nishimura H. Lymphangiogenesis and Prostanoids as Regulators in Disease States. **Austin J Anatomy** 2022, doi.org/10.26420/austinjanat.2022.1107 **IF;2.900** 査読有り
7. Hyodo T, Ito Y, Hosono K, Uematsu S, Akira S, **Majima M**, Takeda A, Amano H. The Role of mPGES-1 in Promoting Granulation Tissue Angiogenesis Through Regulatory T-cell Accumulation. **In Vivo.** 2022;36(5):2061-2073. doi: 10.21873/in vivo.12932. PMID: 36099134; PMCID: PMC9463939. **IF;2.155** 査読有り
8. 伊藤義也、**馬嶋正隆** 血管・リンパ管の機能制御と疾患メカニズム リンパ管新生を制御する生理活性物質 77-87 頁 化学同人 2022 年 7 月
9. 伊藤義也、天野英樹、**馬嶋正隆** グッドマン・ギルマン薬理学書 13 版 3 4 章 免疫と炎症 1013-1036 頁 廣川書店 2022 年 4 月

地球温暖化抑制に向けたバイオマス資源からのテレフタル酸製造技術の開発

研究者名：仲亀 誠司

1. 研究の目的

ポリエチレンテレフタレート（PET）や生分解性プラスチックの原料であるテレフタル酸は、現在原油由来の *p*-キシレンから工業的に製造されており、飲料用ボトルや衣類等に利用されている。化石資源である原油の利用は、地球温暖化の原因である CO₂ 排出量を増加させるために、CO₂ 排出量の削減が可能な再生可能資源であるバイオマス資源を用いたテレフタル酸の製造の実用化が求められている。また *p*-キシレンは、化石資源であるナフサの熱分解の副産物としてされているが、今後、米国を中心とした安価なシェールガスの生産量の増加により、ナフサ熱分解法の衰退が予測されている。シェールガスの *p*-キシレン含有量は少ないため、長期的には *p*-キシレン自身の供給量の不足の可能性があるため、バイオマス資源の利用は原料の多様化の手段としても期待されている。

本研究では、当研究室で取得したテレフタル酸の中間原料である *p*-トルアルデヒドを生産する微生物を用いて、バイオマス資源から生物学的手法を用いたテレフタル酸ならびにポリエステルの製造の社会実装を目指している。本研究では *p*-トルアルデヒドの生産菌における生合成経路を明らかにするために、UV 変異処理による *p*-トルアルデヒド非生産株の作製と、¹³C ラベルしたシキミ酸の合成を行った。また実用化に向けて、培地に使用可能な安価な窒素源の検討を行った。

2. 研究の必要性及び従来の研究

バイオマス資源からのテレフタル酸の製造の研究開発が世界的に行われてきているが、化石資源と比べて価格競争力が弱い実用化に至っておらず、化石資源がテレフタル酸の原料として使用され続けている。今までに検討されているバイオマス資源からのテレフタル酸の製造方法は、熱分解等の化学反応を用いる方法が多く、製造時に多量のエネルギーや化学薬品を使用すると共に、反応工程数が多く（4-7 工程）、その結果設備費用も大きくなるという問題点がある。生物学的手法を用いたバイオマス資源からのテレフタル酸の製造の研究開発は 1 例報告されているが、イソブタノールを生産する 1 工程以外の残りの 4 工程は化学的手法により行われるため、最終的なエネルギー使用量は大きくなり、生物学的手法を用いる利点が活かされていない。本研究では、テレフタル酸の中間原料である *p*-トルアルデヒドを生産する微生物を用いて、バイオマス資源からテレフタル酸を発酵により生産する方法であるため、テレフタル酸の製造工程数が少なく（2 工程）、生物学的手法を用いるために、エネルギー使用量を抑制できるという利点がある。

3. 期待される効果

本研究成果の実用化により、CO₂排出量を抑制できるため、地球温暖化の抑制に対して大きな貢献をすることができる可能性がある。テレフタル酸の世界需要は、2017年には62百万トンであり、2023年には80百万トンまで増加することが見込まれる。テレフタル酸の価格を83.2円/kg（2016～2020年貿易統計参照）とした場合、2017年の市場規模は5.2兆円であり、2023年には6.7兆円の市場規模へ拡大する見込みである。地球温暖化の原因となるCO₂排出量を削減するため、化石資源からバイオマス資源への原料のシフトが世界的に望まれているため、本技術の実用化により、テレフタル酸の既存市場の一部が本技術で製造したテレフタル酸に置き換わると考えられる。

4. 研究の経過及び結果・評価

本研究では *p*-トルアルデヒドの生産菌における生合成経路を明らかにするために、UV 変異処理による *p*-トルアルデヒド非生産株の作製と、¹³C ラベルしたシキミ酸の合成を行った。また実用化に向けて、培地に使用する安価な窒素源の検討を行った。

4.1. UV 変異処理による *p*-トルアルデヒド非生産株の作製

p-トルアルデヒド生産菌の UV 変異処理を行うために、最初に菌株の培養を行った。*p*-トルアルデヒド生産菌の前培養は GP（グルコース・ポリペプトン）培地で 26℃、100 rpm で 1 週間振とう培養を行った。本培養は GP 培地で 26℃で静置培養を行った。本培養後、培養液をミラクロスでろ過を行い、菌体を回収した。セルラーゼ、キチナーゼを含む酵素溶液で菌体の細胞壁を溶解することでプロトプラストを調製した。プロトプラストはリン酸緩衝液（20 mM, pH5.5）で洗浄後、クリーンベンチ内で UV を照射し、その後、プロトプラストの再生を行った。プロトプラストの再生には、浸透圧調整剤として 0.5 M ソルビトールを含む GP 寒天培地を使用し、26℃で培養した。UV 照射時間は、プロトプラストの再生率が 10% 程度になる条件を用いた。再生した変異株は、新しい GP 寒天培地に植え継ぎを行った後、GP 液体培養で培養を行い、HPLC を用いて培養液に含まれる *p*-トルアルデヒドの生産量を調べた。この結果、*p*-トルアルデヒド非生産株を 2 菌株取得することができた。

4.2. *p*-トルアルデヒドの生産菌の生合成経路を明らかにするための ¹³C-シキミ酸の化学合成

微生物が芳香族化合物を生産する生合成経路としては、①シキミ酸経路、②メバロン酸・非メバロン酸経路、③酢酸-マロン酸経路が知られているが、これらの生合成経路に存在する化合物と *p*-トルアルデヒドは炭素骨格が異なっている。このため、生合成経路①～③のいずれかを経た後、未知の酵素の関与により *p*-トルアルデヒドへ変換されている可能性がある。*p*-トルアルデヒドの生合成がシキミ酸経路を通じて行われているかを調べるために、既知の方法を用いて、¹³C-酢酸とマンノースを用いて、¹³C-シキミ酸の化学合成を行った。

4.3. *p*-トルアルデヒドの培養に用いることが可能な窒素源の検討

バイオマス資源から *p*-トルアルデヒドを生産する技術を実用化するためには、できるだけ低コストで *p*-トルアルデヒド生産菌を培養する必要がある。本研究では *p*-トルアルデヒドの生産に用いることが可能な窒素源の検討を行うために、米ぬか、ナタネ油粕、コーススティープリカー、脱脂大豆、廃糖蜜をそれぞれ GP 培地に使用しているハイポリペプトンの代替として添加を行い、*p*-トルアルデヒド生産菌の培養を行った。この結果、検討したいずれの培地においても、*p*-トルアルデヒドの生産を確認できた。

5. 今後の計画

p-トルアルデヒド生産菌の *p*-トルアルデヒド生合成経路を明らかにするために、今回の研究で得られた *p*-トルアルデヒド非生産株の代謝産物を LC-MS や GC-MS などを用いた解析により明らかにしていく。また、今回化学合成により得られた ^{13}C -シキミ酸を培養液に添加を行い、 ^{13}C ラベルされた *p*-トルアルデヒドが検出されるか等を調べていく。また実用化に向けて、培地条件の最適化などを引き続き実施していく。

6. 研究成果の発表

- ・第 44 回南西フォーラム（首都圏南西地域産業活性化フォーラム）招待講演、
「カーボンニュートラル社会に求められる変革と新たなビジネスチャンス」
日時：2022 年 11 月 8 日（火）、場所：青山学院大学 相模原キャンパス
- ・学内卒業研究発表会（3 件）

（参考文献）

- ・化学産業が紡ぐ 30 年後の未来社会とイノベーション戦略、公益社団法人 新化学技術推進協会（2020 年）