

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20362

研究課題名(和文) ヒト培養リンパ節の開発

研究課題名(英文) development of human cultured lymph node

研究代表者

山崎 俊 (Yamazaki, Shun)

琉球大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：60464856

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)：ヒトのリンパ節細胞の培養に成功した。頭頸部癌患者において郭清された頸部リンパ節のうち、転移のないリンパ節を一部採取し、最大18日間培養した。リンパ節組織を粉碎、洗浄濾過後に培養するとリンパ節を構成する主な細胞である血球系の細胞と間質系の細胞が培養された。本研究で、比較的容易にヒトリンパ節細胞が培養されることが証明された。さらに研究を発展させればiPS細胞などの幹細胞を用いなくても自身のリンパ節細胞からリンパ節を増殖できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We successfully cultured human lymph node cells. A portion of a lymph node without metastasis among the neck lymph nodes dissected in head and neck cancer patients was collected and cultured for a maximum of 18 days. When the lymph node tissue was pulverized, washed and cultured, the cells of the lymph node, the blood cells and the interstitial cells, were cultured. In this study, human lymph nodes cells were proved to be relatively easily cultured. Further research will show the possibility of growing lymph nodes from own node cells without using stem cells such as iPS cells.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ節 人工リンパ節 培養 ヒトリンパ節

1. 研究開始当初の背景

研究開発当初、リンパ浮腫に対する手術療法としてはリンパ管静脈吻合術と、リンパ節移植術があった。

リンパ管静脈吻合術はリンパ管から静脈にシャントを作成することにより貯留したリンパ液を排出する手術である。既に多くの報告があり、治療奏功例も多い。しかし、重度リンパ浮腫症例ではリンパ管が廃絶している事が多く、手術の効果が低くなる。

リンパ節移植術は健常部位からリンパ節の栄養血管を含めて患部に移植する方法である。リンパ節にはリンパ液を中枢に送るポンプ機能や、移植されたリンパ節からリンパ管が発生するなどの機能が報告されている。この機能により患部のリンパ還流障害を正常化させる手術である。リンパ節移植術は移植するリンパ節の大きさと量、移植部位に左右される。通常腋窩、鼠径、頸部のリンパ節を採取するが、採取部位のリンパ浮腫が問題となっている。そのため、上肢に比べて範囲の広い下肢リンパ浮腫では十分な量のリンパ節が移植できなかった。

そのため、リンパ節を人工的に培養できるようにすれば患者の少ない負担で治療が可能になると考えられ、研究を開始した。

2. 研究の目的

ヒトリンパ節からリンパ節の培養方法を開発する。リンパ節は免疫応答の場としての役割と、リンパ液を排出するポンプとしての役割がある。リンパ浮腫は癌治療におけるリンパ節廓清術の合併症であるが、近年手術治療による奏功例が見られるようになった。しかし、重度のリンパ浮腫では手術治療が難しく、理学療法が与える患者の負担も大きい。ヒトリンパ節培養に成功することで、重度リンパ浮腫の治療が可能となり、さらに癌治療に広く応用できる可能性がある。本研究はヒトリンパ節の構成細胞、基質を詳細に分析し、有効な共培養の組み合わせを検討することで、効率的な培養方法を開発する。

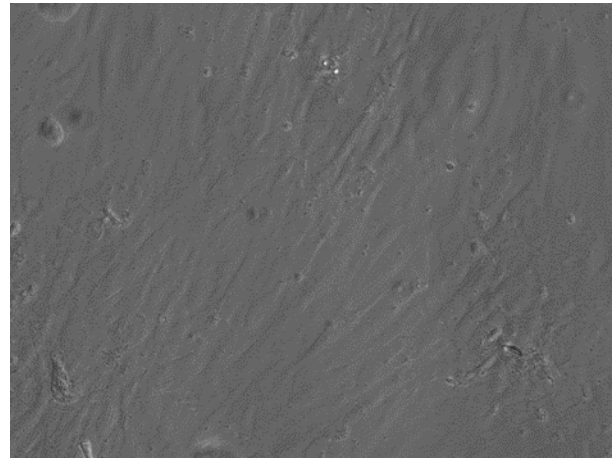
3. 研究の方法

琉球大学医学部附属病院・耳鼻咽喉科にて必要とされる頸部リンパ節廓清術を行われた患者のうち、同意を得られた患者からリンパ節の一部を採取した。リンパ節に対する病理検査は中心部の最大経となる部分で切片を作成して評価していたため、採取したリンパ節の病理検査に影響が出ないように中心より1 mm外側から2 mmの切片を採取した。採取した切片は研究代表者により簡単な洗浄が行われた後、琉球大学医学部再生医療研究センターにて受け入れた。リンパ節片は100 mmシャーレの中で引きちぎるようにしてできるだけ細かく分けた。15 mL遠沈管4本(~)に、RPMI 1640 培地 3 mL、MEM 培地 3 mL、DMEM 培地 3 mL、Tリンパ球培養キットの培地 2 mL をそれぞれ分注した。

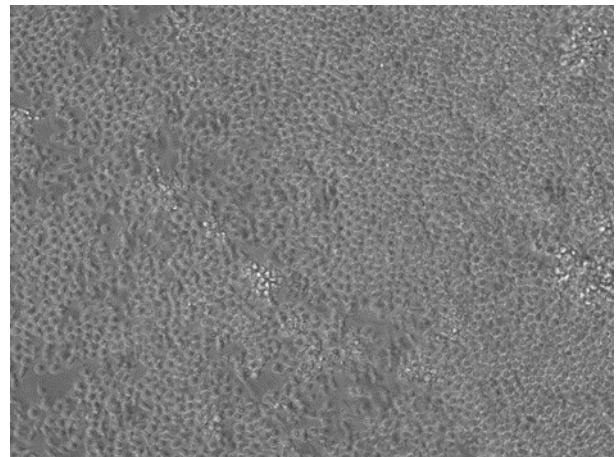
培養は24 ウェルプレートで行い、1 ウェルあたりの培地量は1.5 mLとした。37 °C、CO₂ インキュベーターで18日間培養した。培養後、4%PFAで固定し抗体染色をして、KEYENCE BZ顕微鏡で蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) 血球系細胞とストローマ細胞の分離
採取したリンパ節をD-PBS中でメスにて破碎後静置すると、静置後の沈殿物にはストローマ細胞、上清には血球系細胞が多く含まれていた。さらにRPMI1640培地では血球よりストローマ細胞の分裂がさかんになり、IL-2を含む培地では血球、ストローマ細胞とも細胞数が増加した。



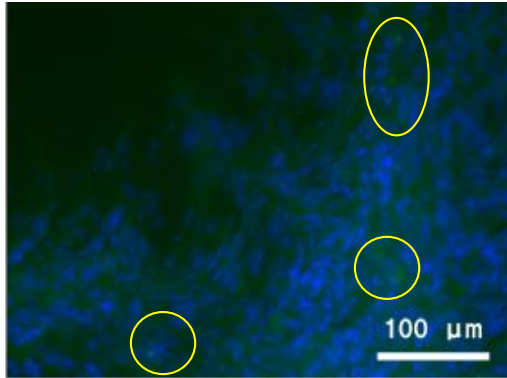
(RPMI1640 培地による培養 day14)



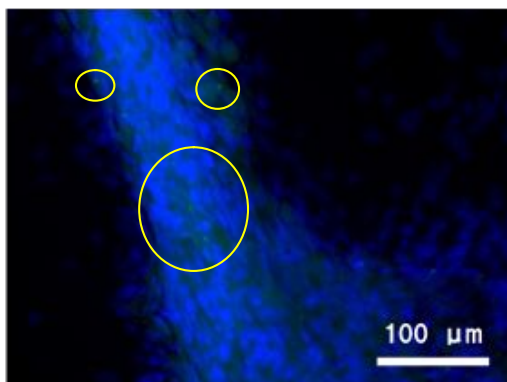
(IL-2 を含む培地による培養 day14)

(2) ストローマ細胞の確認

培養されたストローマ細胞を抗体染色したところ、濾胞樹状細胞と細網線維芽細胞を確認できた。(下図)



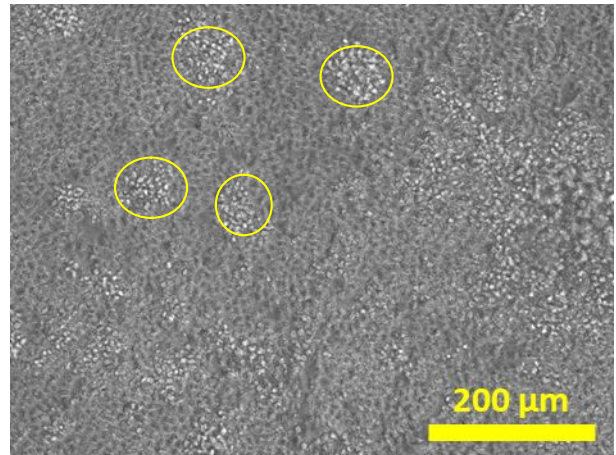
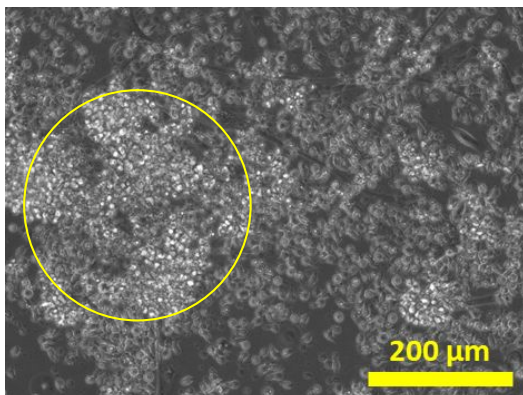
遠心後の沈殿(キットの培地で培養)
コラーゲンに播種(ウェル番号:D4)
濾胞樹状細胞(緑)+DAPI(青)



遠心後の沈殿(キットの培地で培養)
丸カバーガラスに播種(ウェル番号:C4)
細網線維芽細胞(緑)+DAPI(青)

(3) 二次リンパ組織の形成

IL-2を含む培地で共培養されたストローマ細胞と血球系細胞は培養10日目で培養細胞塊を作成した。



(Day10.14におけるIL-2を含む培地による培養 密集した細胞塊を認めた)

(4) 本研究の社会への貢献、今後の課題
ヒトリンパ節は特殊な培養環境におかなくともストローマ細胞と血球系細胞が培養されることが判明した。つまり、少量のリンパ節またはリンパ節のわずかな切片があれば、そのリンパ節の主要構成細胞を培養することが可能であることが本研究で示された。

これは将来的にiPS細胞やその他の幹細胞を使用しなくとも自身のリンパ節から比較的短時間にリンパ節を増殖させることができる可能性を示した。子宮癌や乳癌では術後リンパ浮腫のリスクがつきまとうが、本研究が今後発展されれば、リンパ節郭清された部位に患者自身の細胞から作成されたリンパ節を移植する事ができるようになり、癌治療の合併症を少なくすることができる。

今後の課題としては培養されたストローマ細胞と血球系細胞の細胞塊が体内で発育、さらに大きなリンパ節へと誘導されるかの検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

山崎 俊 (YAMAZAKI SHUN)
琉球大学・医学部・助教
研究者番号：60464856

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

角南 寛 (SUNAMI HIROSHI)
琉球大学・医学部・特命助教
研究者番号：50374723