

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11543

研究課題名（和文）脂肪組織由来幹細胞による放射線照射リンパ管内皮細胞に対するリンパ管新生効果の検討

研究課題名（英文）Examination of lymphangiogenesis effect on irradiated lymphatic endothelial cells by adipose tissue-derived stem cells.

研究代表者

吉本 浩 (YOSHIMOTO, Hiroshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：90513309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：放射線を照射したヒト脂肪組織由来幹細胞はヒト皮膚リンパ管内皮細胞の細胞増殖能、遊走能および管腔形成能を促進することが分かった。

放射線照射によりヒト脂肪組織由来幹細胞から塩基性線維芽細胞成長因子の分泌が促進され、リンパ管内皮細胞の増殖促進やリンパ管新生において最も重要な因子とされる血管内皮増殖因子-Cを活性化していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒト脂肪組織由来幹細胞はヒト皮膚リンパ管内皮細胞の細胞増殖能、遊走能および管腔形成能を促進し、さらにヒト脂肪組織由来幹細胞に放射線を照射すると効果がより高くなることが分かった。

放射線治療による四肢の二次性リンパ浮腫に対してヒト脂肪組織由来幹細胞が予防や治療に対して有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Irradiated human adipose tissue-derived stem cells (ADSC) have been found to promote cell proliferation, migration and lumenogenesis of human cutaneous lymphatic endothelial cells. Irradiation promotes the secretion of basic fibroblast growth factor from ADSC, and is thought to activate vascular endothelial growth factor-C, which is considered to be the most important factor in promoting lymphatic endothelial cell proliferation and lymphangiogenesis.

研究分野：形成外科学

キーワード：リンパ管再生 リンパ管内皮細胞 脂肪組織由来幹細胞 放射線照射 塩基性線維芽細胞成長因子

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は一次性と二次性に分類され、主として四肢に発症し、醜状変化をきたすだけでなく細菌感染や創傷治癒遷延の原因となり患者の Quality of life を著しく低下させる疾患である。二次性リンパ浮腫の中でも、本邦では特に悪性腫瘍に対する外科的リンパ節郭清および放射線照射に続発するリンパ浮腫は臨床上遭遇する機会が多い。放射線照射に起因するリンパ浮腫では、リンパ管内皮細胞 (Lymphatic endothelial cell: 以下 LEC) を放射線が直接障害するだけでなく、周囲組織の線維化を引き起こすことも重症化に拍車をかけている (Tomer Avraham, et al. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299.3: C589-C605, 2010.)

現在リンパ浮腫の治療は理学療法やストッキングによる圧迫を中心とした保存的治療が一般的だが、根治的なものではない。重症例では顕微鏡下でのリンパ管静脈吻合やリンパ節移植が行われることもあるが、手術には微小血管外科の複雑な手技を要しかつその長期的な成績には議論がある。代表者らはこれまでにヒトの放射線障害による難治性の皮膚潰瘍に対して自家脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: 以下 ADSC) を投与することにより潰瘍部治癒の促進だけでなく、血流改善や組織の質感改善を認めた (Yoshimoto H, Akita S, et al. *The Journal of Wound Technology*, 10: 22-2, 2012)。このような作用は ADSC が直接血管などに分化した結果ではなく、ADSC が各種の細胞増殖因子などを放出する paracrine effect によるものと考えられている。近年リンパ浮腫に対しても ADSC を投与することでリンパ管新生を誘導しようとする試みがあるが、そのメカニズムは完全には解明されていない。

動物実験ではすでにマウスの二次性リンパ浮腫モデルに対して ADSC を投与することでリンパ浮腫が改善したとの報告がある (Yoshida, et al. *Regenerative medicine* 10.5: 549-562, 2015.) が、これは主に血管内皮細胞増殖因子の中でもリンパ管新生を最も強く促進するとされる Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) による作用と考えられている。一方、ADSC を LEC の基礎培地である endothelial basal medium-2 で培養し、作成した馴化培地で LEC を培養すると、VEGF-C を基礎培地に添加し培養するよりも、LEC の細胞増殖、細胞遊走および管腔形成能が優れていたという in vitro での実験における報告もあり (Takeda, et al. *Annals of plastic surgery* 74.6: 728-736, 2015.)、ADSC は VEGF-C 以外にもリンパ管新生を促進する因子を分泌しそれらが相乗的に影響していると考えられる。しかしリンパ管新生を促すのが ADSC から分泌される因子の影響だけであるのか、つまり ADSC が LEC 自体に直接的に作用する可能性についても未だないとは言い切れないという点で証明されておらず ADSC のリンパ管新生メカニズムは完全には解明されていない。

2. 研究の目的

悪性腫瘍に対する放射線治療は、リンパ管内皮細胞を障害し四肢のリンパ浮腫を引き起こすことがある。リンパ浮腫は難治性で、その治療法は確立されていない。近年動物でのリンパ浮腫モデルに対して脂肪組織由来幹細胞を投与することにより、リンパ管の新生および浮腫の改善を認めるとの報告がある。しかしそのリンパ管新生に果たす役割については未だ不明な点も多い。代表者のこれまでの研究成果からは、脂肪由来幹細胞が paracrine effect によって血管新生や創傷治癒促進効果を有することが明らかになっている。本研究では放射線を照射したリンパ管内皮細胞と脂肪由来幹細胞を共培養することで、リンパ管新生メカニズムにおいて脂肪由来幹細胞が果たす役割の一端の解明が期待される。

3. 研究の方法

- (1) 放射線照射を行った LEC と ADSC を直接共培養と間接共培養の 2 通りの方法で共培養し、細胞増殖、細胞遊走や管腔形成能が改善するかどうかを確認する。
- (2) 放射線照射を行った ADSC から産生されたタンパク質を ELISA 法で確認する。

4. 研究成果

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) とガンマ線を照射あるいは照射していないヒト脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) を共培養して、HDLEC の細胞増殖能、遊走能および管腔形成能を解析した。ADSC との共培養や馴化培地を用いた培養は HDLEC の単独培養と比較して、HDLEC の増殖、遊走および管腔形成能を促進した。(図 1) ガンマ線を照射した照射

ADSC との共培養が、非照射 ADSC との共培養より HDLEC の細胞増殖能をより促進した。次に各種線量のガンマ線を ADSC に照射して、培地中へ放出される細胞増殖因子を測定し解析し、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、血管内皮増殖因子-A(VEGF-A)、血管内皮増殖因子-C(VEGF-C)、肝細胞増殖因子(HGF)およびインスリン成長因子 1 (IGF-1)の各種リンパ管成長因子が分泌されることを確認した。(図 2) これら成長因子の中でも bFGF の発現はガンマ線照射によって増強し、その発現量が照射線量に依存して増加することも見出した。これらの結果から ADSC からの分泌因子がリンパ管新生促進効果に関与していると考えられた。照射した ADSC から bFGF の発現が増加しているが、bFGF はリンパ管内皮細胞の増殖促進やリンパ管新生において最も重要な因子とされる VEGF-C を活性化していると考えられ、本研究により、放射線治療による四肢の二次性リンパ浮腫に対して ADSC を用いた治療戦略が有効である基盤原理が証明された。

図 1

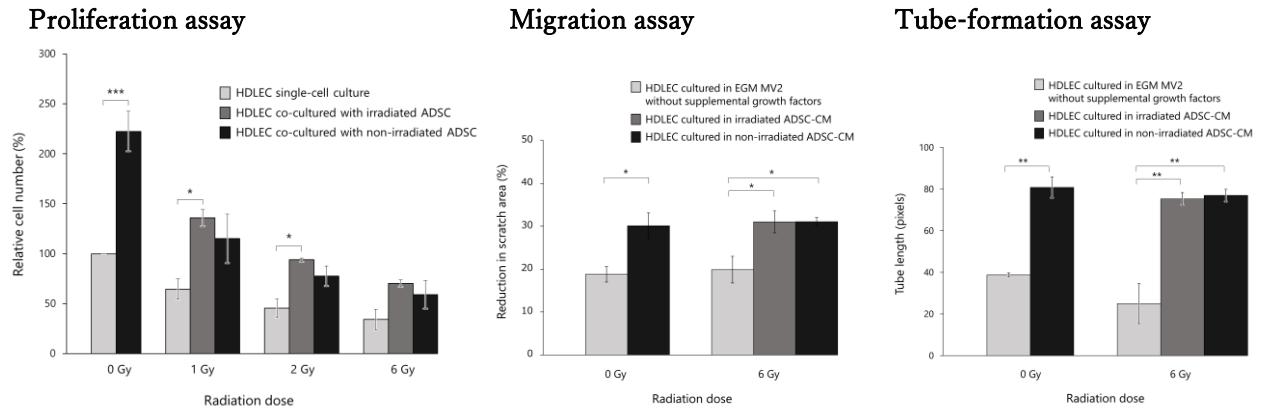
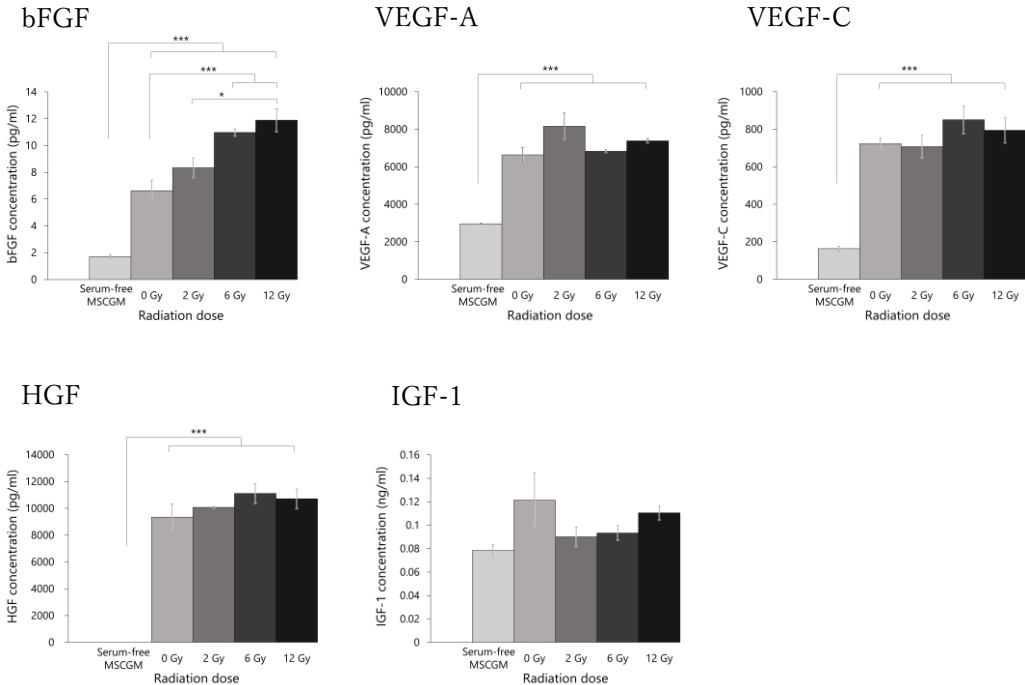


図 2

ELISA



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saijo H, Suzuki K, Yoshimoto H, Imamura Y, Yamashita S, Tanaka K.	4. 巻 143(6)
2. 論文標題 Paracrine Effects of Adipose-Derived Stem Cells Promote Lymphangiogenesis in Irradiated Lymphatic Endothelial Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg.	6. 最初と最後の頁 1189e-1200e
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.0000000000005669.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西條 広人、吉本 浩、今村 禎伸、田中 克己
2. 発表標題 放射線照射が脂肪組織由来幹細胞のリンパ管新生効果および成長因子分泌能に与える影響
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Yoshimoto, Hiroto Saijo, Yoshinobu Imamura, Katsumi Tanaka
2. 発表標題 Paracrine effect of adipose-derived stem cell promote lymphangiogenesis in irradiated lymphatic endothelial cells
3. 学会等名 41st Annual Boswick Burn & Wound Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西條 広人、吉本 浩、今村 禎伸、田中 克己
2. 発表標題 放射線照射が脂肪組織由来幹細胞のリンパ管新生効果に与える影響
3. 学会等名 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大石 正雄 (OISHI Masao) (90751230)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------