

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19649

研究課題名（和文）血小板活性化受容体CLEC-2を標的とした癌手術後リンパ浮腫の予防法

研究課題名（英文）Prophylaxis of lymphedema after cancer surgery by targeting the platelet activation receptor CLEC-2

研究代表者

井上 克枝（SUZUKI-INOUE, Katsue）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10324211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：癌手術後にリンパ浮腫が生じるが、有効な治療はない。下肢皮膚全周切開、リンパ節除去、ラバーバンドを装着する術後リンパ浮腫モデルを作製した。血小板活性化受容体CLEC-2を欠損したマウスは、浮腫が有意に抑制された。CLEC-2は胎生期にリンパ管と血管の分離を促進する。切断されたリンパ管や毛細血管が伸長する際、CLEC-2非存在下では血管リンパ管吻合が生じ、リンパ液貯留が抑制されると考えた。CLEC-2は術後リンパ浮腫予防薬の標的となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌手術時に広範囲にリンパ節郭清を行うと高率に術後リンパ浮腫が生じる。リンパ浮腫が慢性化すると、線維化、象牙化へと進み、QOLを著しく阻害するばかりでなく、蜂窩織炎や肉腫を発症することもある。患者数は12万人とも言われ、有効な治療・予防法はない。本研究で、血小板活性化受容体CLEC-2は術後リンパ浮腫予防薬の標的となり得る可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Lymphedema frequently occurs after surgery, but there is no effective therapy. We made model mice of lymphedema after surgery by annular incision of the lower limb, followed by lymph node dissection and rubber band attachment. We found that lymphedema was significantly inhibited in the absence of a platelet activation receptor, CLEC-2. Because CLEC-2 facilitates blood/lymphatic vessel separation during development, deletion of CLEC-2 causes lymph/blood anastomosis during wound healing after surgery, thereby retention of lymphatic fluid is inhibited. CLEC-2 may be a candidate of a drug target for lymphedema after surgery.

研究分野：血小板生物学、血栓止血学

キーワード：術後リンパ浮腫 血小板 CLEC-2 ポドブラニン リンパ管内皮 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の術後リンパ浮腫患者は約 12 万人といわれており、年々増加している。リンパ浮腫が慢性化すると、線維化、象皮化へと進み、QOL を著しく阻害したり、蜂窩織炎を繰り返すこともあるが、有効な根治療法も予防法もない。応募者らが血小板上に同定した受容体、C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) は、胎生期にリンパ管が血管の一部から出芽して形成される際、リンパ管内皮のポドプラニンと結合して血小板を活性化し、TGF- β を放出してリンパ管内皮の増殖や遊走を強力に抑制することで、リンパ管と血管の分離を促進する。応募者らは、リンパ節郭清術後にリンパ管が伸長しようとする際も、リンパ管内皮のポドプラニンと血小板 CLEC-2 が結合し、TGF- β が放出されてリンパ管内皮の増殖や遊走が低下し、リンパ管の伸長が抑制されることがリンパ浮腫の一因ではないかとの仮説を立てた。この仮説が正しければ、血小板 CLEC-2 とリンパ管内皮のポドプラニンの結合を抑制すれば、血小板活性化とそれに続くリンパ管伸長抑制因子の放出が抑えられ、リンパ管伸長が促進されてリンパ浮腫が防止できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗 CLEC-2 薬のリンパ浮腫予防薬としての開発を目指し、術後リンパ浮腫モデルマウス、リンパ管血管吻合動物モデルを使用して、CLEC-2 阻害低分子化合物や抗 CLEC-2 抗体のリンパ浮腫予防効果について検討することである。

3. 研究の方法

4 つのリンパ浮腫モデルを、抗体による CLEC-2 除去マウス、あるいは CLEC-2 欠損放射線照射骨髄キメラマウスで検証し、CLEC-2 の術後リンパ浮腫における役割を検証した。

CLEC-2 欠損モデルマウス

(1)抗体による CLEC-2 除去マウス：抗 CLEC-2 抗体(2A2B10)を 8 μ g/gBW を腹腔内投与すると、一過性の血小板減少の後、4 日後に血小板数が回復する。その際 **internalization** や **shedding** により巨核球や血小板上から、CLEC-2 が消失する。7 日おきに抗体投与を回復すると 1 か月程度、血小板減少を伴わずに CLEC-2 欠損状態を維持できる。

(2)放射線照射骨髄キメラマウス：放射線照射により骨髄を破壊した **SW** の野生型マウスに、**E14.5** の血小板巨核球特異的 CLEC-2 欠損マウス(CLEC-2 **fl/fl** PF4)胎仔肝細胞あるいは対照マウス(CLEC-2 **fl/fl** WT)胎仔肝細胞を尾静脈投与し、8 週以降骨髄に生着した後に実験に使用する。

リンパ浮腫モデルマウス

(1) 尾部環状切開法：CLEC-2 を欠損させた際の浮腫の程度を対照と比較した。抗 CLEC-2 抗体あるいはコントロール IgG 抗体を投与して 4 日後のマウス(各 6-7 匹)に、上記環状切開を加えて、7 日後、10 日後の浮腫の程度を、焼灼部位より 2 mm 下部の最大径としてノギスにて測定した。対照として、上記の手術を加えないマウス(3 匹)の尾部同部位の厚みも計測した。

(2) 下肢皮膚全周切開法 **with** 鼠経・座骨リンパ節除去¹：抱水クロラールを腹腔内投与して麻酔後、2%エバンスブルー(EB)を下肢に皮下注射してリンパ節を可視化する。下肢の皮膚を 3 mm 幅で全周切開する。鼠経と座骨リンパ節を除去後、皮膚を縫合して、下

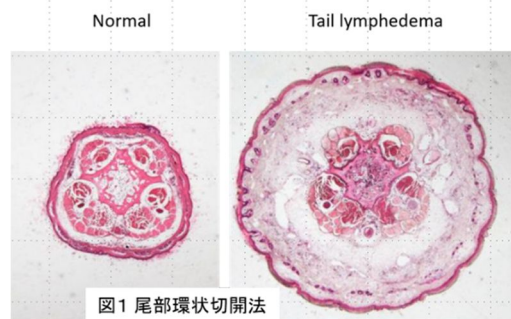
肢周径の測定で浮腫の程度を評価し、リンパ管造影でリンパ管開通を検証した。リンパ管造影は、FITC-デキストランを **foot pad** から注射し、蛍光実体顕微鏡で可視化した。

(3) 下肢皮膚全周切開法(2) with 放射線照射： マウスを鉛で覆い、右下肢のみを露出した状態で、**5 Gy** あるいは **30 Gy** の放射線を照射した後、(2)の処置を行う。さらに、処置の前後で **2.5 Gy** の放射線照射についても検証した。

(4) 下肢皮膚全周切開法(2) with ラバーバンド：

(2)の皮膚縫合前に **3 mm** 幅のラバーバンドを創部に装着し、皮膚と筋肉に縫合固定する。

(5) 腋窩・鼠経リンパ節切除法²： マウスの腹部に切開を加え、観音開きのように皮膚を剥離する。腋窩と鼠経リンパ節を除去した後、皮膚を縫合し、浮腫の程度を **HE** 染色で検証する。



4. 研究成果

(1) 環状切開を加えたマウスの尾部で浮腫が認められ(図1)(3.042-5.051 mm) **CLEC-2** 除去マウスで浮腫の有意な軽減(**P<0.05**)が認められた。しかし、別の術者では差が認められず、ばらつきが大きかった。

(2) 下肢皮膚全周切開法 with 鼠経・座骨リンパ節除去：リンパ節除去の有無にかかわらず、下肢の腫脹が **2,3** 日ですぐに消失し、持続しなかった。



(3) 下肢皮膚全周切開法 with 放射線照射： **30Gy** では筋肉の萎縮が生じ、**5 Gy** では創傷治癒が生じなかった。また、両者とも腫脹も生じなかった。

(4) 下肢皮膚全周切開法 with ラバーバンド：野生型骨髄キメラマウス(WT)と血小板特異的 **CLEC-2** 欠損骨髄キメラマウス(PF4)を **10** 匹ずつ作製し、本術式を行い(図3)、**day0-14** まで後肢の周径を測定した。術後 **3** 日目までの急性期の周径に差はなかったが、**day 5-10** で **CLEC-2** 欠損キメラで有意に周径が減少した(図4)。



21 日後の野生型キメラのリンパ管造影では、集合管は造影されなかったが、皮膚毛細リンパ管は造影された。しかし、切開線より頭側では造影されず(図5 WT Day 21 Left)、毛細リンパ管は再開通していないと考えられる。PF4では、皮膚毛細リンパ管も集合管もがほとんど造影されなかった(図5 KO Day21 Left)。一方、健側では **WT, PF4** とも、集合管とリンパ節が造影された(図5 WT/KO Day21 Right)。

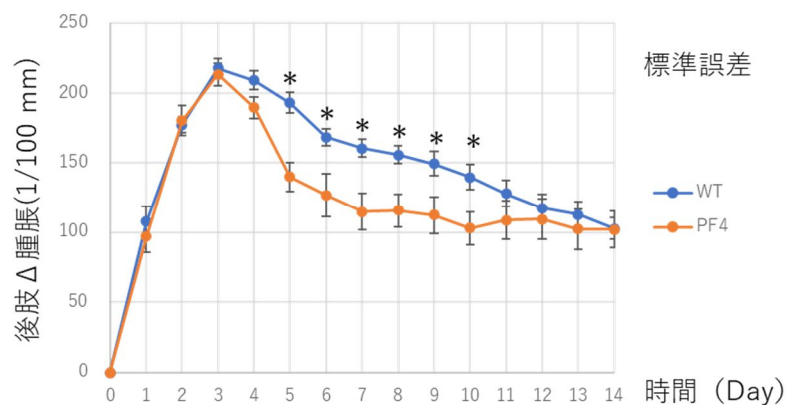


図4 尾部環状切開術 (ラバーバンド付) 施行後の浮腫

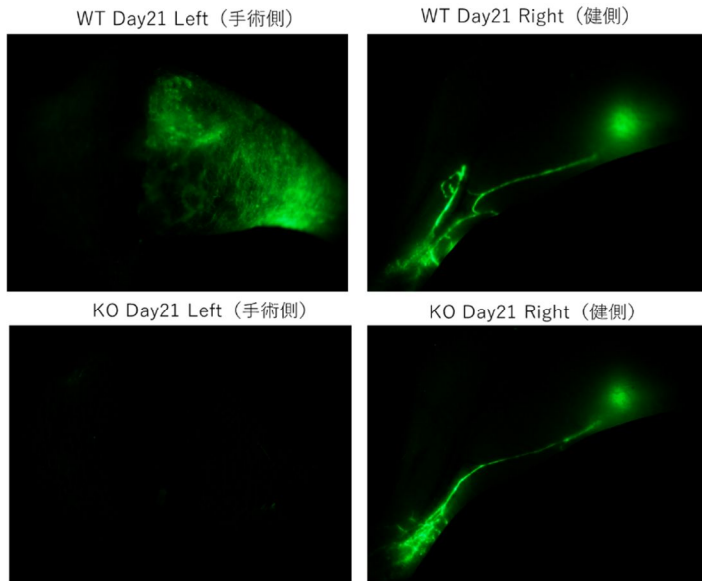


図5 尾部環状切開術（ラバーバンド付）施行後のリンパ管造影

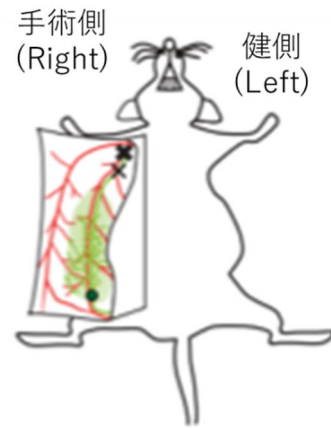


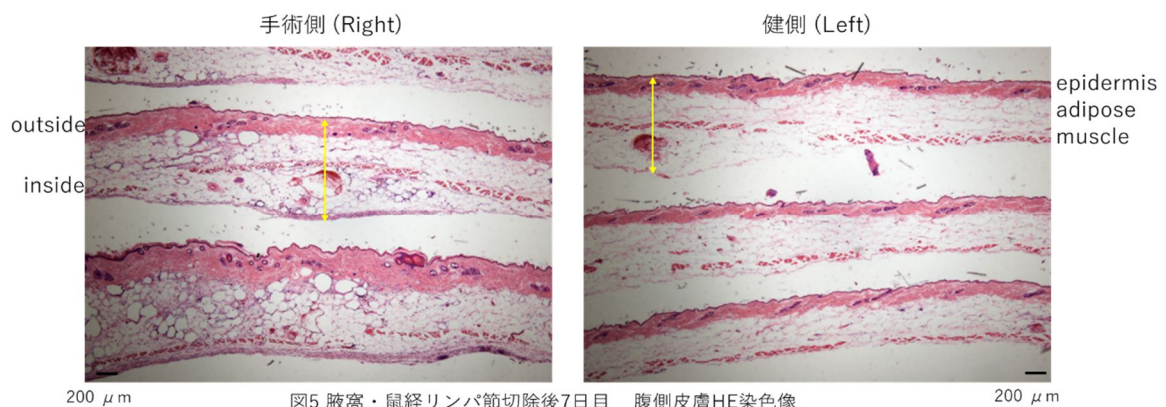
図6 腋窩・鼠経リンパ節切除術

(5) 腋窩・鼠経リンパ節切除：図6の手術を加え、7日後にHE染色

を行ったところ、文献の通り、浮腫による皮膚厚の増加、有核細胞の増加が認められた(図7)。しかし、定量化がやや困難であり、本モデルは使用しないこととした。

文献 1. Dai T, et al. *Int J Clin Exp Med* 2016;9:7565-7572

2. Ogata F, et al. *J Invest Dermatol.* 2016;136:706-14.



200 μm

図5 腋窩・鼠経リンパ節切除後7日目 腹側皮膚HE染色像

200 μm

考察

術後浮腫の程度、安定性、定量化のしやすさを考慮して、ラバーバンド付き下肢皮膚全周切開法が最も良い術後リンパ浮腫モデルと考えられた。ラバーバンドにより切開部分の両側でリンパ管の再開通が阻止され、浮腫が生じると考えられた。術後2,3日後までの腫脹は手術侵襲による急性炎症と考えられ、野生型キメラ(WT)と CLEC-2 欠損キメラ(PF4)で差はなかった。5日目以降の腫脹が術後浮腫と考えられ、CLEC-2 欠損で有意に浮腫が軽減されていた(図4)。CLEC-2 欠損で、浮腫が軽減されているにもかかわらず、リンパ管が全く造影されなかった。これは、毛細リンパ管と血管に交通が生じ、FITC-デキストランが急速に血管に流入して消失していると考えられた。血小板 CLEC-2 は胎生期にリンパ管と血管の分離を促進する。遺伝的 CLEC-2 欠損マウスではリンパ管と血管の分離不全により、血液がリンパ管に流入する。手術で損傷を受けた毛細血管やリンパ管の再生時に、リンパ管と血管の吻合が生じ、リンパ流が血管に直接流入するため、浮腫が軽減し、リンパ管造影もされない可能性がある。この結果は私達の仮説を支持する結果であるが、骨髄キメラマウス作製時より吻合が生じていた可能性も考え、今後、抗 CLEC-2 抗体による CLEC-2 除去マウスでも検討する必要がある。また、リンパ管造影も FITC-デキストラン注入直後からリアルタイムで行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学臨床検査医学講座のホームページ
<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin01ab/>

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	百澤 明 (MOMOSAWA Akira) (90383679)	山梨大学・大学院総合研究部・特任教授 (13501)	