

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08165

研究課題名（和文）リンパ管を標的とした新たな胸膜炎治療の検討

研究課題名（英文）Research on new pleurisy treatments targeting lymphatic vessels

研究代表者

小林 誠（Kobayashi, Makoto）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10644809

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）：胸水は胸膜の血管から産生されリンパ管から排液されるが、そのバランスが崩れることで

胸水貯留がおこる。炎症や癌により胸水は貯留するが現状の治療では制御が不十分である。胸水貯留に対し血管透過性など血管の報告は少数あるが、胸水排液の中心であるリンパ管の報告は殆どない。本研究では胸膜のリンパ管に着目し治療標的となりえるかについて検討をおこなった。胸腔内に肺癌細胞を投与した癌性胸水マウスと、細菌由来毒素を投与した炎症性胸水マウスの胸膜リンパ管ではリンパ管径の拡張がみられた。癌性胸水マウスでは胸水の排液が遅延する傾向がみられた。リンパ管新生阻害剤により胸水量が減少する傾向がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌や炎症性疾患に伴う胸水の治療はいまだ不十分なため、多くの患者さんに呼吸困難などの症状を残し生活の質を下げている。胸水は胸膜の血管からつくられリンパ管から排出されるが、疾患によりそのバランスが崩れることで貯留する。リンパ管による排出不全の関与はこれまでほとんど研究されておらず、新規治療対象になるのではないかと着目した。悪性胸水モデルではリンパ管の拡張と排液遅延がみられ排液不全が推定された。リンパ管新生阻害剤は有意差は見られなかったが胸水量を減少させる傾向がみられた。

研究成果の概要（英文）：Pleural effusion is produced by blood vessels in the pleura and drained from lymphatics, but when the balance is lost, it accumulates. Causes include inflammation and cancer, but current treatments are still poorly managed. There are a few reports of blood vessels such as vascular permeability for effusion, but there are few reports of lymphatics, which are the center of effusion drainage. In this study, we focused on the lymphatics of the pleura and investigated whether they could be therapeutic targets. We created a cancerous pleural effusion model in which lung cancer cells were administered into the thoracic cavity and an inflammatory pleural effusion mouse in which a bacterial toxin was administered. Evaluation of the lymphatics in the pleura of each model revealed dilation of the lymphatic vessel diameter. The cancerous pleural effusion model tended to delay pleural effusion drainage. Lymphangiogenesis inhibitors tended to reduce pleural effusion.

研究分野：リンパ管新生

キーワード：リンパ管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌等による癌性胸水は、呼吸困難等で癌患者の生活の質や予後を悪化させる。また慢性膿胸など炎症性疾患に伴う炎症性胸水も、難治性となることが多々ある。これらの胸水に対する現行の治療法は、姑息的な胸腔ドレナージと薬剤による胸膜癒着だが、胸腔ドレナージチューブ留置と人工的な炎症惹起による苦痛も強く、成功率も高くはない。そのため新規治療方法が必要とされている。申請者らはこれまで呼吸器や癌のリンパ管を研究してきた。そこで胸水排出を担い、その異常が胸水貯留の主要な原因となると成書に記載されている胸膜リンパ管に着目した。すると従来、正常解剖の報告すら殆どない事が判明した。そこで(1)正常胸膜リンパ管の構造とは?(2)癌により胸膜リンパ管は病理学的にどのように変化するか?(3)炎症によりリンパ管がどのように変化するか?(4)これらの変化は胸水を貯留させるのか?(5)リンパ管新生阻害はリンパ管を正常に保ち、胸水貯留の新規治療法となりえるのか?の着想に至った。

2. 研究の目的

今回の研究ではマウスにおける横隔膜リンパ管の解析、癌性胸水/炎症性胸水モデルにおける横隔膜胸膜リンパ管の変化の解析、リンパ管新生阻害剤投与の効果解析し新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

正常マウスにおいて以下を解析する

(1) 横隔膜上胸膜内リンパ管の構造解析

C57BL/6 マウスに麻酔をかけパラホルムアルデヒドで全身を還流し横隔膜を取り出す。横隔膜の whole mount (図2)でリンパ管(毛細リンパ管のみ)を抗 LYVE-1 抗体、リンパ管(すべてのリンパ管)を抗 Podoplanin 抗体、リンパ管周囲の平滑筋を抗 - smooth muscle actin (SMA) 抗体、リンパ管の弁を抗 integrin 9 抗体で染色する。共焦点顕微鏡を用いて撮影し、それぞれのリンパ管の分布の評価を行う。

(2) 胸膜内リンパ管のリンパ流の解析

リンパ流の方向はリンパ管に取り込まれる色素の evans blue やリンパ管に流入する直径 0.047 μm の緑色蛍光 microsphere を胸腔内に投与して確認する。胸腔内に evans blue を投入し 10、30 分後等に安楽死させて横隔膜リンパ管や胸管、リンパ節等の染色からリンパ流の方向を確認する。同様に microsphere を胸腔内に投与して免疫細胞の動きと見なし細胞の移動方向を解析する。

癌性胸水/炎症性胸水モデルで以下を解析する。

癌性胸水モデルは C57/B6 マウスに麻酔後、肋間筋を小切開し、胸腔へ 24G サーフロー針留置後、5万/200 μl PBS に調整したルイス肺癌細胞(Lewis Lung carcinoma Cells :LLC)を1回投与し作成する。炎症性胸水モデルは胸腔内に 50 μg /200 μl PBS に調整した LPS を週2回投与し作成し 11 日後に胸膜を採取する。

(3) 癌や炎症によるリンパ管内皮の増殖の評価

採取した胸膜をリンパ管のマーカーと細胞分裂マーカー抗 PH3 抗体を用いて免疫染色する。抗 PH3 抗体の発色強度を定量化してコントロールと比較しリンパ管増殖の有無を解析する

(4) リンパ管内皮同士や平滑筋の接触が疎になることによるリンパ管の易漏出性の確認

リンパ管のマーカーとリンパ管内皮接着分子の VE-cadherin や occludin を免疫染色する。接着分子の発色強度を蛍光顕微鏡上で image J ソフトウェアを用いて定量化し、コントロールと比較する。そして胸膜リンパ管内皮同士の接着分子の発現が癌や炎症で変化するか解析する。また evans blue を胸腔内に投与しリンパ管のドレナージ機能やリンパ液の流れを調べる。最終的に evans blue は血流に入るが、血中濃度をコントロールと比較することでリンパ管の輸送機能を評価する。

(5) (癌性胸水モデルのみ) 癌細胞でリンパ管が閉塞しているかの確認

赤に蛍光発色する LLC を用いて悪性胸水モデルを作成し、リンパ管、胸管、リンパ節において癌細胞が閉塞していないか等、胸部リンパ系における癌細胞の分布を確認する。

(6) リンパ管新生阻害剤や血管新生阻害剤併用の治療効果の検討

それぞれの胸水モデルに VEGFR-3 阻害剤である SAR131675 (リンパ管新生阻害剤)や sunitinib (VEGF-R2, VEGF-R3 阻害: 血管新生阻害とリンパ管新生阻害、c-kit 阻害: mast cell 阻害)を週に5日間、経胃管投与をして胸水が減るか、症状が軽快するかを胸水量やマウスの酸素飽和度を計り評価する。

(7) ヒトへの臨床応用可能かの検討

倫理委員会の認可後 sunitinib 投与胸水症例への効果を院内の当該科と共同研究で検証し、次に肺癌胸水貯留症例への投与を申請する。

4. 研究成果

(1) 横隔膜上胸膜内リンパ管の構造解析

横隔膜を取り出し、横隔膜を抗 LYVE-1 抗体(毛細リンパ管のみ)、抗 Podoplanin 抗体(すべてのリンパ管)、抗 - smooth muscle actin (SMA) 抗体(リンパ管周囲の平滑筋)、リンパ管の弁を抗 integrin 9 抗体で染色を試みた。

横隔膜筋膜上はすべてが抗 LYVE-1 抗体陽性のリンパ管であり、抗 SMA 陽性の平滑筋の被覆はみられなかった。横隔膜腱膜の一部で平滑筋の被覆がみられた。これらから正常横隔膜では筋膜上は毛細リンパ管、腱膜には集合リンパ管が分布していることが判明した。リンパの流れは筋膜から腱膜の方向が推定された。他、抗 Podoplanin 抗体は複数回条件を変更し再評価を施行したが、うまく染色ができなかった。抗 integrin 9 抗体も染色がうまく行えず弁の評価はできなかった。

(2) 胸膜内リンパ管のリンパ流の解析

胸腔内に Evans blue を投入し 10、30、60 分後に安楽死させて横隔膜リンパ管や胸管、リンパ節等の染色からリンパ流の方向の確認を試みた。Evans blue は時間差がみられなかったが、microsphere は 60 分後に排出がみられた。これらの結果より胸腔からリンパ管への流れは比較的長くかかることが示唆された。

・疾患モデル(癌性胸水モデル、炎症性胸水モデル)におけるリンパ管の検討

癌性胸水モデルは既報を参考に C57/B6 マウスに 5 万/200 μ l PBS に調整した Lewis 肺癌細胞(Lewis Lung carcinoma Cells :LLC)を 1 回投与、炎症性胸水モデルは胸腔内に 50 μ g/200 μ l PBS に調整した LPS を週 2 回投与し作成した。癌性胸水モデルでは悪液質の進行による死亡率が高かったため癌細胞投与量を減らして調整したが(5 万/200 μ l 2.5 万/200 μ l 1 万/200 μ l)、やはり同様であった。炎症性胸膜炎モデルでは死亡率は低かったものの、胸膜のリンパ管変化にむらがみられたため反復してモデルを作成した。

(3) 癌や炎症によるリンパ管内皮の増殖の評価

胸膜炎モデルのリンパ管内皮の増殖の評価を行うため、採取した胸膜をリンパ管のマーカー(抗 LYVE1 抗体)と細胞分裂マーカー抗 PH3 抗体を用いて免疫染色した。いずれも形態的にはリンパ管径の拡張がみられたが、抗 PH3 抗体の発色強度はコントロールと比較し有意差はみられなかった。

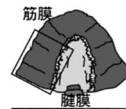
(4) リンパ管内皮同士や平滑筋の接触が疎になることによるリンパ管の易漏出性の確認

リンパ管のマーカー(抗 LYVE1 抗体)とリンパ管内皮接着分子の VE-cadherin と occludin を免疫染色したが、コントロールと比較し有意差は見られなかった。リンパ管の易漏出性の確認するため、Evans blue をマウス胸腔内に投与しリンパ管のドレナージ機能やリンパ液の流れを調べた。Evans blue の血中濃度をコントロールと比較することでリンパ管の輸送機能を評価した。悪性胸水モデルでは Evans blue の血中濃度が低下する傾向がみられたが有意差は得られなかった。炎症性胸水モデルではコントロールと比較し差はみられなかった。

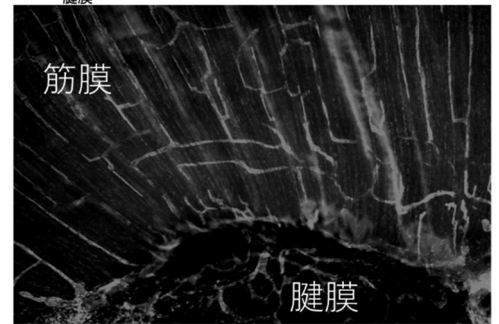
(6) リンパ管新生阻害剤や血管新生阻害剤併用の治療効果の検討

ドレナージ機能低下が示唆された悪性胸水モデルに sunitinib を週に 5 日間経胃管投与をして胸水量が減少するか血中酸素濃度が軽快するかを評価した。当初は死亡率が高く評価が困難であった。週に 3 回投与に減量して検討したところ、やや胸水量の減少傾向がみられたが有意差は得られなかった。他薬剤については期間内に検討できなかった。

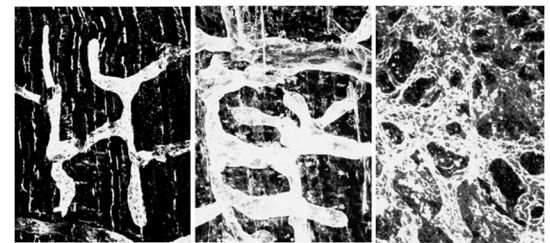
当初予定していた(5)(癌性胸水モデルのみ)癌細胞でリンパ管が閉塞しているかの確認、(7)ヒトへの臨床応用可能かの検討については期間内に実施することができなかった。



□ LYVE-1 (lymphatics)



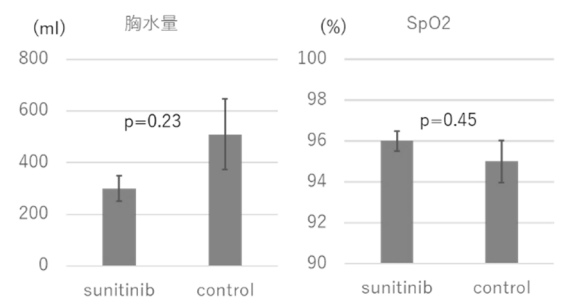
- ・リンパ管は腱膜から筋膜へ放線状に分布
- ・リンパ流は腱膜から筋膜の方向



Control

癌性胸水

炎症性胸水



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〕

-

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	岡崎 達馬 (Okazaki Tatsuma) (40396479)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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