

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16977

研究課題名(和文) プラズマ止血と抗線維化抗体がもたらす新たなリンパ浮腫治療

研究課題名(英文) The novel lymphedema treatment using the plasma hemostasis and the antifibrosis antibody

研究代表者

山路 佳久 (Yamaji, Yoshihisa)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80400951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ鬱滞マウスモデルにおいて血管リンパ管付きリンパ節移植は有意にリンパ取り込みを構築し、線維化は抑制された。また、CD69欠損マウスを用いてリンパ鬱滞下の状態でのCD69陽性炎症細胞の役割を調べたところ、CD69欠損マウスでの腹部リンパ鬱滞状態下では、通常よりもリンパ新生、線維化の形成の抑制を認めた。CD69欠損により炎症が抑制され、それに続くリンパ新生、線維化が抑制されていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫の発症や、外科治療による改善効果の阻害因子として考えられる局所炎症とそれに引き続き生じる組織の線維化に、CD69炎症細胞とmyI9結合が大きな役割を果たしている可能性が示唆された。本研究はリンパ流障害後の創傷治癒過程の解明につながると考えられ、またリンパ浮腫の予防や抗炎症細胞抗体投与といった新たな治療開発の発展につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Vascularized lymph node transplantation with lymph vessels significantly constructed lymphatic uptake and suppressed fibrosis in lymphatic stasis model mice. CD69-deficient lymphatic stasis mice were created to investigate the role of CD69-positive inflammatory cells in the state of lymphatic stasis. The formation of lymphangiogenesis and fibrosis was more suppressed in CD69-deficient lymphatic stasis mice than control m. It was suggested that inflammation was suppressed by CD69 deficiency, and subsequent lymphangiogenesis and fibrosis were suppressed.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 CD69 リンパ鬱滞 線維化 リンパ管新生 リンパ節 myI9

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫はリンパ流の閉塞、停滞に起因しているため、保存治療、外科治療ともに流れを回復する治療に主眼が置かれている。リンパ管細静脈吻合、血管柄付きリンパ節移植といった外科治療が盛んに行われるようになったが、リンパ浮腫はいまだ治癒可能な疾患とはなっておらず、術前に治療効果の予測も可能となっていない。その要因としては、外科侵襲およびリンパ浮腫外科治療におけるリンパ循環と血液循環の短絡が、局所炎症と引き続き生じる組織の線維化を引き起こし、リンパ流の回復障害を生じうると考えられる。リンパ節郭清後の急性期の状態や慢性期リンパ浮腫に対する外科治療後のいずれにおいても、組織損傷からの治癒過程で組織の線維化が惹起され、筋線維芽細胞が増殖するにもかかわらず、リンパ鬱滞環境下での線維化並びに成熟リンパ管の新生障害の病態は解明されていない。一方、炎症を抑えるという観点では、近年慢性炎症に引き続く線維化に CD69 陽性炎症細胞と活性化された血小板から放出される Myosin light chain (myl)9 の結合が重要な役割を持つことが明らかになっており、CD69 と myl9 分子の相互作用を阻害する抗体により慢性炎症性疾患である喘息の治療効果が示されている。また、連携研究者の開発したプラズマ止血技術は組織障害が少なく、創傷治癒過程における線維化の防止効果が高いことが示されている。リンパ流障害後の創傷治癒過程の解明と改善がリンパ浮腫の予防と新たな治療開発に必要な鍵となるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚皮下組織における炎症状態での CD69 と myl9 分子の働き、そしてリンパ鬱滞環境でのリンパ新生に果たす役割を解析し、プラズマ止血と抗線維化抗体による抗線維化治療といったモダリティによりリンパ管新生、リンパ浮腫改善に与える効果を検討し、慢性リンパ浮腫の病態の解明とリンパ浮腫治療の新技術の確立を達成することである。我々はマウスにおいて腹部リンパ鬱滞モデルの作成を行っており (Yamaji Y, Scientific Reports 2018)、CD69 欠損マウスに同モデル作成技術を用いることで生体での研究を行う。また、急性期の皮膚皮下組織炎症の代表となる熱傷の臨床例において、炎症状態での CD69/myl9 の変化を観察する。

3. 研究の方法

(1)リンパ鬱滞モデルマウスを用いて、血管リンパ管付きリンパ節移植とリンパ管なしリンパ節移植による線維化、リンパ管新生の差異を確認し、リンパ流路の有無がリンパ節移植においてどのように影響を及ぼすか観察する。

(2)CD69 欠損マウスを用いてリンパ流鬱滞モデルを作成し、線維化とリンパ管新生の通常のマウスとの差異を検討する。EVG 染色、SMA 染色、抗ポドプラニン抗体染色等により線維化とリンパ管新生を評価する。リポソーム化蛍光色素と蛍光イメージングシステムを用いて、リンパ流の量的評価を行う。また、血管柄付きリンパ節移植を行い、生じる線維化とリンパ管新生を観察する。

(3)体表面の急性炎症を引き起こす臨床での熱傷症例において、myl9 血漿中濃度の経時的な変化を測定し、皮膚皮下組織での急性炎症が及ぼす影響を観察する。

4. 研究成果

リンパ鬱滞マウスモデルにおいて、血管リンパ管付きリンパ節移植群の方がリンパ管なしリンパ節移植群よりも線維化が少ない結果であった。また、リンパ節周囲に抗ポドプラニン染色により同定されるリンパ新生を多く認め、下肢から投与したリポソーム化蛍光色素の移植リンパ節取り込みへの取り込みが多く認められた。移植されたリンパ節から存在する輸出リンパ管の存在により、後負荷が減少されるためにリンパの取り込みがされやすくなったと考えられた。

CD69 欠損マウスでの腹部リンパ鬱滞状態下では、通常よりもリンパ新生、線維化の形成の抑制を認めた。CD69 欠損により炎症が抑制され、それに続くリンパ新生、線維化が抑制されていることが強く示唆された。また、CD69 欠損マウス腹部リンパ鬱滞モデルにおける血管柄付きリンパ節移植を施行し、生着の状態、リンパ新生の検討を試みたが、侵襲が強いために多くは観察前に死亡に至っており、確認することは困難であった。CD69 欠損マウス自体の脆弱性が挙げられ、今後はリポソーム化した抗 CD69 抗体、抗 myl9 抗体を用いて、Drug delivery System による直接の投与での阻害もたらす効果の検討を行う予定である。

臨床での熱傷症例において myl9 血漿中濃度を連日行った結果、受傷後より上昇を認めるものの、手術の侵襲も加味されるため、症例数が少ないこともあり、熱傷のみの炎症の影響を検討することはできなかった。今後症例の集積を引き続き行い、急性炎症の程度や年齢の違いによる影響を検討する予定である。

プラズマ止血装置に関しては、低侵襲による炎症軽減効果による線維化防止効果をはかるべく、リンパ鬱滞マウスにおけるプラズマ止血装置を用いた止血の線維化抑制機構の検討を行う

予定であったが、装置開発の段階で本研究期間内にマウス照射まで間に合わなかったため、引き続き今後の課題とする。

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 0件）

1. 著者名 Akita Shinsuke, Yamaji Yoshihisa, Kuriyama Motone, Tokumoto Hideki, Ishigaki Tatsuya, Tezuka Takafumi, Ogata Hideyuki, Kubota Yoshitaka, Mitsukawa Nobuyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Intraoperative Detection of Efferent Lymphatic Vessels Emerging from Lymph Node during Lymphatic Microsurgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reconstructive Microsurgery	6. 最初と最後の頁 372-378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0038-1677039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinsuke Akita, Yoshihisa Yamaji, Nobuyuki Mitsukawa
2. 発表標題 How to maximize the effect of surgical treatment of lymphoedema
3. 学会等名 第10回国際マイクロサージャリー学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------