

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24252

研究課題名（和文）導出リンパ管・集合リンパ管の作製とリンパ管形成に関わる因子の同定

研究課題名（英文）Fabrication of pre-collecting and collecting lymphatic vessels and identification of factors involved in lymphatic vessel formation

研究代表者

中島 由加里（Nakajima, Yukari）

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：40846680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：三次元培養によるリンパ管作製において、まず脂肪組織由来間葉系幹細胞をC57BL6/Jから単離培養し、細胞積層法を用いて毛細リンパ管作製を行った。細胞積層法のプロトコル変更により、死細胞の割合が増加し、プロトコル変更を余儀なくされたが、カルチャーインサートへの細胞接着率の向上、支持細胞として線維芽細胞の使用、培地の配合等を検討し、安定してリンパ管が作製できる条件を確立した。現在は、確立したプロトコルを用いて、導出リンパ管の作製、リンパ管形成に関わる因子の同定、リンパ管の立体構造の評価を実施している段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外で毛細リンパ管を作製し、これに関わる因子の同定を行うことにより、リンパ管形成因子やこれを促進する因子を同定することができる。これを元に、導出リンパ管、集合リンパ管と、よりリンパ輸送能の高いリンパ管を生体外で作製し、これらのリンパ管形成に関わる因子を同定することで、乳がんや子宮がんの手術時にリンパ節郭を受けた患者の郭清部において、リンパ管再建を行い、リンパ浮腫の発症予防や根治的治療を行うことが可能になる。本研究は、再生医療を用いた世界に先駆けるリンパ浮腫治療・予防法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the fabrication of lymphatic vessel by three-dimensional culture, adipose tissue-derived mesenchymal stem cells were isolated from C57BL6/J mice and cultured in plates, and then capillary lymphatic vessel production was performed using the Layer-by-Layer method. However, the rate of cell death was increased using revised protocol. Thereby, we established the conditions for stable lymphatic vessel production by improving the cell adhesion rate to culture inserts, using fibroblasts as support cells, and studying the composition of the culture medium. We are in the process of fabricating connecting lymphatic vessels, identifying factors involved in lymphatic vessel formation, and evaluating the three-dimensional structure of lymphatic vessels using the established protocol.

研究分野：基礎看護、脈管学

キーワード：リンパ管 リンパ浮腫 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんや子宮がんに伴うリンパ節郭清や放射線照射を受けた患者の5~20%程がリンパ浮腫を発症する。本邦の患者は10~15万人ほどであるが、根治治療はなく、患者は進行予防のためのセルフケアを一生強いられ、QOLは著しく低下している。これを解決するためには、リンパ流が遮断した部位でリンパ管を再建させ、リンパ排泄を促す必要がある。リンパ管再建では、リンパ管静脈吻合術があるが1~2年で吻合したリンパ管は閉塞することもあり、重症例は適応外である。一方、再生医療として、リンパ節郭清部に脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSCs)と血管内皮細胞成長因子-C(VEGF-C)を投与し、リンパ管再生を促す治療法もあるが、リンパ輸送能の低い毛細リンパ管しか再生されず、リンパ輸送能をもつ集合リンパ管の再生は難しい。

一般的にリンパ節郭清後は、毛細血管のように損傷部周囲のリンパ管からリンパ管内皮細胞が遊走し、リンパ管新生によって側副路が形成されると考えられている。リンパ浮腫患者では、このリンパ管新生能が低いともいわれている。しかしながら、これを証明した研究はない。逆に、我々はマウスにリンパ管側副路を形成させ、これが毛細リンパ管と集合リンパ管の間の特徴を持ち、既存の集合リンパ管と結合してリンパ排泄を行う導出リンパ管であることを明らかにした(Asano & Nakajima et al., 2020)。さらに、このような平滑筋細胞をもつ集合リンパ管によって、マウスではリンパ浮腫が長期間持続せず、重症化しないことも明らかにした(Nakajima et al., 2018)。

以上のことより、リンパ浮腫患者の根治的治療を目指すためには、リンパ節郭清部位で新たなリンパ排泄経路を形成させ、かつその経路はリンパ輸送能の高い平滑筋細胞を持つ導出リンパ管あるいは集合リンパ管が望ましいと考えられる。しかしながら、導出リンパ管や集合リンパ管を作製した研究はこれまでにないため、本研究では、導出リンパ管や集合リンパ管はどのような分子機構によって形成されるか、という問いを解明する必要がある。

2. 研究の目的

脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSCs)から導出リンパ管あるいは集合リンパ管を作製し、これらのリンパ管形成に関わる因子を同定する。

3. 研究の方法

1) 2019年度: in vitro で導出リンパ管を形成させるため、三次元培養を実施(図1)

三次元培養には、細胞積層法を採用する。申請者は、この手法を用いてADSCsと分化したLECsの共培養を行い、毛細リンパ管の作製に成功しており、本研究でもこの手法を用いる。本実験では、毛細リンパ管形成に関わる因子を同定した後、この因子と平滑筋細胞をADSCsに添加することで、毛細リンパ管の周囲を部分的に取り巻くような導出リンパ管の作製を目指す。その後、培養上清に含まれる細胞外小胞、蛋白、脂質等の網羅的解析を行い、導出リンパ管形成に関わる因子を同定する。

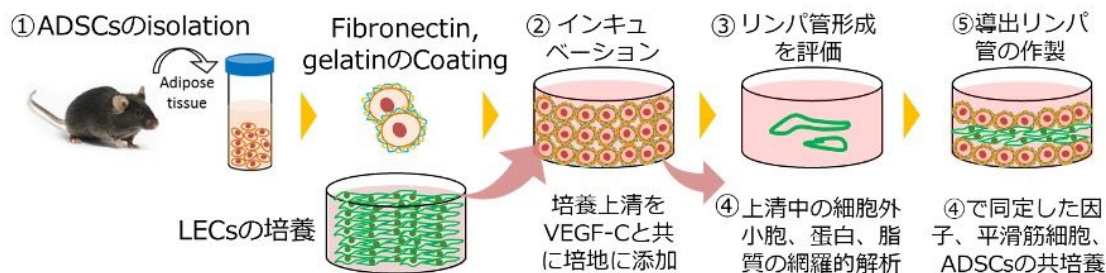
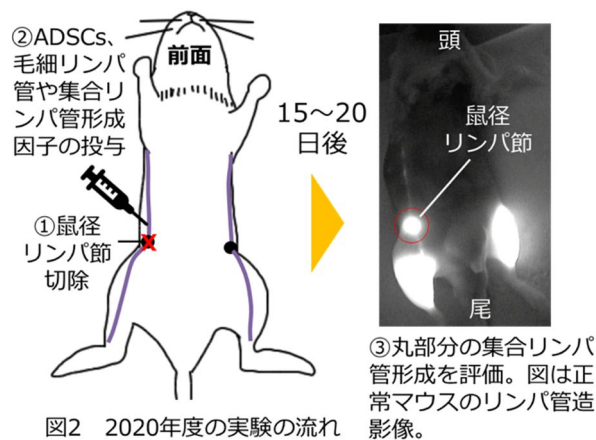


図1 2019年度の実験の流れ

2) 2020年度: in vitro で集合リンパ管を形成させ、in vivoでの機能を評価

1)と同様の手法で集合リンパ管を作製する。集合リンパ管は、平滑筋細胞が2~3層リンパ管を取り囲むような構造を目指す。1)と同様の手法で、平滑筋細胞の数をさらに増やし、ADSCsやリンパ管形成に関わる因子と共培養を行い、集合リンパ管を作製する。作成後は、図1と同様の手法で集合リンパ管形成に関わる因子を同定する。in vivoでは、マウス鼠径リンパ節郭清部にADSCs、平滑筋細胞、リンパ管形成に関わる因子を投与し、リンパ管造影により形成された集合リンパ管のリンパ輸送能の評価、組織採取後に形成されたリンパ管の形態学的特徴を観察する(図2)。



4. 研究成果

1) in vitroで導出リンパ管を形成させるため、三次元培養を実施

三次元培養では、これまで細胞積層法を CellFeuille® (住友ベークライト株式会社) という Kit を用いて行っていた。しかしながら、この Kit は販売中止となり、三次元培養の手法を再検討する必要性が生じた。細胞積層法の開発者である大阪大学大学院の明石満先生に許可を得て、明石研究室で用いている細胞積層法のプロトコルをご教授いただき、引き続きこの手法を実験に用いることとなった。

このプロトコルで実験を行ったところ、細胞死が増加し、安定したリンパ管作製ができず、更にプロトコルを改善する必要性が生じた。再び明石教授の Supervise を受け、細胞死が増加した原因として、カルチャーインサートへの接着性の低下、支持細胞の必要性等が挙げられ、カルチャーインサートへのフィブロネクチンのコーティング、細胞比率の検討、線維芽細胞の使用、培地の検討、リンパ管評価方法の検討等を行った。その結果、安定して in vitro でリンパ管を作製できるようになった (図3)。また、このプロトコルを用いてリンパ管の作製を行ったところ、マウス由来のリンパ管だけでなく、ヒト由来のリンパ管も作製された。これは、市販の Kit を用いた実験では観察できなかった結果である。

現在は、確立したプロトコルを用いて、導出リンパ管の作製、リンパ管形成に関わる因子の同定、リンパ管の立体構造の評価を実施している段階である。リンパ管の立体構造の評価には、当初リンパ管のマーカーである LYVE-1 を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡での観察を行っていたが、LYVE-1 の非特異的反応が強く、マーカーを Podoplanin に変更して評価を行なっている。

予定外のトラブルがあり、細胞積層法のプロトコルを確立するために時間を要した結果、進捗が遅れた。

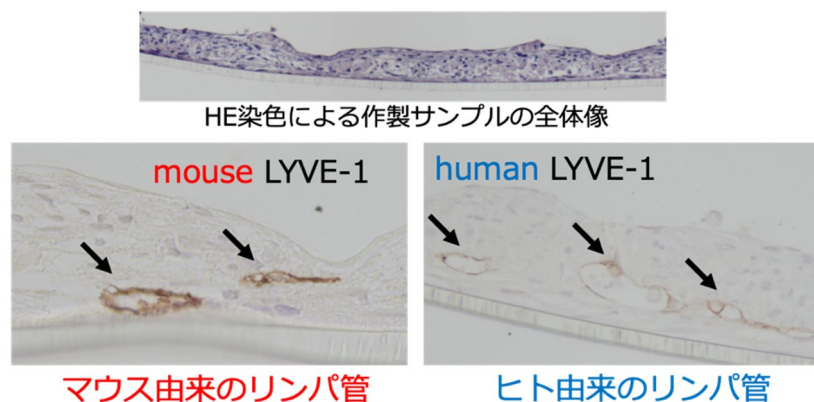


図3 新しいプロトコルによって作製した毛細リンパ管

2) in vitroで集合リンパ管を形成させ、in vivoでの機能を評価

In vitroで集合リンパ管が安定的に作製できるようになった後、in vivoでの機能評価を行う。

1) に予定外に時間を要したため、今後実施予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nakajima Y, Fujii T, Mukai K, Ishida A, Kato M, Takahashi M, Tsuda M, Hashiba N, Mori N, Yamanaka A, Ozaki N, Nakatani T	4. 巻 16
2. 論文標題 Anatomically safe sites for intramuscular injections: a cross-sectional study on young adults and cadavers with a focus on the thigh.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Vaccines & Immunotherapeutics	6. 最初と最後の頁 189-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21645515.2019.1646576	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 -
1. 著者名 Asano K, Nakajima Y, Mukai K, Urai T, Okuwa M, Sugama J, Konya C, Nakatani T	4. 巻 15
2. 論文標題 Pre-collecting lymphatic vessels form detours following obstruction of lymphatic flow and function as collecting lymphatic vessels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0227814	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 -
1. 著者名 Mukai K, Ogai K, Kobayashi M, Ueda T, Nakajima Y, Nakatani T	4. 巻 18
2. 論文標題 Longitudinal investigation of Propionibacterium acnes burden and skin physiological function during menstruation in healthy women.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure and Function	6. 最初と最後の頁 20-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11172/keitaikinou.18.20	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 -
1. 著者名 Haryanto, Mukai K, Nakajima Y, Okuwa M, Kim C, Jiu, Sugama J, Nakatani T	4. 巻 2
2. 論文標題 Evaluation of Indonesian and two types of Japanese honey on the acceleration of cutaneous wound healing: an experimental study in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Health Technology Assessment in Midwifery	6. 最初と最後の頁 80-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Mukai K, Nakajima Y, Asano K, Nakatani T	4. 巻 14
2. 論文標題 Topical estrogen application to wounds promotes delayed cutaneous wound healing in 80-week-old female mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225880	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 -

1. 著者名 Mukai K, Fujii T, Nakajima Y, Ishida A, Kato M, Takahashi M, Tsuda M, Hashiba N, Mori N, Yamanaka A, Nakatani T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Factors affecting superficial vein visibility at the upper limb in healthy young adults: A cross-sectional observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Access	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1129729820909187	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 -

1. 著者名 Takada K, Nakajima Y, Urai T, Mukai K, Asano K, Okuwa M, Sugama J, Nakatani T	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of inhibition of lymphangiogenesis by the vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) inhibitor, MAZ51 on full thickness wounds in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veins and Lymphatics	6. 最初と最後の頁 9385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4081/vl.2021.9385	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 -

1. 著者名 Nguyen VA, Ogura K, Matsue M, Takemoto N, Mukai K, Nakajima Y, Hoang TL, Iwata Y, Sakai N, Wada T, Hashimoto W, Okamoto S, Ichimura H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Hyaluronate Lyase Involved in Pathogenicity of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 552418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.552418	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 -

1. 著者名 中谷壽男, 向井加奈恵, 中島由加里	4. 巻 44
2. 論文標題 破格, リンパ管小孔, リンパ浮腫, 静脈注射, 筋肉内注射, 皮膚創傷治癒の研究: 我々が行ってきた研究の概要	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Wellness and Health care	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 0件)

1. 発表者名 藤井太河, 向井加奈恵, 中島由加里, 石田朝実, 加藤萌香, 高橋茉央, 津田美宙, 羽柴菜々美, 森奈美子, 山中郁佳, 中谷壽男
2. 発表標題 上肢の皮静脈が目視困難な条件の探索
3. 学会等名 コ・メディカル形態機能学会 第18回学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野きみ, 中島由加里, 向井加奈恵, 中谷壽男
2. 発表標題 皮膚創傷治癒におけるリンパ管の関与
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima Y, Asano K, Mukai K, Urai T, Okuwa M, Sugama J, Nakatani T
2. 発表標題 Investigation of lymphedema resolution in mouse hindlimbs
3. 学会等名 第40回日本看護科学学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域保健学系 看護科学領域 臨床実践看護学講座 創傷看護技術学分野
<https://wmn.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

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