

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09768

研究課題名(和文) T細胞解析を起点としたリンパ浮腫の免疫病態の解明・リンパ管吻合は抗癌免疫となるか

研究課題名(英文) Immune disfunction in lymphedema: Peripheral T cell investigation compared with healthy controls

研究代表者

今井 洋文 (IMAI, Hirofumi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 形成外科・副医長

研究者番号：10868847

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)：リンパ浮腫の合併症に蜂窩織炎と血管肉腫があり免疫不全の存在が示唆される。リンパ管静脈吻合術(LVA)は、これらを消退させることが報告されているが、その機序は明らかになっていない。本研究ではリンパ浮腫患者に対しT細胞上の疲弊因子(PD-1)とT細胞受容体(TCR)の多様性指数を算出しLVA前後で比較した。リンパ浮腫群とLVA術後群のCD4陽性T細胞上のPD-1発現量(%)はそれぞれ30.7と27.1であった。TCRの多様性指数はそれぞれ44.1と200.5であった。LVA後には疲弊因子の発現が減少し、TCRの多様性が回復したことから免疫能が改善されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトリンパ浮腫を対象とした免疫系に関する初めての研究である。リンパ浮腫におけるT細胞の疲弊化とクローンの多様性低下を指摘し、長らく不明だった免疫不全状態の原因の一端を解明した。また、Th1、Th17細胞の増加がリンパ浮腫の進展に関与している可能性を指摘し、従来のTh2のみでない様々な炎症性T細胞に注目する必要があることを提議した。更にLVAがリンパ浮腫のT細胞に与える影響についても初めて報告し、LVAの浮腫改善効果のみではない免疫上の有用性を示した。リンパ浮腫における免疫不全の要因とLVAがもたらす新たな有用性を基礎医学の観点からエビデンスを構築する非常に画期的な研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：Complications of lymphedema include cellulitis and angiosarcoma, suggesting the presence of immunodeficiency. Lymphaticovenous anastomosis (LVA) has been reported to alleviate these, but its mechanism remains unclear. In this study, we targeted 21 cases of lymphedema and 20 healthy individuals, performing LVA on the lymphedema group and conducting blood sampling one year post-surgery. We calculated the exhaustion factor (PD-1) on T cells and the diversity index of T cell receptors (TCR). The expression levels (%) of PD-1 on CD4+ T cells in the lymphedema group, post-LVA group, and healthy group were 30.7, 27.1, and 19.9, respectively. The diversity indices of TCR were 44.1, 200.5, and 151.0, respectively. In the lymphedema group, compared to the healthy group, PD-1 expression on T cells was higher and TCR diversity was lower. Conversely, after LVA, the expression of exhaustion factors decreased, and TCR diversity recovered, suggesting an improvement in immune function.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 T細胞 T細胞受容体 リンパ管静脈吻合術 マイクロサージャリー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における二次性リンパ浮腫の発症率は、乳癌や子宮癌など癌術後(リンパ節郭清を含む)で約 30%であり、年間 1 万人前後が罹患する。リンパ浮腫ではリンパ節廓清などによりリンパ液の還流が障害され、四肢へのリンパ液貯留が起こり患肢で周径が増大し、慢性炎症状態となる。更にリンパ浮腫の合併症として、蜂窩織炎を頻発し敗血症に至る例や、血管肉腫を続発する予後不良例が報告されており、その背景となる免疫不全の存在が示唆される。しかし近年マイクロサージャリーの技術発展に伴い、浮腫に罹患した四肢においてリンパ管を静脈に吻合する(Lymphatic venous anastomosis: LVA)によりリンパ液をリンパ管から静脈を介した還流路に改変し、浮腫の改善が得られるようになった。興味深いことに、LVA は何らかの機序により、リンパ浮腫患者の免疫系を賦活化している可能性があり、蜂窩織炎の発生頻度を減少させ、血管肉腫の自然退縮をもたらすことが報告されている。過去のリンパ浮腫と T 細胞に関する動物モデルを用いた研究では、リンパ浮腫患肢皮膚に蓄積した Th2 細胞が IL-4 の炎症性サイトカインを産生し、リンパ浮腫の進展に関与していることが示唆されているが、これまでリンパ浮腫における末梢血 T 細胞集団の特徴を明らかにした研究はない。

2. 研究の目的

本研究の目的はリンパ浮腫患者と LVA 術後および健常者の末梢血中の T 細胞を用いてリンパ浮腫における T 細胞機能的亜群の状態を比較し、リンパ浮腫における T 細胞の特徴と LVA がそれに与える影響を調査することである。

3. 研究の方法

本研究への参加について文書による同意が得られたリンパ浮腫群 21 例と健常者群 20 例を対象として末梢血を採取した。またリンパ浮腫群に対しては、全例に LVA を行い、術後 1 年で採血を行い、LVA 術後群とした。浮腫の評価法としては、extremity lymphedema (EL) index を用いた。採取した末梢血より単核球層を抽出し、T 細胞上の PD-1 の疲弊因子の発現量と Treg の頻度および炎症性サイトカイン産生能(IFN- と IL-17A)を測定した。更に末梢血 T 細胞集団全体を対象として、T 細胞受容体(TCR)遺伝子の V 領域、complementarity determining region (CDR3)、J 領域の配列を次世代シーケンサーで網羅的かつ半定量的に決定し、TCR のレパートア解析も併せて行った。得られたデータより TCR の多様性指数(Simpson's index)を算出し、各群間で比較を行った。

4. 研究成果

リンパ浮腫患者は全例女性で二次性リンパ浮腫であり、内訳は下肢リンパ浮腫が 17 例と上肢リンパ浮腫が 4 例であった。年齢の中央値はリンパ浮腫群で 54 歳、健常者群で 51 歳であった($p = 0.55$)。EL index はリンパ浮腫群と LVA 術後群で 263 と 244 であり有意に浮腫の改善が得られた($p = 0.01$)(図 1)。リンパ浮腫群と LVA 術後群および健常者群の CD4⁺T 細胞上の PD-1 発現量(%)はそれぞれ 30.7 と 27.1 および 19.9 であり、リンパ浮腫群は健常者群と比較して有意に上昇しており($p < 0.01$)、リンパ浮腫群と比較して LVA 術後群で有意に低下していた($p = 0.03$)。CD8⁺T 細胞上の PD-1 発現量(%)はそれぞれ 17.1 と 15.9 および 17.5 であり、リンパ浮腫群と比較して LVA 術後群で有意に低下していた($p = 0.01$)(図 2)。CD4⁺PD-1⁺T 細胞上の IFN- (%)はそれぞれ 30.1 と 24.7 および 20.6 であり、リンパ浮腫群は健常者群と比較して有意に上昇しており($p = 0.04$)、リンパ浮腫群と比較して LVA 術後群で有意に低下していた($p = 0.03$)。また、CD4⁺T 細胞上の IL-17A(%)はそれぞれ 2.7 と 1.6 および 1.7 であり、リンパ浮腫群と比較して LVA 術後群で有意に低下していた($p = 0.01$)。Simpson's index はそれぞれ 44.1 と 200.5 および 151.0 であり、リンパ浮腫群は健常者群と比較して有意に低下しており($p = 0.03$)、リンパ浮腫群と比較して LVA 術後群で有意に上昇していた($p = 0.02$)(図 3)。



図 1. (左)左下肢リンパ浮腫
(右)リンパ管静脈吻合術後

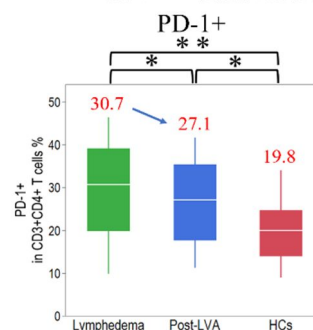


図 2. CD4 陽性 T 細胞上の PD-1 発現率(%)

リンパ浮腫群では、健常者群と比較して、末梢血 T 細胞の疲弊マーカーの発現量が多く、炎症性サイトカイン産生能が亢進し、T 細胞受容体の多様性が低下していた。しかし、LVA により T 細胞上の疲弊因子の発現が減少し、TCR の多様性が回復したことからリンパ浮腫において免疫能が改善されることが示唆された。また、炎症性サイトカインを産生する T 細胞亜群が LVA 後に減少していたことより、リンパ浮腫における炎症を LVA によって抑制できる可能性が示唆された。本研究を通して LVA は、物理的なリンパ浮腫の改善をもたらすのみならず、末梢血 T 細胞集団の機能的亜群の比率にも影響を及ぼし、免疫系を賦活化していることが示唆された。

本研究はヒトリンパ浮腫を対象とした免疫系に関する世界で初めての研究である。長らく不明だった免疫不全状態の原因の一端を解明し、また、Th1、Th17 細胞の増加がリンパ浮腫の進展に関与している可能性を指摘し、様々な炎症性 T 細胞に注目する必要があることを提議した。更に LVA がリンパ浮腫の T 細胞に与える影響についても世界で初めて報告し、LVA の浮腫改善効果のみではない免疫上の有用性を示した。本研究はリンパ浮腫を診療する上で、その背景となる免疫不全の要因と LVA がもたらす新たな有用性を基礎医学の観点からエビデンスを構築する非常に画期的な研究であると言える。本研究は Cell Press が刊行する iScience に掲載された。

Simpson's index

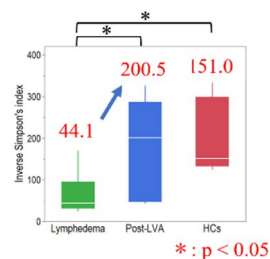


図 3. T 細胞受容体遺伝子の多様性の比較 (Simpson's index)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Imai Hirofumi, Kawase Takakazu, Yoshida Shuhei, Mese Toshiro, Roh Solji, Fujita Asuka, Uchiki Toshio, Sasaki Ayano, Nagamatsu Shogo, Takazawa Atsushi, Ichinohe Tatsuo, Koshima Isao	4. 巻 -
2. 論文標題 Peripheral T-cell profiling reveals downregulated exhaustion marker and increased diversity in lymphedema post-lymphatic venous anastomosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106822	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 Imai Hirofumi, Yoshida Shuhei, Mese Toshiro, Roh Solji, Fujita Asuka, Sasaki Ayano, Nagamatsu Shogo, Koshima Isao	4. 巻 11
2. 論文標題 Correlation between Lymphatic Surgery Outcome and Lymphatic Image-Staging or Clinical Severity in Patients with Lymphedema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4979 ~ 4979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11174979	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 Imai Hirofumi, Yoshida Shuhei, Mese Toshiro, Roh Solji, Fujita Asuka, Uchiki Toshio, Sasaki Ayano, Nagamatsu Shogo, Koshima Isao	4. 巻 10
2. 論文標題 Technical Tips for Anastomosis of 0.2-mm Diameter Vessels during Lymphatic Venous Anastomosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open	6. 最初と最後の頁 e4304 ~ e4304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000004304	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 Imai Hirofumi, Yoshida Shuhei, Mese Toshiro, Roh Solji, Koshima Isao	4. 巻 8
2. 論文標題 Supermicrosurgical lymphatic venous anastomosis for intractable lymphocele after great saphenous vein harvesting graft	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Surgery Cases, Innovations and Techniques	6. 最初と最後の頁 45 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvscit.2021.11.003	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 Imai Hirofumi、Yoshida Shuhei、Mese Toshiro、Roh Solji、Koshima Isao	4. 巻 1
2. 論文標題 Upgradation of Lymph Supermicrosurgical Skills through Lymphatic Venous Anastomosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 31～33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.53045/jprs.2021-0010	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13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hirofumi Imai
2. 発表標題 Profiling of circulating T cells and comprehensive T cell receptor analysis clarified exhaustion and diminished diversity in patients with lymphedema and relieved by lymphatic venous anastomosis
3. 学会等名 the 12th Congress of the World Society of Reconstructive Microsurgery (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫におけるT細胞の変化: リンパ管吻合術を経てみえたリンパ浮腫治療の重要性
3. 学会等名 第47回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫におけるT細胞の変化: リンパ管吻合術を経てみえたリンパ浮腫 リンパ管吻合術はリンパ浮腫患者の免疫能を改善させるか: リンパ管吻合術の新たな可能性
3. 学会等名 第66回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫治療におけるT細胞の変化: 基礎と臨床をつないだ共同研究
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ管吻合術はリンパ浮腫患者の免疫能を改善させるか:末梢血T細胞を起点とした免疫能の調査
3. 学会等名 第46回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫治療におけるT細胞の変化:リンパ管吻合術はリンパ浮腫患者の免疫能を改善させるか
3. 学会等名 第81回中国・四国形成外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫患者におけるT細胞受容体遺伝子の調査:リンパ浮腫によりT細胞受容体の多様性は低下する
3. 学会等名 第65回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ管吻合術はリンパ浮腫患者の免疫能を改善させるか:末梢血T細胞を起点とした免疫能の調査
3. 学会等名 第65回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫における免疫異常:T細胞の免疫学的指標
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫における免疫異常:基礎研究を通じた臨床的疑問の解明
3. 学会等名 第45回日本リンパ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirofumi Imai
2. 発表標題 Profiling of Circulating T cells in Patients with Lymphedema Reveals Upregulation of Immune Checkpoint Molecules
3. 学会等名 28th ISL World Congress of Lymphology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ管吻合術はリンパ浮腫患者の免疫能を改善させるか:末梢血T細胞を起点とした免疫能の調査
3. 学会等名 第65回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井洋文
2. 発表標題 リンパ浮腫患者におけるT細胞受容体遺伝子の調査:リンパ浮腫によりT細胞受容体の多様性は低下する
3. 学会等名 第65回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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	川瀬 孝和 (KAWASE Takakazu) (30463194)	藤田医科大学・国際再生医療センター・准教授 (33916)	

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