

令和 6 年 6 月 2 9 日現在

機関番号：3 2 2 0 2

研究種目：若手研究

研究期間：2021 ~ 2023

課題番号：2 1 K 1 6 9 1 8

研究課題名（和文）リンパ浮腫における脂肪増生の機序解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Study for mechanism of fat growth in lymphedema and development of new treatment methods

研究代表者

藤木 政英（Fujiki, Masahide）

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：5 0 5 3 2 0 6 6

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）：ヒトリンパ浮腫の脂肪組織およびそのSVFを採取し、リンパ浮腫脂肪組織のSVFでは脂肪幹細胞が減少していることを確認した。また、同一ドナー由来のリンパ浮腫脂肪組織、正常脂肪組織からレーザーマイクロダイセクションを用いて脂肪細胞およびSVFを分けて各々total RNAを採取し、遺伝子発現の差異を検討した。リンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織では、脂肪細胞、SVFのそれぞれにおいて脂肪増生に関連する遺伝子発現の増減が認められた。リンパ浮腫における脂肪増大には脂肪細胞とSVFの相互採用によって起きてい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

リンパ浮腫の治療法は未だに確立しておらず、保存的治療、外科的治療ともに効果は限定的である。本研究により、リンパ浮腫における脂肪組織の増大には脂肪細胞とSVFの相互採用によって起きていることが示唆された。そのため、脂肪細胞とSVFの細胞間シグナルの解明を行うことによりリンパ浮腫由来の脂肪組織が増大する機序の解明につながると考えられた。リンパ浮腫由来の脂肪組織が増大する機序の解明は革新的な治療法の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：Human lymphedema adipose tissue and its SVF were collected, and confirmed that adipose stem cells were reduced in the SVF of lymphedema adipose tissue. In addition, we separated adipocytes and SVF from lymphedema adipose tissue and normal adipose tissue derived from the same donor using laser microdissection, collected total RNA from each, and examined differences in gene expression. In lymphedema adipose tissue and normal adipose tissue, gene expression related to adipogenesis were changed in adipocytes and SVF, respectively. It was suggested that fat increase in lymphedema occurs through interaction of adipocytes and SVF.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は、乳がん、婦人科がん(子宮がん、卵巣がん)、四肢の肉腫などに対する手術や放射線照射の後遺症として高頻度(10~30%)に発症する。いったん発症すると自然改善することではなく、四肢の著明な肥大、関節可動域制限などにより QOL が著しく低下するだけでなく、繰り返す蜂窩織炎や続発性の肉腫(Stewart-Treves 症候群)により、ときに致死的となる。リンパ浮腫の治療法として、圧迫療法、リンパドレナージなどの保存的治療とリンパ管細静脈吻合、リンパ移植、脂肪吸引などの外科的治療がある。しかし、現行の治療法の効果には限界があり、また、浮腫が重症になるほど治療に反応しにくくなるなどの問題がある。さらに、いったん改善したとしても再度病状が悪化することが多いため、治療に難渋することも多く、革新的な治療が望まれる。

リンパ浮腫の病状の悪化はリンパ液の貯留だけではなく、浮腫部の脂肪組織の増生が大きく関与している。増生した脂肪組織はリンパ管にかかる負荷を引き起こし、リンパ管のポンプ作用を阻害する。結果的に、リンパ管の負荷とリンパ液の貯留、脂肪組織の増生を繰り返し、浮腫はますます悪化する。しかし、こうしたリンパ浮腫の増悪過程において最も重要と考えられる脂肪組織が増生する機序は不明である。

一般に、脂肪組織は脂肪細胞の集合からなり、間質には脂肪幹細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞などの幹細胞分画(SVF: stromal vascular fraction)が含まれる。通常、成人の普通体重者の脂肪細胞の大きさは70~90 μm であるが、肥満が進むと脂肪細胞は活発に脂肪合成を行って肥大する。さらに肥満が進むと脂肪細胞は150 μm 程度までは肥大し、脂肪細胞の分化誘導刺激におけるマスターレギュレーターである PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)が発現する。その結果として、周囲の脂肪前駆細胞が成熟脂肪細胞となることにより脂肪細胞が増加する(Guilherme A, Nat Rev Mol Cell Biol, 2008)とともに、一方では虚血性壊死になる脂肪細胞が増加することで、M1 マクロファージの浸潤により慢性炎症を引き起こす。

当研究室では同ドナーのリンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織を比較し、リンパ浮腫の患肢では肥満と関係なく脂肪細胞が肥大、増加することを報告した。本研究では「なぜリンパ浮腫では肥満と関係なく脂肪組織が増生するのか」その機序を分子生物学的に解明し、脂肪増生を抑制することによるリンパ浮腫の新規治療法を開発することを目的とする。

2. 研究の目的

リンパ浮腫の病状の悪化には脂肪増生が重要な役割を果たしているが、現在広く行われている保存的治療、リンパ管細静脈吻合、リンパ移植はあくまでリンパ流を改善することを目的としている。しかし、こうした治療によって一時的にリンパ流が改善したとしても、脂肪が増生する限り再度リンパ流は悪化するため根本的な治療とは言い難い。本研究は、リンパ流の改善ではなく脂肪増生を阻害することによってリンパ浮腫を抜本的に治療する新しい治療の開発を目的としている。

3. 研究の方法

リンパ浮腫脂肪組織、正常脂肪組織の発現遺伝子の網羅的解析

同ドナー由来のリンパ浮腫脂肪組織、正常脂肪組織からレーザーマイクロダイセクション

(LMD)を用いて脂肪細胞およびSVFを分けて各々total RNAを採取する。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子レベルでの発現様式の差を検討する。リンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織では、おそらく脂肪細胞、SVFのそれぞれにおいて脂肪増生に関連する遺伝子発現の増減が認められることが想定される。さらに、脂肪組織におけるproliferation pathwayを中心とした細胞間シグナル伝達経路を解析することで、脂肪増生をもたらす原因を探索する。

脂肪肥大病因候補遺伝子発現の組織学的検討

マイクロアレイにより脂肪増生の候補因子と考えられる遺伝子に関しては、免疫染色(タンパク質)、in situ hybridization(mRNA)を用いて、より直接的にリンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織の発現の差を確認する。

リンパ浮腫由来脂肪細胞、SVFの共培養実験系の確立

前述の実験と併行して、リンパ浮腫脂肪組織から脂肪細胞、SVFを初代培養する。脂肪増生の原因は脂肪細胞のみではなく、SVFも相応の役割を果たしていると考えている。そのため、リンパ浮腫脂肪細胞とSVFおよび正常脂肪細胞とSVFとの比較に加え、リンパ浮腫脂肪細胞と正常SVF、正常脂肪細胞とリンパ浮腫SVFの組み合わせについて共培養を行い、各々の脂肪細胞の増殖および増大について解析を行う。細胞増殖能の評価はマニュアルカウント、MTT assay、EdU取り込み実験を行う。

in vitro、in vivoにおける候補遺伝子の機能解析

解析により最も可能性が高いと考えられるマスターレギュレーター候補遺伝子のORFクローンを、レンチウイルスベクターを用いて導入し、over expressionおよびknock downした状態でのin vitro機能解析を行う。

In vivo機能解析として候補遺伝子導入細胞と対応する細胞を混合してヌードマウスの背部皮下に注入するMatrigel plug assayを行い、コントロールペアにおいて形成される組織との病理学的検討を行う。

4. 研究成果

リンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織では、脂肪細胞、SVFのそれぞれにおいて脂肪増生に関連する遺伝子発現の増減が認められた。リンパ浮腫による脂肪組織の増生には、脂肪細胞とSVF間の相互作用によって起きていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 藤木政英
2 . 発表標題 LVAが悪性腫瘍の再発に与える影響
3 . 学会等名 第5回日本リンパ浮腫治療学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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