

令和 6 年 4 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16994

研究課題名（和文）リンパ浮腫治療の次なる一手～活性化大網培養上清を用いた移植リンパ節再疎通率の向上

研究課題名（英文）Supernatant of activated omentum induces faster improvement of acute lymphedema in mouse model.

研究代表者

伊藤 梨里 (Ito, Riri)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：00813544

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）：大網は腹腔内の免疫組織としての役割を持っており、腹腔内の異物に対して反応することが分かっている。本研究は活性化大網の培養上清を用いたリンパ浮腫治療法の開発を目的として行われた。マウス後肢の急性リンパ浮腫モデルを作成し3群に分け、活性化大網の培養上清、活性化していない大網の培養上清、培養液を各群に局所投与した。活性化大網の培養上清投与群では急性リンパ浮腫のピークを軽減させ、軽快までの時間を有意に短縮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大網内にはリンパ節が存在するが、異物などにより活性化されることで大網組織自体もリンパ系の役割を有し、特にMilky spotなどでリンパ節と類似した役割を果たすことが報告されている。大網はリンパ節郭清後の再建材料として用いられるが、再生医療の観点で、大網が持つ成長因子に注目した検討は未だに行われていない。本研究では、活性化大網の培養上清のみを用いてリンパ浮腫への影響を検証した。大網は、Scaffoldとしての役割に加え、成長因子の放出という観点でも有用なリンパ流の再建材料であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The greater omentum plays a pivotal role as an immunological tissue within the peritoneal cavity, exhibiting a marked response to foreign entities within the space. This investigation aims to pioneer a treatment modality for lymphedema, leveraging culture supernatants from activated omental tissue. An acute lymphedema model in the hind limb of mice was established and categorized into three distinct cohorts. These groups received local injection of culture supernatants derived from both activated and naive omentum, in addition to a control treatment with culture medium alone. Notably, the cohort treated with the supernatant from activated omentum demonstrated a significant reduction in the intensity of acute lymphedema, alongside a markedly expedited timeline towards alleviation.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ浮腫 活性化大網 培養上清 内臓脂肪 大網・腸間膜 milky spot

## 1．研究開始当初の背景

続発性リンパ浮腫は癌や感染症などによりリンパ組織が破綻された患者に生じる病態であり、破綻された領域周辺及び遠位の循環、免疫機能に変化を及ぼす。循環機能の観点から、リンパ液の貯留により四肢は浮腫に至り整容・機能ともに低下し患者のQoL (Quality of Life) も低下する。免疫機能の観点から、監視機能がなくなることにより軟部組織感染や癌の発症や転移も起こりやすくなる。

一方、大網は腹腔内の異物により活性化され、血管新生作用、抗炎症作用、再生促進作用を有するサイトカインを分泌することが分かっている。

そこで研究代表者は、活性化大網の培養上清を用いることで、リンパ浮腫を治療できるのではないかと考えた。

## 2．研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では活性化大網の培養上清をマウスの後肢リンパ浮腫モデルへ局所投与することでそのリンパ管新生効果とリンパ浮腫の軽減に与える影響を検討し、臨床応用への道を拓くことを目的とする。

## 3．研究の方法

### (1)大網の活性化及び活性化大網培養上清の採取

大網の活性化は Litbarg NO らの報告(Litbarg, et al, *Cell Tissue Res*, 2007)を参考に行った。C57BL/6N マウスの腹腔内にポリデキストラン粒子 (Biogel P-60, 120  $\mu$ m M; Biorad Laboratories)を注入し、1週間後、マウス腹部より大網を採取し、Yu Li らの報告(Yu Li, *Nagoya J Med Sci*, 2023)を参考に、12 ウェルカルチャーインサート内、DMEM/F12 2ml で器官培養を行った。48時間後に培養上清液を回収し、液体窒素で凍結させ、-80 で凍結保存した。

### (2)マウス後肢リンパ浮腫モデル

リンパ浮腫モデルは Iwasaki らの報告(Iwasaki, et al, *Plast Reconstr Surg*, 2017)に従い、8週齢のオス C57BL6/N マウスの左後肢の膝窩・鼠径リンパ節及び周囲脂肪組織を郭清しスプリントを装着しリンパ浮腫モデルを作成した。

### (3)培養上清液の投与

上記で作成した培養上清液を左後肢、シリコンスプリントより遠位、下腿内側及び外側の皮下組織へ 0.05mL ずつ局所投与した。投与間隔は手術当日を含め 2日に1回、投与期間は2週間とした。コントロール群として培養液投与群、活性化してない大網の培養上清液投与群を作成した。

### (4)培養上清液の評価

ポリデキストラン粒子注入群、PBS 注入群、非注入群を作成、大網を採取し培養上清液を回収し、大網の培養上清液の評価を ELISA 法を用いて行った。培養上清液に含まれる VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 を ELISA で評価した。

### (5)リンパ浮腫の評価

#### マクロ評価

下肢周径、ICG 蛍光造影での評価を行った。下肢周径は術前日、術後 2、4、6、8、10、12、14、17、21、24、28、35 日目に Yoshida らの報告(Yoshida, et al, *Regen Med*, 2015)を参考に測定し、Hoshino らの報告(Hoshino, et al, *Lymphat Res Biol*, 2023)を参考に左右比を周径の経過を観察した。また、術前日、術後 7、15、21、28、35 日目に ICG 蛍光造影を行い、Dermal backflow の観察によるリンパ流の鬱滞の改善度合いを評価した。

#### マイクロ評価

6日目にマウスを安楽死させ、後肢の皮膚を採取し、皮膚・軟部組織厚、リンパ管形態の評価を行う。qPCR により VEGF-C、VEGFR-3、HIF-1、Prox1 などリンパ管新生因子の発現の評価を行う。

#### 4. 研究の成果

活性化大網培養上清投与群でリンパ浮腫のピークが低く、リンパ浮腫が改善するまでの期間が短かった。

各群の代表的な経時的写真を示す。(図 1)

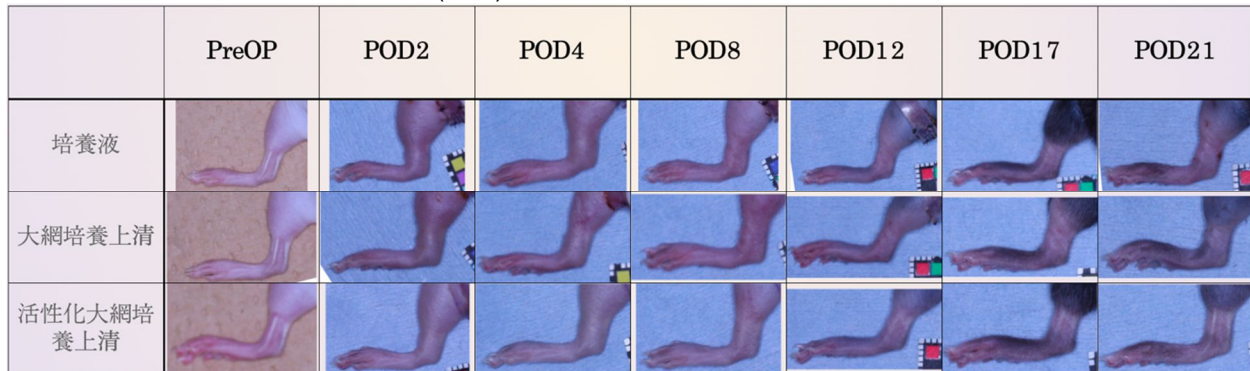


図 1 各群の代表的な経時的写真 上段：培養液投与群 中段：大網培養上清液投与群 下段：打活性化大網培養上清液投与群

#### 5. 参考文献

- 1 Litbarg, N. O. *et al.* Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Res* **328**, 487-97, (2007).
- 2 Yu Li, K. H., Katsumi Ebisawa, Miki Kambe, Shinichi Higuchi and Yuzuru Kamei. Supernatant from activated omentum accelerates wound healing in diabetic mice wound model. *Nagoya J Med Sci* **85**, 14, (2023).
- 3 Iwasaki, D. *et al.* Establishment of an Acquired Lymphedema Model in the Mouse Hindlimb: Technical Refinement and Molecular Characteristics. *Plast Reconstr Surg* **139**, 67e-78e, (2017).
- 4 Yoshida, S. *et al.* Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model. *Regen Med* **10**, 549-62, (2015).
- 5 Hoshino, Y. *et al.* Therapeutic potential of the prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat in a mouse hindlimb lymphedema model. *Lymphat Res Biol* **21**, 9, (2023).

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 伊藤梨里、徐東經
2. 発表標題 活性化大綱上清を用いたリンパ浮腫の早期改善
3. 学会等名 第46回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2023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
---------	---------