

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791692

研究課題名(和文)再生療法を利用したリンパ浮腫に対する新規治療開発

研究課題名(英文)Development of a novel method for lymphedema therapy using regenerative medicine

研究代表者

大島 乃里子(OSHIMA, NORIKO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30611058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はリンパ浮腫の新規治療開発を目的に行われた。まず印刷技術を用いて生体外で作成した毛細リンパ管シートの局所移植によるリンパ浮腫治療を試みたが、移植可能な安定したリンパ管を羊膜上で作成することが困難であることが判明した。そのため組織移植から細胞治療に実験を変更し、ヒト脂肪細胞由来間葉系幹細胞を利用し培養上清の局所注入によるリンパ管再生を試みた。その結果、浮腫がやや悪化し、炎症による影響が示唆された。次に、抗炎症作用を持つ皮膚外用剤を浮腫部位に塗布したところ、浮腫が軽減傾向となった。以上によりリンパ浮腫治療において炎症の関与が示唆され、外用剤による治療が有用である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to develop novel therapies for lymphedema. First, we attempted to treat lymphedema by local transplantation of lymphatic capillary sheets formed in vitro by photolithography. However, we found that lymphatic vessels stable enough to be transplanted were difficult to form on amniotic membrane. Thus, the focus of our experiment was changed from tissue transplantation to cell therapy. We attempted to regenerate lymphatic vessels by local injection of supernatant from culture of human adipocyte-derived mesenchymal stem cells. As a result, edema was slightly aggravated, suggesting the presence of an inflammatory response. Next, we applied topical skin agents with anti-inflammatory activity to the edematous area, and the edema started to resolve. These findings suggest involvement of inflammation in the treatment of lymphedema, and topical agents may be useful.

研究分野：産婦人科学

キーワード：再生医療 リンパ浮腫

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会背景

本邦におけるリンパ浮腫患者は 10 万人以上存在すると言われているが、根本的な治療法が存在せず、未だ治癒が困難な疾患である。特にリンパ郭清範囲の広い子宮癌、乳癌、卵巣癌の術後リンパ浮腫患者数は全体の 9 割を超え、これらの癌患者の増加と共に年々増加傾向である。リンパ浮腫はその病状進行により、起立・歩行や上肢挙上が困難になるほか、鬱滞したリンパ液が細菌の好適培養地となるため再発性蜂窩織炎やリンパ管炎を合併し、最終的に不可逆的な機能障害に陥る。厚生科学研究費助成金（がん克服戦略研究事業）の成績によると、下肢リンパ浮腫の発生率は子宮頸癌 38%、体癌 29%で、さらに術後放射線治療を受けた症例での発生率は頸癌 48%、体癌 37%と高率であり、また乳癌術後のリンパ浮腫の罹患率は 54%と報告されている。これらの癌の罹患率の増加、治癒率の上昇、若年齢化、女性の社会進出に伴い、癌が治癒したにもかかわらず、術後の四肢機能障害が社会復帰を制限するという問題は解決すべき喫緊の課題である。

しかしながら、現在のリンパ浮腫の治療は、行動制限、弾性ストッキングの着用、スキンケア、マッサージ等の理学的な保存治療が主なものであり、悪化を防ぐ方法のみしか存在しないのが現状である。近年、リンパ管と細静脈の吻合を行うマイクロサージャリーが行われるようになったものの、微小脈管吻合の技術を有する形成外科医はごく少数であり、手術時間も長時間にわたることから限定された患者のみにしか施行できない。また既に機能が失われたリンパ管を縫合することによる機能回復効果は限定的であることが判明している。また研究レベルでは VEGF-C などのリンパ管再生を促進する因子の注射による治療方法が試みられているが、これらの因子は全身に作用した場合悪性腫瘍のリンパ節転移を促進する作用があるため、癌の再発の可能性が上昇するという重大な危険性存在する。このような、決定的な治療が存在しない疾患に対して、自己細胞を利用して毛細リンパ管を再生する新規治療の開発を行うことが本研究の目的である。

(2) 学術的背景

申請者のグループでは、これまでの研究において、印刷技術を応用し、血管内皮細胞を用いて、任意にパターンニングされた毛細血管網を *in vitro* で作成する技術を世界で初めて考案し報告してきた（2007 BBRC, 2008 ECR, 2009 ATVB, 2010 Tissue Engineering, Inflammation and Regeneration 2011）（図 1）。

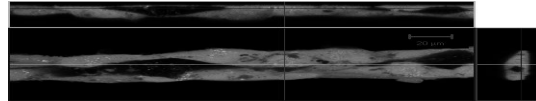


図 1：臍帯血由来血管内皮前駆細胞による毛細血管形成（ラインパターンニング基板を作成し、直線状の毛細血管を作成した）

本方法は血管内皮細胞を培養し細胞数を増幅させた後、親・疎水を利用してパターン化した基板上に播種し、その後組織に転写することにより組織上で血管構造を構築するという方法である。このパターンニング基板を利用して血管内皮細胞を羊膜上に転写して血管を形成し、この血管付羊膜を移植することにより、マウス下肢虚血部位の血流改善と機能回復が認められることは既に確認されている。そこで、この生体外での脈管形成技術と自己細胞の培養技術をリンパ浮腫組織のリンパ流回復に応用しようというのが本研究の主眼である。すなわち、自己のリンパ管内皮細胞を培養で増幅させ、これをリンパ管網をパターンニングした基板上に播種し、細胞外マトリクスに転写して作成したリンパ管シートをリンパ流が遮断された組織に移植するという方法である。

移植に使用する細胞外マトリクスについては、共同研究により作成した高圧処理脱細胞羊膜を使用する。この高圧処理脱細胞羊膜上で毛細血管網を移植した研究において、(ATVB 2010) 有用性が確認されている。小脈管網によってリンパ液を回収している末梢組織への実際の移植を考慮した際に、弾力性がありフレキシブルな形状をとることが可能な操作性に優れたスキャフォールドが必須だが、羊膜はその条件を満たす材料である。問題となる病原性や免疫拒絶反応については、高圧酸素処理脱細胞処理を行うことによりウイルスや免疫原性を除去したため回避可能となった。一方、これまでにヒト末梢血や臍帯血、脂肪細胞より、血管内皮前駆細胞や間葉系幹細胞を効率的に単離・培養する方法も確立しており (ATVB 2010, Inflammation and Regeneration 2011) 生体材料から脈管材料を単離・培養する基礎的な技術を蓄積している。

2. 研究の目的

このような社会的・学術的背景のもと、本研究においてはこれまでの研究成果・技術を統合し、皮膚組織からリンパ管内皮細胞の単離・培養を行い、自己皮膚細胞由来リンパ管内皮細胞を高圧酸素処理脱細胞羊膜に転写して毛細リンパ管を生体外で作成し、これをマウスリンパ浮腫部位に移植してリンパ浮腫の改善について検討を行う。術後リンパ浮腫患者の QOL の上昇と社会復帰を促進することを最終目標とし、本研究では術後リン

パ浮腫における自己細胞を利用した新規治療を実験動物レベルで開発することを目的とした。

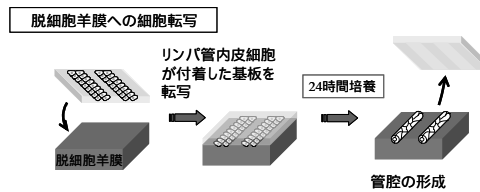
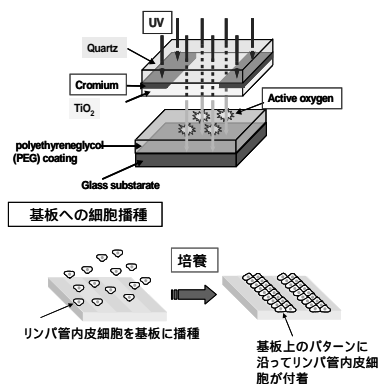
3. 研究の方法

当初の計画として本研究期間においては、前臨床のデータ蓄積を行うこととし、動物実験によるリンパ浮腫モデルの作成、生体外での毛細リンパ管の作成、動物実験によるリンパ浮腫モデルへの毛細リンパ管シートの移植、動物モデルの治療評価を行う予定とした。しかし、生体外での毛細リンパ管の作成過程において、安定した毛細リンパ管を作成することが困難であることが判明したため、リンパ管形成を促進すると考えられる間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) を使用した細胞培養上清を使用した局所注入による方法に変更した。まず始めに市販リンパ管内皮細胞を利用し、これをリンパ管内皮細胞に適した接着強度に調整したラインパターン印刷基板に播種し、高圧酸素処理脱細胞羊膜上に細胞転写を行い、生体外で毛細リンパ管シートを作成することを試みた。次に、この移植片を移植する病態モデルとしてマウスを使用し、尾部浮腫モデルを作成した。このマウス浮腫モデルに市販ヒト成人皮膚細胞由来間葉系幹細胞 (Adult Dermal MSC: AD-MSC) の細胞上清を注入し、浮腫の改善についての評価を行った。評価は経時的に尾部径をノギスで測定することによって行った。さらに、MSCの中で抗炎症反応に注目し、抗炎症作用を有する外用薬を局所に塗布することによる浮腫の治癒速度の評価を行った。

4. 研究成果

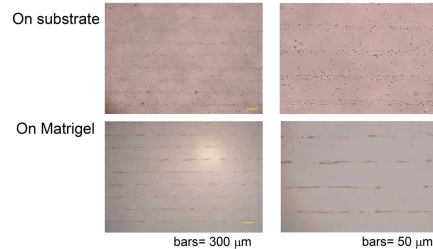
(1) 生体外での毛細リンパ管作成

細胞パターン基板を使用し細胞転写を行うと(図2)、マトリゲル上に毛細リンパ管がライン状に作成されることが確認された(図3)。これを共焦点レーザー顕微鏡で観察すると管腔構造が確認できた(図4)。



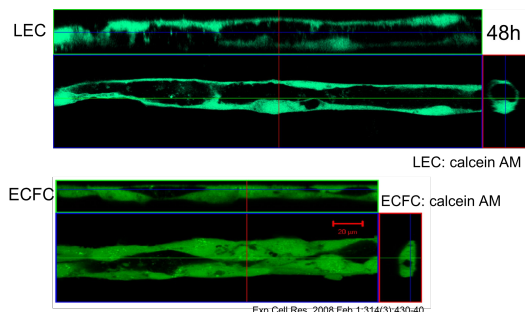
(図2) 細胞パターン基板の作成方法とパターン基板を利用した細胞転写による管腔形成方法

Tube formation assay using LEC by phase-contrast microscopy



(図3) リンパ管内皮細胞を細胞パターン基板に播種し24-48時間培養を行い、その後マトリゲル上に24-48時間静置するとマトリゲルに細胞が転写され、脈管が形成された。

Tube formation assay using LEC by laser confocal microscopy



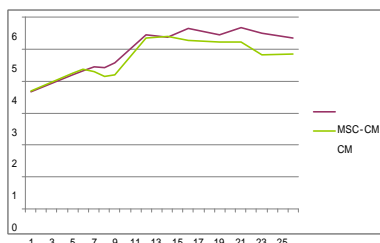
(図4) 形成された脈管をカルセイン CM で染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、内腔が認められ、血管内皮細胞と同様に管腔構造が形成されていることが確認できた。(LEC: リンパ管内皮細胞 ECFC: 血管内皮前駆細胞)

以上の操作を高圧酸素処理脱細胞羊膜上に細胞転写を行い、生体外で毛細リンパ管シートを作成することを試みたがリンパ管内皮細胞が羊膜上に転写されず、細胞接着度の違いが原因と推察された。これにより、組織移植を行う

(2) リンパ浮腫モデルの作成については、耳介、下肢などを試みたが、最も安定して浮腫を作成できる尾部モデルを使用することとした。尾部の基部から1cm尾側を2mm幅・2mm厚で全周性に表皮を剥離すると、遠部位

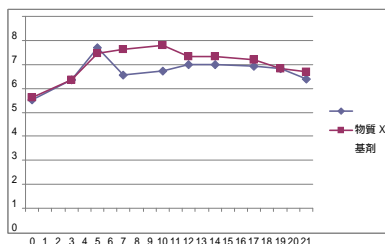
にリンパ浮腫が形成された。このモデルにおける浮腫のピークは 7-14 日であり、その後は徐々に軽快した。

次に AD-MSC を培養してその上清 (CM: Conditioned Medium) を濃縮したものを局所注入し、経時的に尾部径の測定を行ったが、コントロール群に対して有意な浮腫の改善を認めなかった (図 5)。



(図 5) MSC-CM と CM の局所注入後の尾部径 (mm) の経時変化

また MSC-CM 投与群ではコントロールである CM 投与群と比較して、むしろ浮腫改善遅延がみられる傾向に関して、炎症を惹起した可能性が否定できない肉眼的所見であることから、抗炎症作用を有する皮膚外用剤 X を使用したところ、皮膚外用剤 X とその基剤 (コントロール) では皮膚外用剤 X の方が浮腫改善傾向が早期にみられることがわかった (図 6)。



(図 6) 皮膚外用剤 X と基剤 (コントロール) の局所塗布後の尾部径 (mm) の経時変化

以上の結果より、リンパ浮腫の改善にはリンパ管再生のみではなく、炎症の制御が大きく関与している可能性が高く、今後、さらなる検討をすすめる必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Honda I, Taki A, Morioka C, Komaki M, Miyasaka N, Oshima N, Morio T, Kubota T, Morita I. Mesenchymal stem cells ameliorate intra-amniotic inflammation-related neonatal complications in rats. *Inflammation and Regeneration* 35(5):261-268, 2015 査読有

2. Honda I, Taki A, Morioka C, Oshima N, Toba M, Komaki M, Morio T, Miyasaka N, Kubota T, Morita I. A novel rat model of intra-uterine infection using lipopolysaccharide: evaluation of placental and neonatal complications. *Placenta* 35(10):A13, 2014 査読無

3. 大島乃里子 臍帯血および末梢血由来 endothelial colony-forming cells の分離と細胞特性の比較. *産科と婦人科* 81(1): 91-93, 2014 査読無

(学会発表)(計 6 件)

1. Noriko Oshima-Sudo, Izumi Honda, Ken-ichi Nakahama, Toshiro Kubota, Ikuo Morita: Tissue engineered lymphatic microvessels using cell-printing technology, The 18th International Vascular Biology Meeting: 14-17, Apr, 2014, Miyakomesse (Kyoto・Kyoto)

2. 大島乃里子、本多泉、中浜健一、久保田俊郎、森田育男: 印刷基板を用いた生体外リンパ管作成 第 35 回日本炎症・再生医学会万国津梁館 2014 年 7 月 1-4 日 (沖縄県・名護市)

3. Noriko Oshima-Sudo, Izumi Honda, Satoshi Obayashi, Masakazu Terauchi, Ken-ichi Nakahama, Toshiro Kubota, Ikuo Morita: Optimized method for culturing endothelial colony forming cells from human umbilical cord blood and tissue engineered capillary vessels using printing technology, The 5th Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation:18-20, Oct, 2013 Keio Plaza Hotel Tokyo (Tokyo・Shinjuku)

4. 大島乃里子、本多泉、久保田俊郎、森田育男: リンパ管再生に向けた基礎的検討 血管生物医学会 2013 年 9 月 26-28 日 千里阪急ホテル (大阪府・豊中市)

5. 大島乃里子、本多泉、寺内公一、尾林聡、久保田俊郎、森田育男: 臍帯血および末梢

血由来 Endothelial colony-forming cells の
分離と細胞特性の比較 日本産科婦人科学会
2013年5月10-12日 ロイトン札幌、ホテル
さっぽろ芸文館、札幌プリンスホテル、札
幌市教育文化会館（北海道・札幌市）

6. Noriko Oshima-Sudo, Yuko Hoshino,
Motohiro Komaki, Ken-ichi Nakahama,
Toshiro Kubota, Mayumi Abe, Ikuo Morita:
Optimized method for culturing outgrowth
endothelial progenitor cells from human
umbilical cord blood and adult peripheral
blood. 17th International Vascular Biology
Meeting, June 5, 2012 Wiesbaden
(Germany)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 乃里子 (OSHIMA, Noriko)
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研
究科 助教
研究者番号：30611058

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：