

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861504

研究課題名(和文)リンパ浮腫の発症メカニズムに介入する非侵襲的予防的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of noninvasive prophylactic treatment for intervention in the mechanism of development of lymphedema

研究代表者

矢吹 雄一郎(YABUKI, Yuichiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30610357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫モデルラットの検証と、リンパ浮腫におけるレニン・アンジオテンシン系に関する検証を試みた。

において、我々が作成したモデルラットでは粗大な浮腫は1週程度継続し、組織学的変化は4週以上継続した。16週以上経過すると組織学的変化は消失し、深部リンパ管の拡張などを認めた。ラットでは代償的なリンパ流が形成され慢性リンパ浮腫にはならないことが示唆された。

では慢性リンパ浮腫患者のヒトリンパ管検体の供与を受け、免疫組織学的な解析をした。一部にTNF- α 、その他アンジオテンシンII受容体などが陽性であった。慢性リンパ浮腫の発症に炎症性サイトカインやレニン・アンジオテンシン系の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to verify 1) lymphedema model rat and 2) verify the renin / angiotensin system in lymphedema.

1) obvious edema lasted about 1 week in the model rats we created, and histological changes lasted more than 4 weeks. After 16 weeks, histological changes disappeared, and deep lymphatic vessels were expanded. It was suggested that collateral lymph flow was formed in rats and did not result in chronic lymphedema.

2) human lymph duct specimen of chronic lymphedema patient was provided and immuno-histological analysis was done. In part, TNF- α , other angiotensin II receptor, etc. were positive. Inflammatory cytokines and renin / angiotensin system were suggested to be involved in the development of chronic lymphedema.

研究分野：形成外科学

キーワード：リンパ浮腫 マイクロサージャリー レニン・アンジオテンシン 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

学術的背景

リンパ浮腫は何らかの原因でリンパ液が皮下組織に貯留する結果生じる。世界的にはフィラリア感染症によるものが最も多く、その患者数は1億4千万~2億5千万人と推定されている。本邦においては、悪性腫瘍に関連する外科治療や放射線治療により生じた続発性リンパ浮腫が圧倒的に多い。その発症率はリンパ浮腫診断治療指針(リンパ浮腫療法士認定機構、2013年発行)によると、婦人科癌術後で2.4%~36%、乳癌術後で21.4%とされている。有病者数は明らかにはされていないが、本邦での悪性腫瘍罹患率と手術施行数などを考慮すると、続発性リンパ浮腫有病者数は計り知れない。

続発性リンパ浮腫は、リンパ節郭清や放射線性の障害などで中枢のリンパ流の閉塞が起こり、リンパ管内圧が上昇するため生じると言われている。リンパ管内圧の上昇はリンパ管の変性を起こし、リンパ管機能を障害する(Mihara M, et al. *PlosONE*. 2012)。進行例においては、リンパ管ばかりではなく皮膚皮下組織の線維化など不可逆的な変化をきたし、難治性となる。

リンパ浮腫に対する現行の治療としては、弾性着衣や包帯を用いた圧迫療法やマニュアルリンパドレナージが行われている。これらはリンパ管に集まるリンパ液を減少させリンパ管への負荷を軽減することを目的としている。しかし、その直接的な効果は証明されていないばかりか、対症的なアプローチであるため、患者はそれらの治療を永続的に行わなければならない。

そこでリンパ管内圧を物理的に減ずる手法として、リンパ管静脈吻合術を中心とした外

科治療が形成外科領域で近年活発に行われている。これらは、顕微鏡下にリンパ管と静脈を吻合しリンパ液のシャントを直接形成する手術である。その有効性と吻合部長期開存の証明は長らくされていなかったが、近年我々は世界に先駆けてそれらを証明した(Yabuki Y, et al. *Japanese Journal of Lymphology*. 2011 / Maegawa J, Yabuki Y, et al. *Journal of vascular surgery*. 2012)。その一方でリンパ管静脈吻合術は手技的に難易度が高いため、日本に限らず世界中でも限定的な施設でしか施行できない。また、リンパ管の変性や皮膚皮下組織の線維化など不可逆的な変化に対しては治療効果を持たないため、治療効果が限定的であると言える。つまり、リンパ浮腫を発症し、それが進行すると、完治を目標とすることは難しくなってくる。そのため、リンパ浮腫発症を予防するための治療法の開発が臨床的に極めて重要な解決課題であり、世界におけるニーズも非常に高い。

2. 研究の目的

リンパ管内圧を内科的に減ずることを目標とし、我々は降圧薬の効果に着目した。降圧薬は数多く開発されているが、その中でもアンジオテンシン受容体遮断薬(以下 ARB)は、心臓、腎臓、肝臓領域において、抗線維化や抗炎症効果が以前より報告されている。つまり、ARB はリンパ浮腫において、リンパ管内圧低下ばかりでなくリンパ管や皮下組織の抗線維化や抗炎症効果を発揮すると期待される。本研究は、それらを評価し、新たな非侵襲的予防的治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1)リンパ浮腫モデルラットの作成と検証

リンパ浮腫モデルラットに関して、すでに複数の報告がある。しかし、骨盤内のリンパ節郭清や放射線照射など複数の手技を複雑に行わなければならない、安定したモデルとは言い難い。そこで、ヒトにおける外科手術と同様に、患肢に比較的単純な侵襲を加える実験系で検証した。具体的にはラット後肢片側に、i) 鼠径部全周性皮膚切開、ii) 鼠径部・膝窩部リンパ節郭清、iii) 大腿動静脈周囲リンパ管切除、iv) 皮膚内反縫合を行った。それによって得られたモデルの 周径測定、組織学的評価、インドシアニングリーン(以下ICG)蛍光リンパ管造影によるリンパ流の評価の経時的な変化を検証した。

(2)慢性リンパ浮腫の組織学的解析

本学倫理委員会承認のもと慢性リンパ浮腫患者のヒトリンパ管検体の供与を受け、免疫組織学的な解析をした。具体的には、LYVE-1やpodoplaninといったリンパ管内皮細胞に関連するもの、補体やIL-6、TNF- α など炎症に関連するもの、アンジオテンシンII受容体やアンジオテンシン転換酵素などレニンアンジオテンシン系に関連するものを評価した。

4. 研究成果

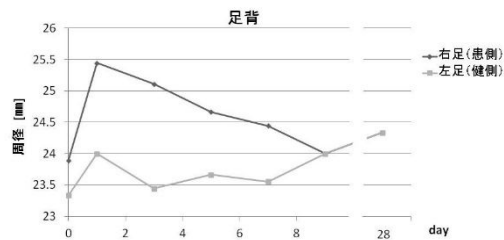
(1)リンパ浮腫モデルラットの作成と検証

周径変化

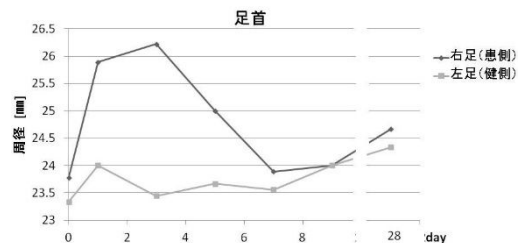
作成したリンパ浮腫モデルラットの周径を経時的に計測した。肉眼的な浮腫は術後1-2日目に認められた(図1)。足背部と足首部において周径を計測したところ、術後1-3日目をピークし浮腫が7日間程度継続した(図2、3)。



(図1)術後足部の変化



(図2)足背部周径の変化(n=3)

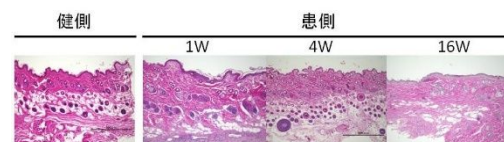


(図3)足首部周径の変化(n=3)

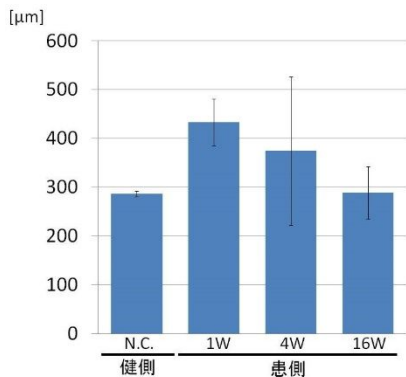
真皮厚さ変化

作成したモデルラットの皮膚を大腿部で採取し、Hematoxylin & Eosin染色(以下HE染色)を行った。それぞれの切片において、ランダムに設定した3点で真皮厚さを測定した。

観察した切片においては、膠原繊維の増生などは認めなかった。術後1週間のものが真皮厚さが大きかったが、経時的に減少し、術後16週では術前と同様の真皮厚さへ変化した(図4、5)。



(図4)真皮厚さの変化(HE染色)

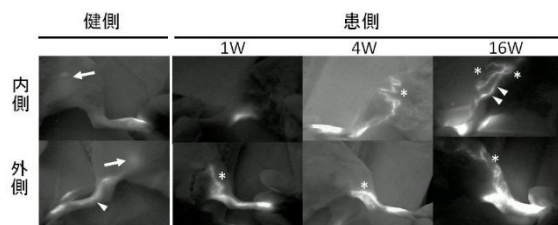


(図5)真皮厚さの変化(n=3)

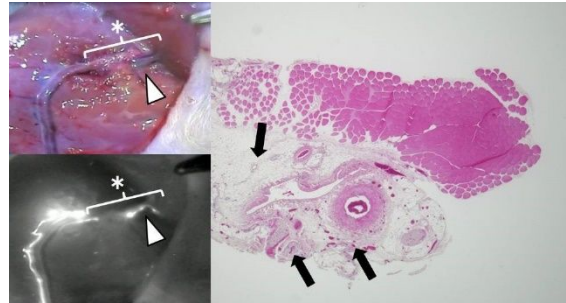
ICG蛍光リンパ管造影

術後1週、4週、16週にICG蛍光リンパ管造影を行なった。ラットにおいてはヒトと異なり筋膜下の深部リンパ管が経皮的に観察できた(図6、白矢頭)。術後1週より障害されたリンパ液がうっ滞し、皮内皮下レベルの細い集合リンパ管もしくは毛細リンパ管が拡張しているのを認めた(図6、白矢印)。術後1週、4週において深部リンパ管系は障害され、皮内皮下のものしか同定できなかったが、術後16週には深部リンパ管系を再び同定することができた(図6、右、白矢頭)。

術後16週に、皮膚切開を行い、創内を観察したところ、切除摘出したはずの動静脈周囲にリンパ管流側副路の発達を認めた。検体を採取し、組織学的に解析したところ、動静脈周囲にリンパ管と思われる細径脈管構造を複数認めた(図7)。



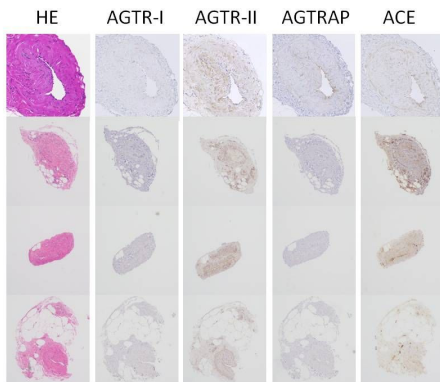
(図6) ICG 蛍光リンパ管造影と経時的変化



(図7)術後16週におけるICG蛍光リンパ管造影と組織学的評価。左上下：開創下に観察したところ、動静脈周囲のリンパ管を切除した部位(*部)に線状陰影認め、リンパ側副路の形成を認めた。右：組織学的に評価したところ、動静脈周囲に内腔に赤血球を認めない細径脈管を複数認めた。

(2)慢性リンパ浮腫の組織学的解析

方法に記した通り、各種免疫組織学的な解析を行った。炎症に関連するものでは、一部の組織においてTNFが陽性となり、リンパ浮腫の発症要因としてTNFに関連する炎症反応が想定された。一方、各種補体やIL-6などは陰性～弱陽性であった。また、レニンアンジオテンシン系の免疫染色においては、アンジオテンシンII受容体TypeIIがリンパ管中膜の層に、アンジオテンシン受容体関連蛋白はリンパ管内皮の層に発現を認めた。これより、組織障害に伴い、レニンアンジオテンシン系の一部が亢進していることが示唆された。以下にレニンアンジオテンシン系に関連する免疫染色を記す(図8)



(図8)ヒトリンパ管検体の免疫組織学的評価
HE染色と各種免疫染色を行った(PtN=4)。
AGTR-1 : アンジオテンシンII受容体Type-I、
AGTR-2 : アンジオテンシンII受容体Type-II、
AGTRAP : Angiotensin II Receptor
Associating Protein、ACE : アンジオテンシ
ン転換酵素

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

平出さおり、前川二郎、原発性リンパ浮腫および続発性リンパ浮腫における組織形態学的解析、日本リンパ学会、2016年6月24日~25日、東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都)

三上太郎、前川二郎、原発性リンパ浮腫についての組織学的検討 その経緯と今後の方向性、日本形成外科学会基礎学術集会、2016年9月15日~16日、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府)

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢吹 雄一郎(YABUKI, Yuichiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号 : 30610357

(2)研究協力者

前川 二郎(MAEGAWA, Jiro)

廣富 浩一(HIROTOMI, Koichi)

松原 忍(MATSUBARA, Shinobu)

北山 晋也(KITAYAMA, Shinya)