

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390208

研究課題名(和文)リンパ浮腫治療に向けたリンパ管再生療法の展開研究

研究課題名(英文)Establishment of therapeutic lymphangiogenesis for lymphedema

研究代表者

室原 豊明(MUROHARA, TOYOAKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90299503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫はリンパ管の閉塞や破壊により組織間質のリンパ液排出不全によって生じる。リンパ浮腫は患者のQOL低下させるが、現状では対症療法が主で根本的治療は未だない。我々は新しいリンパ浮腫治療法の確立のため、リンパ管再生療法に関する研究を行った。動物モデルを用いて脂肪組織由来幹細胞(ADRC)移植により、毛細リンパ管を再生してリンパ浮腫が改善するか否かを検討した。マウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて、ADRC移植により局所のリンパ管が再生されリンパ浮腫が改善した。機序として、ADRCから分泌されたVEGF-Cがリンパ管内皮を刺激したり、リンパ管内皮前駆細胞の動員を増強させた可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lymphedema is a serious clinical problem that occurs after surgical resection of cancers. We report that implantation of adipose-derived regenerative cells (ADRCs) can induce lymphangiogenesis in a mouse model of lymphedema. ADRCs were isolated from C57BL/6J mice. To examine the efficacy of ADRC implantation in vivo, we established a new mouse model of tail lymphedema. Lymphedema was improved significantly by local injection of ADRCs. Histological analysis revealed that lymphatic capillary density was greater in the ADRC group than in the PBS-injected control group. Tissue expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) was greater in the ADRC group than in the control group. ADRCs released VEGF-C, which stimulated lymphangiogenesis. Implantation of ADRCs also enhanced recruitment of M2 macrophages, which served as lymphatic endothelial progenitors. In conclusion, implantation of ADRCs could be a useful treatment option for lymphedema by mediation of lymphangiogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：再生医学 リンパ浮腫 リンパ管再生 リンパ管内皮細胞 細胞移植療法 間葉系幹細胞 脂肪組織由来幹細胞 サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫はリンパ管の閉塞や破壊により起こる浮腫で、主にガン治療でのリンパ節郭清術や放射線・抗ガン剤治療を原因とすることが多い。子宮ガンや乳ガンなどの手術後に多く発生し(術後5~20%前後)、現在国内で5万人以上が苦しんでいると言われている。術後リンパ浮腫に対しては、理学療法・薬物療法・手術などが試みられているが、有効な治療法はほとんどなく、疼痛や繰り返す炎症で苦しむ事が多い。足の屈伸・歩行などが障害され、その結果生活の質(QOL)も非常に低下する厄介な病態である。このため新しい抜本的な治療法が期待されている。

### 2. 研究の目的

現在期待されている治療法の一つが、再生医療の一つとしての「リンパ管再生療法」である。これはリンパ浮腫局所に毛細リンパ管を再生させることによって、うっ滞したリンパ液をうまく排泄(ドレナージ)させ、浮腫に伴う症状を軽減させるものである。リンパ管再生に関する基礎研究は徐々に発展してきたが、未だトランスレーショナル研究そのものが少なく、臨床応用も皆無である。本研究では、血流障害を伴わないリンパ流障害の動物実験モデルをまず作成・確立し、そのモデルを用いて、近い将来に臨床応用が可能と期待される自己体性幹細胞移植を用いた有効な「リンパ管再生療法の確立」を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス自己皮下脂肪組織からのADRC分離と特徴の解析

マウスADRCを皮下脂肪より分離し、細胞表面マーカーを検索すると、Sca-1陽性、Lin陰性の細胞群が得られる。このADRCを移植すると、マウス下肢虚血モデルにおいては血管再生が起き、ドップラー血流計による血流の有意な回復が観察され、組織毛細血管密度も改善することが確認されている(Kondo, Murohara et al. ATVB 2009; 29: 61-66)。さらにヒトADRCは、すでに乳がん手術後の乳房再建や、術後尿失禁などでは臨床応用がなされており、近未来の臨床実現性が非常に高い。またオランダでは虚血性心疾患にも冠動脈内注入によって血管再生療法目的ですでに臨床応用され良好な成績が報告されている(Serruys et al. APOLLO Trial. 2010, Meliga et al. Cell Transplant. 2007; 16: 963-970)。

#### (2) ADRCによるリンパ管再生への効果に関する基礎的検索。

(ADRCのサイトカイン産生能に関する評価) ADRCを培養する過程で、どのようなサイトカイン(成長因子やケモカイン)が細胞から分泌されるのかを検索する。様々なサイトカインのELISA系、Western blot, RT-PCRなどを用いて、特に血管新生やリンパ管内皮細胞新生に関連すると思われるサイトカインの発現・分泌の程度を検索する。具体的には、VEGF-A, VEGF-C, bFGF, HGFなどの発現を検討する。

(ADRCがリンパ管内皮細胞に分化するか否かの検討) ADRCには間葉系幹細胞(MSC)が含まれるが、骨髄由来のMSCやMNCは分化誘導によりリンパ管内皮細胞(LEC)に分化しうるとの報告がある。(参考文献Circulation

2009; 119: 281-289, Circulation 2010; 122: 1413-1425)。そこで、まずADRCをin vitroで培養するとリンパ管内皮細胞(LEC)の性質を有してくるか否かを検討する。ADRCを通常培地(DMEM)で培養するものと、成長因子が含まれた内皮細胞用培地(EGM-2MV)で培養して2週間観察する。2週間後にRT-PCRによるリンパ管内皮特異的マーカー

podoplanin の発現およびLYVE-1の免疫染色により評価する。また、培養細胞から得たRNAをRT-PCRによりVEGF-Cの発現の有無、培養上清をELISAにてVEGF-C濃度を測定することによりADRCがVEGF-Cを分泌するか否かを検討する。ADRC自身がVEGF-Cを分泌していれば、VEGF-Cの添加なしでもADRCがLECへと分化誘導し、その時にADRC自身が分泌するVEGF-Cがautocrine的に働いている可能性が考えられる。

#### (3) マウスリンパ浮腫モデルの作成とADRCの効果についての検討

マウスの尾モデルを用い、血流障害を伴わない慢性のリンパ浮腫モデルを作成する。このモデルが完成したら、ADRC移植によるリンパ管再生への効果についてIn vivo でさらに検討を加える。C57BL6(雄7-8週齢)マウスに、尾部リンパ浮腫モデルを作成して、24時間後にマウスADRC( $2 \times 10^6$ 個)、あるいはマウス骨髄単核球細胞 $2 \times 10^6$ 個(陽性細胞コントロール群) VEGF-Cリコンビナント蛋白( $10 \mu\text{g}$ , 陽性サイトカインコントロール) あるいはPBS( $100 \mu\text{l}$ )コントロールを病変部に移植あるいは注入する(参考文献Circulation 2009; 119: 281-289, Circulation 2010; 122: 1413-1425)。引き続き尻部浮腫領域

の直径をノギスで計測し、浮腫の経時的変化の定量評価を1～3日毎に行う。さらに慢性期（第28病日）においては、リンパ浮腫の合併症としてしられる象皮病様皮膚病変や蜂窩織炎（炎症細胞浸潤）などの病理学的な評価も各群の採取組織で比較検討する。また第7、14、28病日に安楽死させたマウスの尾部組織を採取し、抗LYVE-1抗体による免疫染色を施行して、新生リンパ管内皮細胞（lymphatic endothelial cell: LEC）の組織学的評価を行う。またGFPトランスジェニックマウス由来のADRCを用いて、移植されたADRCがLECに分化して新生リンパ管再生に直接関与するか否か、またはどのようなサイトカイン（特に VEGF-C など）を移植された組織内で発現しているかを免疫組織学的に検討する。

#### (4) リンパ管新生の分子細胞学的機序に関する探索研究

2次性リンパ浮腫におけるリンパ管再生の機序は明らかでない点が多いが、虚血組織における血管再生のごとく、血管再生（angiogenesis）および血管発生（vasculogenesis）のような様式がリンパ管再生機序としてもあるのかどうかを検討する。まず、我々の作成したモデルにおいて上記探求するサイトカインの反応として、リンパ管内皮細胞への直接作用による既存の近傍リンパ管からの発芽（angiogenesis）が起こりえるのか否かをヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞（HMVEC-dLy）を用いて検討する。リンパ管内皮細胞におけるシグナル伝達経路の評価としては、ADRCの産生するサイトカイン（conditioned medium: CM）が、リンパ管内皮細胞のeNOSやErkなどを活性化するか否かをWestern blot法により評価する。同様に、ADRC-CMがリンパ管内皮細胞の遊走能促進作用や増殖能増強作用を有するか否かを、それぞれmodified Boyden chamber assayとWST-1 proliferation assay法を用いて検討する。またパラクライン作用としてADRC-CM中のサイトカインが、骨髄に存在するLYVE-1陽性のリンパ管内皮前駆細胞の局所への動員を促進しえるのか否かを、リンパ浮腫モデルにおける免疫組織学的評価にて検討する。さらに最近の話題として、炎症組織、癌組織を中心にマクロファージと血管新生およびリンパ管新生の報告がなされている（*J. Clin. Invest.* 2005;115:2363-2372, *J. Clin. Invest.* 2005;115:2316-2319）が、リンパ浮腫という病態においてもリンパ管新生とマクロファ

ジには関連があるのか否か免疫組織学的に検討する。そしてADRC移植によるマクロファージの動態に及ぼす影響も検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス自己皮下脂肪組織からのADRC分離と特徴の解析

マウスADRCを皮下脂肪より分離することができた。マウスのソケイ部より皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理の後遠心分離をほどこし、ADRCを得た。細胞表面マーカーを検索すると、Sca-1陽性、Lin陰性の細胞群が得られた。このADRCを移植すると、マウス下肢虚血モデルにおいては血管再生が起き、ドプラー血流計による血流の有意な回復が観察され、組織毛細血管密度も改善することが確認されている（Kondo, Murohara et al. *ATVB* 2009; 29: 61-66）。ADRCは間葉系の幹細胞であり、これまでに多分化能が確認されている。

##### (2) ADRCによるリンパ管再生への効果に関する基礎的検索。

ADRC培養過程では、一部内皮細胞様に分化した細胞も見られたが、有意ではなかった。また、ADRCの培養上清中には、サイトカインである VEGF-C が含まれていることが判明した。その他にも、VEGF-Aや bFGF も含まれている事が明らかとなった。その後、in vivo モデルの解析とも合わせ、ADRC自体はリンパ管内皮細胞にはほとんど分化しない事が判明した。また、移植された ADRCからはVEGF-C が産生放出され、これらがまずそこに存在するリンパ管内皮細胞を刺激し、リンパ管の再生を促す効果があることが示唆された。また、放出された VEGF-Cは組織に存在するM2型マクロファージを刺激し、これらをリンパ管内皮前駆細胞に転換させ、これらがリンパ管新生に関与している可能性も示唆された。

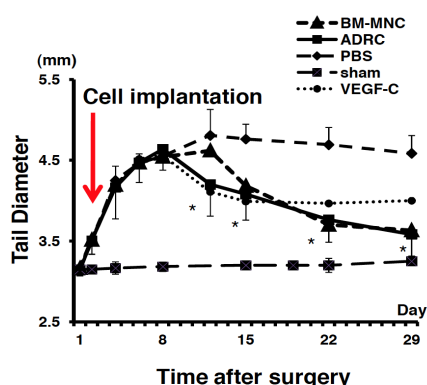
##### (3) マウスリンパ浮腫モデルの作成とADRCの効果についての検討

in vivo モデルであるマウスの尻尾モデルを用い、図に示すように血流障害を伴わない慢性のリンパ浮腫モデルが作成できた。血流



障害がないことは、レーザードプラー血流

計にて血流の遮断や低下が無いことを確認した。次に、このモデルを用い、ADRC移植によるリンパ管再生への効果についてIn vivo で検討した。C57BL6 (雄7-8週齢)マウスに、上記の尾部リンパ浮腫モデルを作成して、24時間後にマウスADRC ( $2 \times 10^6$ 個)、あるいはマウス骨髄単核球細胞 (BM-MNC)  $2 \times 10^6$ 個 (陽性細胞コントロール群)、VEGF-Cリコンビナント蛋白 ( $10 \mu\text{g}$ , 陽性サイトカインコントロール) あるいはPBS ( $100 \mu\text{l}$ ) 陰性コントロールを病変部に移植あるいは注入した。引き続き尻部浮腫領域の直径をノギスで計測し、浮腫の経時的変化の定量評価を行ったところ、ADRC移植群、BM-MNC移植群、VEGF-C治療群では、いずれも経過中に浮腫の改善が見られた。

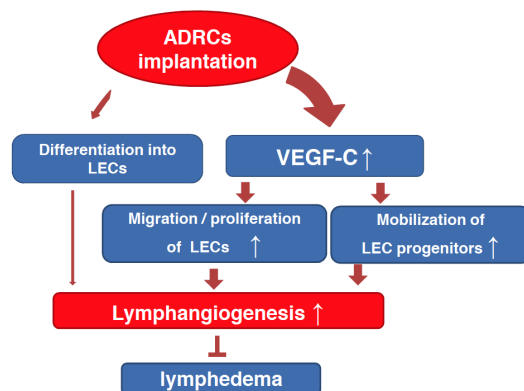


一方、PBS移植群では改善は見られなかった。さらに慢性期 (第28病日) においては、治療した3群において、象皮病様皮膚病変や炎症細胞浸潤などの病理学的な変化がいずれもPBSコントロール群に比べて、軽度であった。抗LYVE-1抗体による免疫染色を施行して、新生リンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell: LEC) の組織学的評価を行ったところ、ADRC移植群ではPBS注入群に比べて、有意にリンパ管の再生が強くみられた。GFPトランスジェニックマウス由来のADRCを用いて、移植されたADRCがLECに直接分化して新生リンパ管再生に直接関与するか否か検討したところ、直接の分化はほとんど観察出来なかった。

#### (4) リンパ管新生の分子細胞学的機序に関する探索研究

上記の記載のごとく、ADRC移植により、血管再生型 (angiogenesis) および血管発生型 (vasculogenesis) の両方の様式でリンパ管が再生することが明らかにされた。この過程では、ADRCから産生されるVEGF-Cが重要な役割を担っていることが確認された。また放出されたVEGF-Cは、リンパ管内皮細胞のeNOSや

Erkなどを活性化することも確認できた。以上の研究成果は、論文として発表する事が出来た。



#### 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 8件)

Shimizu Y, Shibata R, Ishii M, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Kataoka Y, Kihara S, Murohara T, Ouchi N.

Adiponectin-mediated modulation of lymphatic vessel formation and lymphedema.

*J. Am. Heart Assoc.* 2013;2:e000438. (査読有り)

Yamamoto T, Shibata R, Ishii M, Kanemura N, Kito T, Suzuki H, Miyake H, Maeda K, Tanigawa T, Ouchi N, Murohara T. Therapeutic reendothelialization by induced pluripotent stem cells after vascular injury--brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33:2218-2221. (査読有り)

Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. *Sci. Rep.* 2013;3:1418. doi: 10.1038/srep01418. (査読有り)

Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Kambara T, Yamamoto T, Ogura Y, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N. Adipose-derived factor ctrp9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *FASEB J.* 2013; 27:25-33. (査読有り)

Uchida Y, Takeshita K, Yamamoto K, Kikuchi R, Nakayama T, Nomura M, Cheng XW, Egashira K, Matsushita T, Nakamura H, Murohara T. Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: Role of visceral adipose-derived monocyte chemoattractant protein-1. *Diabetes.* 2012;61:1552-1561. (査読有り)

Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R,

Kataoka Y, Kambara T, Kito T, Maruyama S, Yuasa D, Matsuo K, Enomoto T, Uemura Y, Miyabe M, Ishii M, Yamamoto T, Shimizu Y, Walsh K, Murohara T. Therapeutic impact of Follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical animal models.

*Circulation*. 2012; 126: 1728-1738. (査読有り)

Shimizu Y, Shibata R, Shintani S, Ishii M, Murohara T. Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells. *J. Am. Heart Assoc.* 2012;1:e000877. (査読有り)

Miyake H, Maeda K, Asai N, Shibata R, Ichimiya H, Isotani-Sakakibara M, Yamamura Y, Kato K, Enomoto A, Takahashi M, Murohara T. The actin-binding protein girdin and its akt-mediated phosphorylation regulate neointima formation after vascular injury. *Circ. Res.* 2011;108:1170-1179. (査読有り)

[学会発表](計 12件)

Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Ishii M, Changning H, Murohara T: A Novel Therapeutic Strategy for Secondary Lymphedema by Adipose-Derived Regenerative Cells. Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2012年3月17日, 第76回日本循環器学会, 福岡国際会議場, 福岡市)

Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Ishii M, Changning H, Hayashida R, Murohara T: Adipose-derived regenerative cells implantation alleviates lymphedema via augmentation of VEGF-C mediated M2 macrophage mobilization. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2012 (November. 4, 2012 in Los Angeles, USA). Shimizu Y, Shibata R, Ohashi K, Ishii M, Shintani S, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin stimulates lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2012 (November. 5, 2012 in Los Angeles, USA).

Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Izumi Y, Ogura Y, Ishii M, Murohara T: Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells. The European Society of Cardiology (ESC) Congress 2011 (August 28, 2011 in Paris, France).

Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Izumi Y, Ogura Y, Ishii M, Murohara T: M2 macrophages contribute to postnatal lymphangiogenesis as lymphatic endothelial cell progenitors. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2011 (November. 13, 2011 in Orlando, USA).

Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Izumi Y, Ogura Y, Ishii M, Murohara T: Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances lymphangiogenesis and improves secondary lymphedema. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2011 (November. 14, 2011 in Orlando, USA).

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 90299503

(2)研究分担者

新谷 理 (SHINTANI, Satoshi)  
名古屋大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 20309777

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師  
研究者番号: 70343689

(3)連携研究者

近藤 和久 (KONDO, Kazuhisa)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号: 90644659  
(H24-H25)