

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591865

研究課題名(和文)リンパ浮腫に対する細胞移植治療によるリンパ管再生研究

研究課題名(英文)Lymphangiogenesis with transplantation of mononuclear cells for lymphedema

研究代表者

北市 隆(KITAICHI, Takashi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20335813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、未だ有効な治療法が確立されていないリンパ浮腫に対して、単核球細胞移植治療の可能性を研究、開発するものである。マウスによるリンパ浮腫モデルに対する単核球細胞移植を行い、浮腫の軽減効果、有効な移植経路、リンパ管新生の有無、リンパ管新生の機序を明らかにする事を目的としたが、マウス tail、後肢に二次性リンパ浮腫作成を試みたが、いずれも自然軽快が認められ慢性リンパ浮腫モデルとして適当なモデルが確立できなかった。

研究成果の概要(英文)：Is it possible transplantation of mononuclear cells induce anatomical and functional lymphangiogenesis for lymphedema? We create the secondary lymphedema models of mouse tails and hind legs, but could not get the good chronic lymphedema models, because their lymphedema improved naturally in a few weeks.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：リンパ浮腫 骨髄単核球細胞移植 リンパ管新生

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は、「リンパの輸送障害に組織間質内の細胞性蛋白処理能力不全が加わって高蛋白性間質液が貯留した結果起きる臓器や組織の腫脹」(Foeldiらによる定義)であり、乳癌や子宮癌の手術や放射線治療によりリンパ系の輸送障害が発生した場合や、先天的なリンパ管の発育不良が原因となる。しかし、リンパ浮腫に対する薬物治療、手術療法などの有効な治療法は確立されておらず、現在では劇的な改善、永続的な完治はほぼ不可能であり、唯一「複合的理学療法」を一生涯にわたり実践、継続するしかないと考えられている。

今までに我々は、血液アフエレーシスにより採取した自己リンパ球を患肢中枢側の動脈から注射すると劇的に浮腫が軽減する症例があることを見だし報告した(Katoh I: Jpn. J. Surg. 14: 331-334, 1984)。以後、そのメカニズムについて究明し、リンパ球動注後の浮腫液にはある種の蛋白が出現し、その蛋白分解能が浮腫軽減の一役を担っている可能性があること(Egawa Y: Lymphology 26: 169-176, 1993)、Indium-111でラベルされたリンパ球が動注後の患肢で長期にわたり停滞していること(Yoshizumi M: Lymphology 27(Suppl): 278-281, 1994)、注入する自己リンパ球中や動注後の血液中ではL-Selectin濃度が高く、接着分子の関与が示唆されること(Ogawa Y: Lymphology 32: 151-156, 1999)を報告してきた。しかし、本治療も効果は永続せず、そのメカニズムも完全には解明されていない。

また、近年の再生医療の進歩に伴い重症の動脈閉塞性疾患に対してはVEGF遺伝子や骨髄または末梢血幹細胞移植による血管新生が試みられるようになってきているが、リンパ管再生に関する報告は少ない。最近になり2次性リンパ浮腫に対しVEGF-C遺伝子(Yoon YS: J Clin Invest. 111: 717-725, 2003)やHGF遺伝子(Saito Y: Circulation 114: 1177-1184, 2006)によるリンパ管新生の実験的報告がなされてきているが、幹細胞移植によるリンパ管新生の報告はまだ見あたらない。

単核球細胞移植による再生医療の可能性に関して言えば、我々は、マウス monocrotaline誘発肺高血圧モデルに対し、経静脈的な同種骨髄単核球細胞移植が肺血管床の質的、量的な改善をもたらす、それがVEGF-VEGFRによるパラクリン系を介する血管新生によって惹起され、結果として肺高血圧が改善すること、この治療的血管新生は肺血管床の増加によって肺循環を改善する有効な手段となる可能性がある

ることを見出した(Yoshida H: Ann Thorac Surg 88: 418-425, 2009)。

また臨床では、我々は重症虚血肢に対し血液アフエレーシスにより採取した末梢血単核球を患肢筋肉内に投与を行い、その有効性を報告したが(Iwase T: Shikoku acta medica 62: 137-141, 2006)、これに用いた細胞は、当時リンパ球動注療法にリンパ球と称して用いた細胞に他ならず、投与経路は違うもののリンパ浮腫に対する細胞移植治療を我々は既に行ってきたことになる。

しかし、決定的な治療法に欠ける本疾患に対する一般臨床医の関心は低く、患者は腫れる腕や足をかかえ、一生これと付き合いにくことを強いられている。有効な薬物療法、手術治療がない現在、リンパ浮腫に対する有効な治療法を開発するのは、医療に携わる者の責務と考えられた。

## 2. 研究の目的

リンパ浮腫に対する細胞移植治療の有効性について探求する。すなわち、リンパ浮腫(マウスによるリンパ浮腫モデル)に対する幹細胞移植において以下の点を明らかにする。

- (1)浮腫を軽減するかどうか？
- (2)有効な移植経路は、患肢への局所投与、患肢中枢側動脈内投与のどちらか？
- (3)リンパ管新生が行われるか否か？まず骨髄幹細胞を用いた細胞移植を行い、その有効性が確認できれば末梢血幹細胞においてその効果を確認する。

以上の点につき本研究で明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 実験モデルの作成

当初モデル作製に際しラットの使用を考えていたが、実験施設環境、実験の効率化、簡便性を考え、実験動物としてラットではなくマウスを使用した。

(1)マウスtailリンパ浮腫モデル: 週齢8-9の雌性B6マウスを用い、リンパ管を同定するために0.5% Patent blue 0.2mlを左後肢先端の皮下に注入する。tail基部にて全周性の皮膚切開と尾動静脈は温存しつつ皮下組織およびリンパ管郭清を行い、体幹とtailとの間に2-4mmの間隙を作成する。創縁は全周にわたり電気メスにて焼却を加えるだけで放置し二次治癒を待つ。

(2)マウス後肢リンパ浮腫モデル: tailと同様な手技にて片側鼠径部の皮下組織およびリンパ管郭清し、創縁を電気メスにて焼却を加えるだけで放置し二次治癒を待つ。

(3)いずれのモデルも術後経時的に、tailまたは下肢の周囲径を計測、創部が治癒し、リンパ浮腫が形成されるのを確認する。

## 骨髄幹細胞の採取と分離

ドナーと同種系のマウスを使用する。  
炭酸ガスにて安楽死させた後、大腿骨、脛骨、上腕骨、橈骨から骨髄を採取する。  
骨髄中の赤血球を lysis buffer にて溶血、洗浄し白血球成分のみを抽出する。  
抽出液に CD34-FITC 抗体を混合した後、MACS beads 法にて幹細胞のみを分離、採取する。

骨髄単核球細胞のリンパ浮腫モデルへの移植

(1) 術後 2 週間後、Pentobarbital sodium 50mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、リンパ浮腫を作成したマウス tail のリンパ管の状態を ICG を用いた赤外観察カメラシステムを用いて観察する。

(2) 5 匹を犠牲死させ、リンパ浮腫を作成したマウス tail、後肢をホルマリン固定し、病理学的検討に用いる。

(3) 作成したリンパ浮腫モデルラットを以下の群（それぞれ n=10）に分類し、骨髄単核球細胞を投与する。

ラット tail へ局所投与：骨髄幹細胞  $1 \times 10^7$  個/0.25ml を手術部位の中樞側 3 カ所、末梢側 3 カ所にそれぞれ 0.1ml ずつ局注する。

動脈内投与：手術部位中樞側を切開し、尾動脈または大腿動脈を剥離、これへ骨髄単核球細胞  $1 \times 10^7$  個/0.25ml を動注する。

リンパ浮腫に対する骨髄単核球細胞移植の有効性の検討

(1) tail、後肢周囲径の計測

骨髄単核球細胞移植後、7 日、14 日、21 日、28 日、35 日に tail、後肢の周囲径を計測する

(2) 新生リンパ管のマクロ的観察

骨髄単核球細胞移植後、14 日、35 日にリンパ浮腫モデルのマウス tail のリンパ管の状態を赤外観察カメラシステムを用いて観察する。

(3) 新生リンパ管の病理組織学的観察

骨髄単核球細胞移植後、35 日にリンパ浮腫モデルラットを犠牲死させ、ラット tail をホルマリン固定し、パラフィン包埋する。

摘出標本において以下の項目を観察、評価する。

HE 染色にて摘出ラット tail の上皮、皮下組織におけるリンパ浮腫の状態の観察、リンパ管新生の観察

) 蛍光顕微鏡にて、移植した単核球細胞の局在を調べる。

) Western blot analysis により、リンパ管新生に関与する VEGF-C、VEGF receptor3 の発現を測定、定量化する。

) Immunohistochemical analysis: 抗 VEGF receptor 3 抗体にて染色後、抗 VEGF

receptor 3 抗体陽性血管（リンパ管）の数を測定。

以上の項目を上記 5 群で比較・検討する。

## 4. 研究成果

(1) マウス tail の 2 次性リンパ浮腫モデル Tail の経時的変化として、術後約 1 週間で最大の腫脹が認められる傾向にあったが、個体によって浮腫の程度に差が認められ (tail 周囲径の術前比 95-150%)、またこの腫脹は放置した場合でも数週間で自然軽快した。

(2) 以上の結果を踏まえ、体幹と tail の郭清による皮下の間隙を 1cm まで拡げたが、同様な結果であった。

(3) 郭清部の皮膚断端を皮下に縫着し郭清部のリンパの再疎通が起こりにくいと思われる状況を作製したが、一時的な浮腫形成に終始した。

(4) tail でのリンパ浮腫モデル作製を断念し、マウス後肢にてリンパ浮腫作製を行った Tail モデルと同様に術後 7 日に最大周囲径となるが、その後 14 日~21 日で自然軽快した。

(5) tail および後肢リンパ浮腫モデルの作製において、リンパ管同定の困難性。個体によって浮腫の程度に差が認められ、概ね一時的な浮腫はできるが自然軽快する。このため、細胞移植を行う前に多数の個体で浮腫の軽快が認められ、細胞移植の効果が判定できない状況となった。郭清幅の変更や郭清部の皮膚断端の処理法の変更など改良を行ったが、以前安定したモデルが得られなかった。

(6) リンパ浮腫モデルが確立できれば、単核球の採取と静脈内投与の方法についてはすでに単核球移植による肺血管床新生の研究において確立されている。リンパ管新生に対する評価方法やそのメカニズム解明においても同様な方法論が利用できると考える。

## 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 9 件)

Kitagawa T, Kitaichi T, Sugano M, Kurobe H, Techniques and results in the management of multiple muscular trabecular ventricular septal defects, Gen Thorac Cardiovasc Surg, 査読有、61, 2013, 367-375, DOI: 10.1007/s11748-013-0267-8.

Taisuke Nakayama, Takashi Kitaichi, Tetsuya Kitagawa, Gastrointestinal hemorrhage caused by aortoenteric fistula due to aortic aneurysm, 査読有, Asian Cardiovascular and Thoracic Annals published online, Vol.22(5),

2013、629、DOI:  
10.1177/0218492313478434  
Taisuke Nakayama、Hajime Kinoshita、Mikio Sugano、Hirotsugu Kurobe、Tamotu Kanbara、Eiki Fujimoto、Takashi Kitaichi、Hiroshi Fujita、Hitoshi Sogabe、Tetsuya Kitagawa、Delayed-onset severe heparin-induced thrombocytopenia after total arch replacement under cardiopulmonary bypass、THE JOURNAL OF MEDICAL INVESTIGATION、査読有、Vol.60 (No.1,2)、2013、154-158、  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60\\_154/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60_154/_article)

〔学会発表〕(計30件)

北市 隆、菅野幹雄、藤本鋭貴、神原 保、中山泰介、木下 肇、早淵康信、阪田美穂、北川哲也、乳幼児期 PA/VSD に対する Rastelli 型手術の早期 - 遠隔期成績と問題点、第49回日本小児循環器学会総会・学術集会、2013年7月11日-13日、国際オリンピック記念青少年総合センター(東京都)

Takashi Kitaichi、Mikio Sugano、Eiki Fujimoto、Tamotsu Kanbara、Hajime Kinoshita、Taisuke Nakayama、Miho Sakata、Yasunobu Hayabuchi、Tetsuya Kitagawa、PERMANENT EPICARDIAL PACING IN PEDIATRIC PATIENTS、ASCVTS2013、April 4-7 2013、Kobe International Conference/Kobe Portopia Hotel (兵庫県)

北市 隆、菅野 幹雄、藤本 鋭貴、神原 保、木下 肇、中山 泰介、阪田 美穂、早淵 康信、北川 哲也、側方開胸による IAA/CoA に対する大動脈再建の適応と限界、第43回日本血管外科学会学術総会、2013年2月25日-27日、ホテル グランパシフィック LE DAIBA (東京都)

〔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

北市 隆 (KITAICHI, Takashi)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：20335813

(2) 研究分担者

北川 哲也 (KITAGAWA, Tetsuya)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：80240886

黒部 裕嗣 (KUROBE, Hirotsugu)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号：30380083

菅野 幹雄 (SUGANO, Mikio)  
徳島大学・大学病院・医員  
研究者番号：70563807

中山 泰介 (NAKAYAMA, Taisuke)  
徳島大学・大学病院・医員  
研究者番号：80582791

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：