

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462722

研究課題名(和文)リンパ浮腫を薬で治す！～DDS技術を駆使したVEGF-C徐放治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathology of lymphedema and search for effective lymphangiogenesis

研究代表者

小山 明彦(Oyama, Akihiko)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70374486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫の治療法として、保存的治療やリンパ管静脈吻合などの外科的治療が行われているが、治療に難渋することが多い。そのため新たなリンパ管再生を含む有効なリンパ浮腫治療法が望まれる。血管内皮細胞増殖因子の一つであるVEGF-Cはリンパ管内皮を刺激したり、リンパ管内皮細胞の遊走を促進し、リンパ浮腫組織におけるリンパ管再生を誘導することが報告されている。本研究では、リンパ浮腫の効率的な治療の開発を目指し、リンパ浮腫組織におけるVEGF-Cの役割と、浮腫組織におけるVEGF-Cの発現調節に関わる因子を解析した。その結果、リンパ浮腫組織において炎症細胞と低酸素因子が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a treatment for lymphedema, conservative treatment and surgical treatment including lymphaticovenous anastomosis are performed, but treatment is often difficult. Therefore, effective treatment for lymphedema including new lymphatic regeneration is desired. It has been reported that VEGF-C which is one of vascular endothelial cell growth factors induces lymphatic regeneration in lymphedema tissues by stimulating lymphatic endothelium and promoting migration of lymphatic endothelial cells. In this study, we aimed to develop efficient treatment of lymphedema, and aimed to analyze the role played by VEGF-C in lymphedema tissue and factors related to the regulation of expression of VEGF-C in edematous tissue. It was demonstrated that the expression of inflammatory cells such as macrophages and hypoxia response factors such as HIF-1 alpha were increased in the lymphedema.

研究分野：唇顎口蓋裂、リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 リンパ管新生因子 低酸素応答因子 炎症性細胞

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は、主に癌治療におけるリンパ節郭清術や放射線治療を契機として、リンパ管の閉塞や破壊によって生じる。

手術後に生じるリンパ浮腫は、四肢の機能的障害をもたらし、その結果、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させる難治性の病態である。

リンパ浮腫の治療法として、理学療法を主体とした保存的治療や、リンパ管と静脈を吻合する外科的治療が行われているが、治療に難渋することが多い。こうした背景から、新たなリンパ管再生を含む有効なリンパ浮腫治療法が望まれている。これはリンパ浮腫局所に、新たな毛細リンパ管を再生誘導することによって、鬱滞したリンパ液を排泄させ、浮腫に伴う症状を軽減させるものである。

2. 研究の目的

血管内皮細胞増殖因子の一つである VEGF-C はリンパ管内皮を刺激したり、リンパ管内皮細胞の遊走を促進することで、リンパ浮腫組織におけるリンパ管再生を誘導することが報告されている。本研究では、リンパ浮腫の効率的な治療の開発を目指すため、リンパ浮腫組織における VEGF-C が果たす役割と、浮腫組織における VEGF-C の発現調節に関わる因子を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス後肢リンパ浮腫モデルの確立

本研究では、放射線照射によるマウスの全身免疫能の低下や骨髄壊死を予防するため、放射線照射を術前に施行していない。放射線照射により、リンパ浮腫の病態が複雑となり、分子生物学的実験の結果の解析が困難となることも予想されたためである。生後 8 週から 10 週の C57BL/6N マウスを使用した。顕微鏡を使用してイソフルレンによる全身麻酔下で手術を行った。我々が報告した手術方法に従って、リンパ浮腫モデルを作製した (Iwasaki D, et al. *Plast Reconstr Surg.* 2017;139:67e-78e)。

左後肢全体にわたって染色されたリンパ管を中枢側と末梢側で 10-0 ナイロンで結紮処理した。その後、膝窩領域と腸骨下領域のリンパ節と周囲脂肪組織を切除して同時郭清した。最後に皮膚にある浅リンパ管からのリンパ流の流出を抑えるため、左鼠径領域にシリコンプリントを留置して癒痕を誘導させるリンパ浮腫モデルを作製した。以上で作成したリンパ浮腫モデルと、左鼠径を切開する手術侵襲を加えたのみの sham ope グループをコントロールとして比較する実験をおこなった。

(2) 蛍光リンパ管造影によるリンパ流評価

全身麻酔下でインドシアニングリーン (ICG) を左足に皮下投与して近赤外線カメラ

である PDE でリンパ流の評価を行った。

(3) リンパ浮腫組織の組織学的検討

HE 染色により、浮腫組織の組織学的変化を解析した。リンパ管を特異的に染色する LYVE-1 と炎症細胞であるマクロファージに特異的なマーカーである F4/80 で免疫染色を行った。浮腫組織におけるリンパ管の同定と炎症細胞浸潤の程度を評価した。

(4) リンパ浮腫組織における遺伝子発現解析

後肢の浮腫部位の皮膚組織を採取して液体系素で瞬間凍結した後、ホモジナイズして Total RNA を抽出した。その後 cDNA に逆転写した後、リアルタイム PCR を行った。使用したプライマーは VEGF-C、VEGFR-3、Prox1、VEGF-A、HPRT (内部標準) である。

(5) リンパ浮腫組織におけるタンパク発現解析

後肢の浮腫部位の皮膚組織を採取して液体系素で瞬間凍結した後、ホモジナイズして、RIPA バッファーでタンパク質を抽出した。BCA 法で定量した後、サンプルバッファーと混合して 95 °C で 5 分間ボイルした。SDS-PAGE で電気泳動して分離後、PVDF 膜に転写した。希釈した 1 次抗体 (F4/80、VEGF-C、低酸素応答因子である HIF-1 α 、 α アクチン) を使用し 4 °C で一晩、抗原抗体反応を行った。その後、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体と室温で 1 時間抗体反応を行い、ケミルミネッセンスでバンドを検出した。

(6) 統計学的検定

2 群間の比較は student t 検定を行った。p 値は 0.05 未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) マウス後肢リンパ浮腫モデルの確立

手術翌日から左後肢の浮腫が発生し、最低 1 ヶ月間持続することが確認された。蛍光リンパ管造影では、左後肢全体にリンパ管から、皮膚へリンパ流が逆流する現象を反映する Dermal back flow を認めた (図 1)。

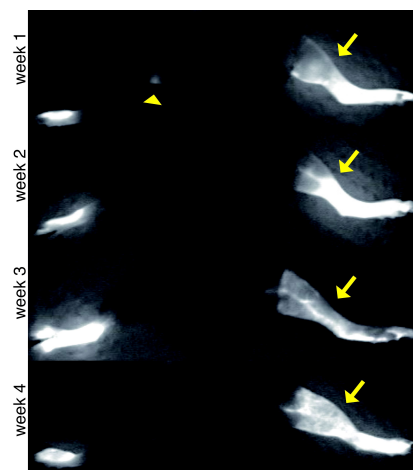


図 1 蛍光リンパ管造影
(黄矢印: Dermal back flow
黄矢頭: 膝窩リンパ節)

鼠径部にシリコンプリントを留置することで、収縮が抑えられ、肉芽増生と表皮化が進行し、鼠径部に線維化を伴う癒痕が形成されやすいことが確認された。結果として鼠径部に生じた癒痕は浮腫の持続に寄与した。

(2) 組織学的検討

HE染色では過角化、表皮・真皮の肥厚、炎症性細胞と考えられる細胞の浸潤などリンパ浮腫に特徴的な所見を認めた(図2)。LYVE1による免疫組織学染色では、浮腫組織において拡張蛇行したリンパ管を多数認めた(図2)。マクロファージ(F4/80)は、術後リンパ浮腫の真皮下層において浸潤していた(図2)。

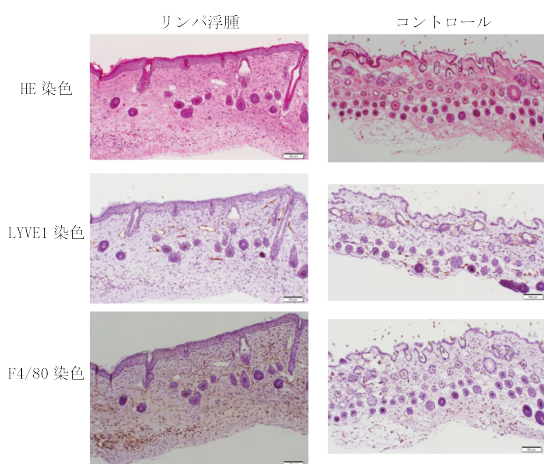


図2 HE染色と免疫染色(手術後2週目)

(3) リンパ管新生因子、マクロファージ、低酸素応答因子の発現検討

リンパ管新生因子において重要な因子である VEGF-C、VEGFR-3、Prox1 は浮腫発生後3日目より発現が上昇してくることをリアルタイムPCRで確認した。VEGF-C、VEGFR-3のmRNAの発現は1週間目で最大となり、しだいに減少した(図3)。血管新生に関わる VEGF-A は浮腫組織において有意な発現上昇を認めず、血管新生はリンパ浮腫の病態に関与しないことが示唆された。ウエスタンブロットによるタンパク発現解析ではリンパ浮腫組織において、マクロファージ(F4/80)と低酸素応答因子である HIF-1 α が有意に発現増加していることが確認された(図4)(術後1~2週目の初期において)。浮腫の寛解とともに、上記の因子の発現が低下することから、術後のリンパ浮腫組織において、炎症細胞と低酸素応答因子が関与していることが示唆された。

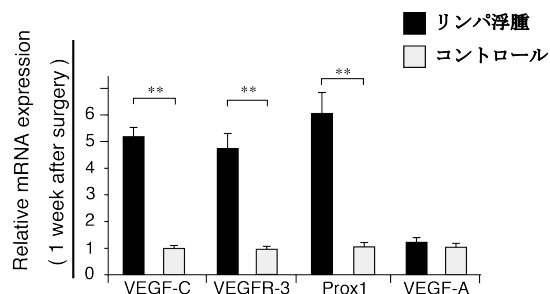


図3 リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

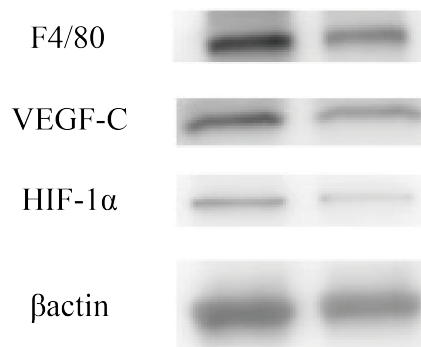


図4 ウエスタンブロットによるタンパク発現解析(手術後1週目)

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

村尾尚規、岩寄大輔、前田拓、大芦孝平、塩谷隆太、小山明彦、古川洋志、山本有平：リンパ管治療の基礎から臨床応用に向けて～リンパ浮腫の予防及び悪性腫瘍の転移制御。第25回日本形成外科学会基礎学術集会、大阪府大阪市、2016.9.16、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平：マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける炎症細胞と低酸素応答因子の発現に関する検討。第91回、北海道札幌市、2016.2.6、北海道大学医学部

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平：マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける炎症細胞の発現に関する検討。第24回日本形成外科学会基礎学術集会、岩手県盛岡市、2015.10.9、岩手県民会館

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平：マウスリンパ浮腫モデル

ルにおけるリンパ管新生因子発現についての検討. 第7回日本創傷外科学会総会・学術集会, 東京都文京区, 2015.7.25, 東京ドームホテル

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平：マウスリンパ浮腫モデルにおける HIF-1 α の発現の検討. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会, 長野県松本市, 2014.10.9, キッセイ文化ホール

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：70374486

(2)研究分担者

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00399924
(平成26年度まで研究分担)

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)
北海道大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：00432146

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10533630

七戸 龍司 (SHICHINOHE RYUJI)
北海道大学・大学病院・医員
研究者番号：30640346

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674

村尾 尚規 (MURAO NAOKI)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：90706558