

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20330

研究課題名(和文)人工リンパ節移植によるリンパ管再生機序の探求

研究課題名(英文)Exploration of lymphatic vessel regeneration mechanism by artificial lymph node transfer

研究代表者

秋田 新介(Shinsuke, Akita)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00436403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：人工リンパ節にリンパ管の新生は確認できなかった。この原因として人工リンパ節内に血流が再開する間に癒痕を形成するためであると考えられた。そこで、腹部リンパ浮腫モデルマウスに有茎皮弁を用いて血流を持ったリンパ節移植を行い、リンパ管新生と動的なリンパの流入を観察した。移植リンパ節に十分な血流を認めるにもかかわらず、新生リンパ流の流入を認める例と認めない例とが存在することが示された。移植リンパ節へのリンパ流の流入には、癒痕が形成の回避が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：No lymphangiogenesis and newly developed lymphatic flow into the artificial lymph node were observed. The cause of this result was thought to be a scar formation before newly developed blood circulation was established. A pedicled vascularized lymph node transfer model was developed using abdominal lymphedema model mice. Lymphangiogenesis and afferent lymphatic flow into the transferred lymph node was investigated using this model mice. Newly developed lymphatic flow was observed in some cases and was not observed in others, despite adequate blood flow was confirmed. For establishing afferent lymphatic flow into the transferring lymph node, it seemed to be very important to avoid forming a scar around the transferring lymph node.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ浮腫 リンパ節移植 リンパ管新生

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は慢性進行性の疾患で、浮腫のコントロールのためには圧迫装具を用いた保存治療を生涯続ける必要があり、患者の Quality of life を著しく損なう。保存治療は根治的な治療ではなく、治療の中断により病状は進行する。血管柄付きリンパ節移植はリンパ浮腫の外科治療方法として欧州や台湾などから多数報告されている方法であり、リンパ管機能を改善しうる治療法だが、結果が十分に安定しておらずドナーの犠牲も大きい。

人工リンパ節は免疫機能を高める効果を期待し、本邦で開発された技術である。人工リンパ節における新生リンパ管の流入は大きな課題であり、リンパ管の新生を促すことで、人工リンパ節をリンパ浮腫診療に応用できる可能性があると考えた。また、自家リンパ節の移植においてもリンパ管の新生のメカニズムは十分に解明されておらず、リンパ管新生機構の解明と賦活化を通して、リンパ浮腫外科治療の成績の向上を目指すことが可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

リンパ浮腫部に移植されたリンパ節がリンパ網を再生するメカニズムを明らかにし、リンパ浮腫治療に最適化されたリンパ節移植法を確立することである。さらに、静脈うっ滞によらない、リンパのうっ滞に伴う変化を客観的に観察、評価可能なモデルと評価方法を確立し、今後の実験動物を用いたリンパ浮腫治療方法の開発研究の発展に寄与することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 人工リンパ節の作成

まず、人工リンパ節のリンパ管新生の促進にあたって、各種ケモカイン、サイトカインによる誘導と、脂肪細胞由来幹細胞を用いた誘導を試みた。マウス腎被膜下、正常皮下、腹部リンパ浮腫モデル皮下にてそれぞれ人工リンパ節を用いて新生リンパ管についてポドプラニン染色で確認するとともに、Indocyanine green lymphatngiography (ICG) 蛍光リンパ管造影を用いてリンパ流路の変化を観察した。

#### (2) Modified Rabbit ear Lymphedema Model と人工集合リンパ管の作成

さらに、集合リンパ管程度の太さを有する、顕微鏡下に吻合可能な人工リンパ管の作成を試みた。リンパ管細静脈吻合(LVA)可能なモデルとして、Rabbit ear のリンパ管吻合モデルを開発した。ラビット臀部皮下で作成した内径 0.5 mm のコラーゲンファイバーが、8 週の経過において血管の流入した管腔構造を形成することを確認し、Rabbit ear lymphedema model のリンパ流途絶部に対して移植を行い、リンパ管欠損部のブリッジング

による治療を試みた。

#### (3) 腹部リンパ浮腫モデルマウスにおける有茎リンパ節移植モデルの作成

腹部リンパ浮腫モデルマウスにおいて、自家リンパ節移植における流入、流出リンパ流の発現について検討するモデルを作成した。腹部リンパ浮腫作成の対側の鼠経リンパ節を有茎で移植するモデルを作成し、新生リンパ管の流入及び流出路の観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 人工リンパ節の作成

腎被膜下、皮下組織いずれに移植した場合においてもリンパ節内への新生リンパ管の流入は確認されなかった。リンパ浮腫モデルにおいてはリンパ流の再生は移植人工リンパ節を迂回して生じ、移植人工リンパ節周囲には癒痕の形成が見られた。

この所見は、人工リンパ節に、リンパ管形成を促すべく、さまざまなケモカイン、サイトカインの使用と、脂肪由来幹細胞を用いて移植を行った場合でも同様であった。人工リンパ節においては血管の申請、血液循環が生じるまでの感に移植組織と母床の周囲に癒痕形成が認められ、リンパ管の流入を阻害するのではないかと考えられた。

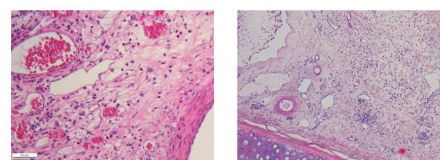
#### (2) Modified Rabbit ear Lymphedema Model と人工集合リンパ管の作成

人工集合リンパ管においては内腔のリンパ管内皮の増生が吻合の長期開存のキーとなると考えた。まず、安定して開存が認められ、体表からリンパの流入の確認が可能なモデルが必要と考え、Rabbit ear リンパ浮腫モデルにおけるリンパ浮腫外科治療の確立を試みた。

既存の Rabbit ear lymphedema model においては、静脈うっ血が高度であることを病理組織標本において示し、リンパ浮腫の病態を適切に反映していないことが示唆されたため、辺縁静脈を温存し、静脈うっ血を示さないリンパ浮腫モデルを確立した。

本モデルにおいては従来のモデルよりも浮腫の程度は軽く、Ear Thickness は従来モデルよりも小さいが、ICG 蛍光リンパ管造影、

Pathological Changes following Resection of Lymphatics and Soft Tissue



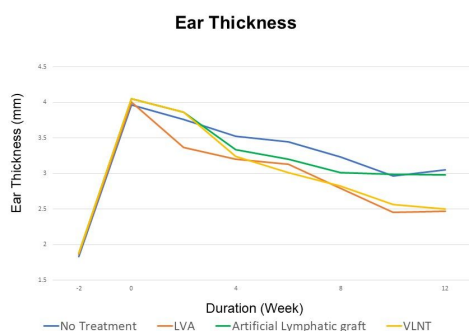
Venous Congestion in Conventional Lymphedema Model

Modified Lymphedema Model

病理組織上はヒト四肢リンパ浮腫と同様の

変化を認めた。

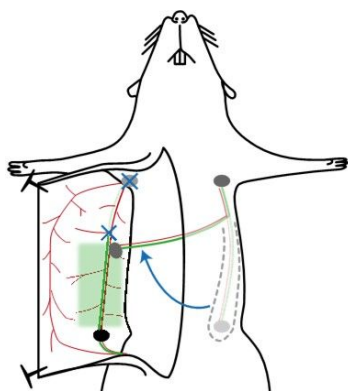
Rabbit ear lymphedema model における LVA, Vascularized lymph node transfer (VLNT) を行い、それぞれ、無治療例と比較して ear thickness の改善を確認した。両治療方法の間に術後 12 週までの経過で有意差は認めなかった。



本モデルにおいて、人工リンパ節への明確なリンパ管の新生は認めなかった。また、人工リンパ管を用いたリンパ管 リンパ管ブリッジングは、LVA, VLNT と比較して、Ear thickness の改善効果に乏しく、人工リンパ管内腔へのリンパ管内皮の増生は、リンパ管辺縁から 3 mm 以内にとどまり、移植人工リンパ管の十分なリンパ管内皮化は達成されなかった。さらに、人工リンパ管には平滑筋組織が存在せず、ポンプ機能を有していないため、人工リンパ管の臨床応用を目指すにあたっては、さらなる創意工夫が必要であると考えられた。

### (3) 腹部リンパ浮腫モデルマウスにおける有茎リンパ節移植モデルの作成

腹部リンパ浮腫モデルマウスにおいて、腹部リンパ浮腫作成の対側の鼠経リンパ節を有茎で移植するモデルを作成し、新生リンパ管の流入及び流出路の観察を行った。



(Yamaji Y, Akita S, Akita H, Miura N, Gomi M, Manabe I, Kubota Y, Mitsukawa N. Development of a mouse model for the visual and quantitative assessment of lymphatic trafficking and function by in vivo imaging. Sci Rep. 2018; 12;8:5921. より一部改変し引

用)

リンパ流が再生する過程において、移植リンパ節に新生リンパ管が流入、さらに流出し、移植床のリンパ流欠損をブリッジングする個体、新生リンパ管が流入し、移植血管茎沿いにリンパ流が形成され、対側リンパ節へのリンパ流が確立する個体、移植リンパ節への新生リンパ管の流入は認めず、移植リンパ節周囲を迂回して新規のルートが確立される個体が見られたが、いずれにおいても連続したリンパの新規ルートが形成された。リンパ節への新生リンパ流が観察されない個体においては、移植リンパ節周囲に強い癒痕形成、線維化の傾向が見られた。癒痕形成の要因としては出血、手術操作による損傷、感染や毛の埋入などに伴う強い炎症などの関連性が考えられた。

癒痕形成の原因は本研究の範囲内では確認できなかったが、リンパ節移植手術において、新生リンパ管の形成、並びに新たなリンパ流の確立に、移植組織周囲の癒痕形成、線維化の程度が影響することが示唆された。

本研究での成果においては、人工リンパ節、あるいは人工リンパ管によるリンパ流の改善効果については、今後の臨床応用を目指すにあたって解決すべき課題が残った。

一方で、本研究の遂行にあたり考案した種々のリンパ浮腫外科治療モデルについては、それぞれの特性があり、今後のさらなる研究において有用なモデルが得られた。

すなわち、本研究で用いた Modified rabbit ear lymphatic microsurgery model は、静脈うっ血の要素を取り除いた、リンパのうっ滞を再現するモデルであり、リンパ管細静脈吻合手術、血管柄付きリンパ節移植手術を施行し、術後観察するのに十分なリンパ管、血管の径を有していた。さらに、本モデルは ICG 蛍光リンパ管造影、超音波検査などでの観察が容易であり、病理像での変化の観察も可能であるなど、リンパ浮腫治療の評価が可能である。Rabbit ear lymphedema model を用い、今後さらなる研究に取り組むことで、リンパ浮腫外科治療の様々な比較検討が可能であると考えられ、有用なモデルである。

腹部リンパ浮腫モデルマウスについては、IVIS を用いてリンパ流の定量評価が可能であり、リンパ浮腫部に有茎でリンパ節を移植することにより、リンパ節移植の類似の状態を再現可能となった。本研究での成果としては、癒痕形成によりリンパ流の再生が減弱することが示唆された点に特に着目したい。今後の研究の展開としては、癒痕形成、線維化には様々な要因の関与が考えられるが、毛の埋入をはじめとする排除可能な Bias を除去のうえで、その要因について十分な検討を行いたい。これら本モデルを使用した新たな実験の成果により、今後、リンパ浮腫外科治療の成績を向上するための取り組みを行うこ

とが可能である。

本研究において得られたこれらモデル動物の確立は、今後のリンパ浮腫外科治療研究領域の礎となりうるものであり、大きな成果と言える。Rabbit ear Lymphedema model はリンパ浮腫外科治療技術の発展に有用である一方で、使用可能な抗体や定量評価法の困難な点など、マウスのほうが優位な点も多い。我々の確立したリンパ流改変マウスではリンパ流の定量評価が可能であり、リンパ浮腫治療の成果を客観的数値で評価することが可能である。その意味では本研究の成果はリンパ浮腫外科治療にとどまらず、薬剤治療を含めたリンパ流改善治療全般に大きな進歩をもたらすことのできる可能性がある。

今後の研究の焦点は癒痕形成の予防あるいは改善が特に重要であると考えられる。本研究で確立したモデルが、リンパ浮腫外科治療のさらなる進歩に貢献すると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Yamaji Y, Akita S, Akita H, Miura N, Gomi M, Manabe I, Kubota Y, Mitsukawa N. Development of a mouse model for the visual and quantitative assessment of lymphatic trafficking and function by in vivo imaging. *Sci Rep.* 2018; 12;8:5921.
2. Akita S, Yamaji Y, Tokumoto H, Sasahara Y, Kubota Y, Kuriyama M, Mitsukawa N. Improvement of the efficacy of vascularized lymph node transfer for lower-extremity lymphedema via a prefabricated lympho-venous shunt through lymphaticovenular anastomosis between the efferent lymphatic vessel and small vein in the elevated vascularized lymph node. *Microsurgery.* 2018; 38: 270-277.

〔学会発表〕(計8件)

1. 秋田新介 山路佳久 手塚崇文 笹原資太郎 窪田吉孝 三川信之. リンパ浮腫非侵襲的評価方法の確立と侵襲的定量評価方法の開発. 第44回日本マイクロサージャリー学会. (2017 12月 宮崎)
2. 山路佳久 秋田新介 緒方英之 手塚崇文 笹原資太郎 窪田吉孝 三川信之. リンパ輸送能の定量評価を目的とした腹部リンパシステム可視化マウスモデルの作成. 第26回日本形成外科学会基礎学術集会 (2017年10月 大阪)
3. 秋田新介 山路佳久 徳元秀樹 久保麻衣子 緒方英之 笹原資太郎 窪田吉孝 三川信之. Rabbit ear lymphedema model を用いたリンパ管細静脈吻合と血管柄付

きリンパ節移植の比較. 第26回日本形成外科学会基礎学術集会 (2017年10月 大阪)

4. Akita S Yamaji Y Mitsukawa N. Prefabricated Lympho-Venous Shunt Increases the Efficacy of Lymph Node Transfer for Lower Extremity Lymphedema. ASPS Plastic Surgery The Meeting 2017 Oct, Orlando
5. Yamaji Y, Akita S, Mitsukawa N. A novel mouse model for visualized and quantitative assessment of lymphatic function using an in vivo imaging system. 26th world congress of lymphology, 2017, Sep; Barcelona.
6. 山路佳久 秋田新介 三川信之. 腹部リンパ節切除による腹部皮膚リンパ系視覚化モデルの作成. 日本リンパ学会 (2017年6月 鹿児島)
7. 秋田新介 山路佳久 三川信之. Rabbit 耳介を用いたリンパ浮腫モデルを用いた Lymphatic Microsurgery. 日本リンパ学会 (2017年6月 鹿児島)
8. Akita S Yamaji Y Mitsukawa N. Prefabricated Lympho-Venous Shunt Increases the Efficacy of Lymph Node Transfer for Lower Extremity Lymphedema. 6th World symposium for lymphedema surgery. 2017. Mar; Barcelona

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

秋田 新介 (Shinsuke Akita)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00436403