

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21052

研究課題名(和文) 二次性リンパ浮腫の病態解明及び治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the pathophysiology and development of treatment for secondary lymphedema.

研究代表者

佐野 真規 (Sano, Masaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：40733514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、二次性リンパ浮腫モデルの作成、病態の解明、新しい治療方法の開発を目的として行われた。まず、ラットを用いてリンパ浮腫モデルを作成した。さらに術後6か月まで、下肢体積の増加、皮下リンパ液貯留、皮膚組織中コラーゲン増加、皮膚硬化を示し、本モデルはヒトと同様に経過することを示した。また細胞実験により、ラットモデルとヒトリンパ浮腫症例の皮膚には筋線維芽細胞が存在することを示した。さらに、筋線維芽細胞にエイコサペンタエン酸エチルを添加すると、コラーゲンの発現量が低下することを示した。エイコサペンタエン酸エチルはリンパ浮腫の皮膚硬化を改善し、新しい治療法として有用な可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a rat model of secondary lymphedema. Our model showed increase of limb volume, accumulation of lymphatic fluid, increase of collagen and skin hardness. Our lymphedema model mimic to human lymphedema patients. Using our model, we showed myofibroblasts exist in skin tissues of lymphedema model and accelerate collagen synthesis to result in fibrosis. Moreover, eicosapentaenoic acid (EPA) prevent skin fibrosis in vitro study. Similar findings were observed in skin samples from lymphedema patients. EPA may be useful in inhibiting fibrosis in patients with secondary lymphedema.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：二次性リンパ浮腫 エイコサペンタエン酸 皮膚線維化 筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

血液は心臓から動脈を通り身体の末梢へ運搬され、静脈とリンパ管を通り再び心臓へ還流する。しかし、子宮癌や乳がんなどの悪性腫瘍手術時のリンパ節廓清や、放射線治療等によりリンパ還流は障害されると、四肢にリンパ液が貯留し、リンパ浮腫を発症する。

リンパ浮腫患者では四肢の腫脹・倦怠感・疼痛を認め、皮膚は硬化し quality of life は著しく障害される。本邦では約 20 万人、世界では約 5000 万人の患者がリンパ浮腫に罹患している。しかし、リンパ浮腫に対する検査法や治療法の開発は遅れている。これまでにリンパ浮腫を簡便に診断する方法はなかったが、我々は新しいリンパ浮腫診断方法としてインドシアニングリーン (ICG) 蛍光リンパ管造影法を開発し報告した。健常者では線状のリンパ管が観察されるが、リンパ浮腫症例では ICG が皮下に貯留し、皮膚全体に高輝度の蛍光が認められる。

近年、蛍光リンパ管造影法の開発から、リンパ浮腫研究が盛んに報告されているが、リンパ浮腫・皮膚硬化の病態は解明されておらず、薬物治療は行われていない。またリンパ浮腫の病態解明のため、動物モデルの作成が試みられてきたが、ヒトのリンパ浮腫のように線維化を呈するモデルは未だ存在せず、この領域の研究遅延の原因となっている。

また近年、肺線維症の組織において筋線維芽細胞・脂肪細胞・TGF- β 1 が重要な役割を持つことが報告された。これまで組織の線維化に対する治療は困難とされてきたが、エイコサペント酸エチル (EPA) には TGF- β 1 抑制効果があり、肝硬変の線維化に対する有効性が報告された。本研究では、動物モデルを用いてリンパ浮腫の病態を解明し、さらに EPA によるリンパ浮腫に対する新たな薬物治療の確立を目的とする。

2. 研究の目的

本研究ではラットリンパ浮腫モデルを完成し、リンパ浮腫の病態を解明し、さらに EPA を用いた新たな薬物治療の開発を行う。

ラット下肢を用いてリンパ浮腫モデルを作成し、その手技を確立する。

ラットモデルの下肢体積、病理学的所見 (マクロファージ浸潤、膠原線維の増生、脂肪細胞沈着) の経時的変化を明らかにし、ヒトの病態と比較する。

免疫学的手法と、リアルタイム PCR 解析を行い、リンパ浮腫の皮下組織中の線維芽細胞及び、TGF- β 1 等の線維化に関与するサイトカインの mRNA 発現量の変化を明らかにする。

超音波顕微鏡を用いて皮膚硬度を評価し、リンパ浮腫における皮膚硬化の経時的変化を明らかにする。

ラットリンパ浮腫モデルの皮膚から、線維芽細胞の初代培養を行い、アクチン・コラーゲン・TGF- β 1 等の発現を評価し、

リンパ浮腫における線維芽細胞の性質を明らかにする。

3. 研究の方法

1. ラットリンパ浮腫モデルの確立と、リンパ浮腫の病態解明についての in vivo 研究
12 週齢オス SD ラット下肢において、ヒト悪性腫瘍手術と同様のリンパ節廓清とリンパ管結紮術を行い、モデルを作成する。リンパ浮腫群、コントロール群において、術後 6 か月まで大腿部の皮膚を生検し、以下の方法を用いて経時的変化を評価する。

水置換法による体積測定：下肢浮腫の程度を評価

蛍光リンパ管造影と蛍光顕微鏡：皮膚組織中のリンパ液貯留の評価

皮膚組織の顕微鏡観察 (Azan 染色、Oil red O 染色、免疫染色)：線維化、脂肪細胞、マクロファージ、リンパ管の形態評価

ラットモデルをヒトリンパ浮腫の病態と比較し、動物モデルを確立する。

次に、リンパ浮腫の皮膚線維化における筋線維芽細胞、TGF- β 1 の関与について以下の方法を用いて評価し、リンパ浮腫の病態を解明する。

real time PCR 解析：皮膚組織中のコラーゲン、TGF- β 1 発現量

免疫染色：線維芽細胞の形態評価、 α - SMA 発現

2. EPA の皮膚硬化の抑制効果についての in vitro 研究 (ラットモデル)

ラットリンパ浮腫モデルから生検した皮膚組織を用いて、線維芽細胞を初代培養し、TGF- β 1 やコラーゲンの発現量や細胞の形態について評価した。さらに EPA 添加による TGF- β 1 やコラーゲンの発現量や細胞形態の変化について評価する。

ラットリンパ浮腫モデルの皮膚から線維芽細胞の初代培養を行う。

real time PCR 解析：TGF- β 1、コラーゲン発現量の評価

EPA を培地内に混和し、TGF- β 1、コラーゲンの発現量を評価

3. ヒトリンパ浮腫線維芽細胞を用いた in vitro 実験

浜松医科大学附属病院血管外科と皮膚科で経過観察中の下肢二次性リンパ浮腫症例において、大腿部の皮膚生検を行い、線維芽細胞の初代培養を行い、ラット線維芽細胞と同様の実験を行う。

4. 研究成果

我々の作成したリンパ浮腫モデルは、術後 6 か月まで下肢体積は増加し、皮膚組織中にリンパ液が貯留した。組織学的には、急性期にはマクロファージ浸潤、リンパ管の増加を認め、慢性期にはコラーゲン増生、脂肪細胞増加、リンパ管の減少を認めた。超音波顕微鏡にて慢性期に皮膚が硬化することを示し

た。以上から、ヒトと同様の経過をたどるラットモデルの作成を確立した。

さらにラットリンパ浮腫モデルの皮膚を生検し、線維芽細胞を初代培養した。リンパ浮腫モデル由来の線維芽細胞は、アクチンを発現し、通常の線維芽細胞と比べ大型化し、筋線維芽細胞に変化したと考えられた。さらに、培地中の TGF- β 1 やコラーゲンの発現量が増加していたことより、ラット筋線維芽細胞が TGF- β 1 やコラーゲンを産生していると考えられた。

さらにラット線維芽細胞の培地中に EPA を添加すると、TGF- β 1 やコラーゲンの発現量は減少した。EPA により、筋線維芽細胞からの TGF- β 1 やコラーゲン産生が抑制されたと考えられた。

浜松医科大学附属病院血管外科と皮膚科で経過観察中の下肢二次性リンパ浮腫症例において、蛍光リンパ管造影とリンパ管シンチグラフィを行い、リンパ浮腫の確定診断を行った。さらに大腿部の皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞の初代培養を行った。リンパ浮腫症例では、ラットモデルと同様に、アクチンを発現し、通常の線維芽細胞と比べ大型化し、筋線維芽細胞に変化したと考えられた。さらに、培地中の TGF- β 1 やコラーゲンの発現量が増加していたことより、筋線維芽細胞が TGF- β 1 やコラーゲンを産生していると考えられた。

さらにヒト線維芽細胞の培地中に EPA を添加すると、TGF- β 1 やコラーゲンの発現量は減少した。EPA により、ヒト筋線維芽細胞からの TGF- β 1 やコラーゲン産生が抑制されたと考えられた。

上記の結果を、後記するように学会にて発表した。また英文原著論文としてまとめ、現在投稿中である。

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 1 件)

Sano M, Unno N, Sasaki T, Baba S, Sugisawa R, Tanaka H, Inuzuka K, Yamamoto N, Sato K, Konno H. Topologic distributions of vasa vasorum and lymphatic vasa vasorum in the aortic adventitia--Implications for the prevalence of aortic diseases. *Atherosclerosis*. 247:127-34, 2016

〔学会発表〕(計 3 件)

佐野真規、海野直樹、片橋一人、山本尚人、犬塚和徳、斉藤貴明、杉澤良太、矢田達朗、嘉山貴文. 二次性リンパ浮腫皮膚硬化の病態における筋線維芽細胞の関与. 第 35 回日本静脈学会総会. 2015 年 7 月 10 日. 奈良

佐野真規、海野直樹、片橋一人、山本尚人、犬塚和徳、斉藤貴明、杉澤良太、

矢田達朗、嘉山貴文. リンパ浮腫皮膚由来線維芽細胞を用いたエイコサペント酸エチルの二次性リンパ浮腫に対する治療効果の検討. 第 36 回日本静脈学会総会. 2016 年 6 月 24 日. 弘前

Masaki Sano, Kazuto Katahashi, Naoki Unno, Naoto Yamamoto, Kazunori Inuzuka, Takaaki Saito, Ryouta Sugisawa, Tatsuro Yata, Takafumi Kayama. Involvement of myofibroblasts in the pathophysiology of secondary lymphedema. 17th European Venous Forum. 2016 年 7 月 8 日. ロンドン

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

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〕

ホームページ等での報告なし。
第 35 回日本静脈学会総会にて発表し、EVF トラベルアワードを受賞した。
17th European Venous Forum. に招待され、受賞者講演を行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 真規 (SANO, Masaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：40733514

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：

(4)研究協力者
(なし)