

令和元年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11368

研究課題名(和文) 病態解明を目指したリンパ浮腫における慢性炎症メカニズムの研究

研究課題名(英文) Investigation of the chronic inflammation mechanism in lymphedema patient.

研究代表者

木股 敬裕 (KIMATA, YOSHIHIRO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50392345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫が進行すると、皮膚・皮下組織の線維化や脂肪沈着が起こるが、その機序は明らかでない。ヒトにおける慢性炎症と線維化、脂肪沈着が起きる原因を解明するべく、今回の研究を行なった。まず、リンパ浮腫患者の皮膚を組織学的に検討し、真皮と脂肪織に著名にリンパ液の鬱滞所見を認めた。次に、患者皮膚からの遺伝子を網羅的に検索したところ、慢性炎症や線維化をリンパ浮腫で上昇している原因遺伝子の上昇を認めた。発現量の定量化がまだ確定できていないが、今後の浮腫の炎症への機序の解明の一助になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫が進行するにつれ、浮腫による炎症が長く続き不可逆的に浮腫がひかなくなること、脂肪沈着による四肢の変形に繋がる。その機序の一つとして原因となりうる遺伝子の上昇を確認した。それにより、早期にその原因遺伝子や産物となるタンパク質の合成を阻害することができれば、線維化や脂肪沈着を予防でき、不可逆的変化となる前の段階で進行を止めうる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：As lymphedema progresses, fibrosis and lipo-deposition occur in the skin and subcutaneous tissue, but this mechanism was not clear. This study was conducted to elucidate the causes of chronic inflammation, fibrosis and lipo-deposition in human. First, the site of lymphatic fluid collection with edema was identified histologically and prominent deposition findings were observed in the dermis and fat tissue. Next, RNA was extracted from the skin and comprehensively searched by mRNA sequence, elevation of the gene that could cause chronic inflammation and fibrosis in lymphedema was observed. Although quantification by realtime PCR has not been determined yet, it is thought to help to elucidate the mechanism of edema in the future.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 慢性炎症 インドシアニンググリーン RNA

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫はリンパ流の鬱滞に起因する組織の浮腫であり、子宮がんや乳がんのリンパ節郭清後に起こることが多い。本邦では10-15万人の罹患患者が存在すると推定されているが、リンパ節郭清後に必ずリンパ浮腫を発症するわけではなく、発症までの期間にも大きな個人差があり、リンパ浮腫の病態は未だに解明されていない。

また決定的な治療法も存在せず圧迫やマッサージなどによる対症療法に甘んじざるを得ないため、患者のQOL低下は著しいものがある。形成外科において、リンパ管静脈吻合術や血管付きリンパ節移植、脂肪吸引などの外科治療も行われているが、その効果は限定的で一定しないのが現状である。リンパ浮腫の病態解明および根治療法の開発は長年待ち望まれている。

リンパ浮腫が進行すると、皮膚・皮下組織の線維化や脂肪沈着が起こる事は以前から知られていた。しかし、これまでそのメカニズムはほとんど解明されていなかった。近年リンパ浮腫の動物実験において、免疫組織化学的解析や遺伝子発現解析が進められ持続する慢性炎症や線維化や脂肪沈着との関連性が解明され始めている。また、臨床においても慢性炎症との関連性を示す報告がされ始めている。

リンパ浮腫モデルのラットにおいて、急性期よりマクロファージの浸潤が慢性期にはリンパ管狭小化と筋線維芽細胞の出現および皮膚硬化を起こすことを解明されている。また、コラーゲンType1, やTGF-1といった組織再構築や炎症性メディエーターのmRNAの上昇も確認している。さらにエイコサペンタエン酸エチル投与により炎症を抑えることでリンパ浮腫モデルにおける線維化や脂肪沈着が抑制されることも示された。現段階では動物実験が先行しているが、同様にヒトでも同じ病態がおこっているのかを実際のリンパ浮腫患者の組織を用いて検証することを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的はリンパ浮腫患者における慢性炎症と線維化、脂肪沈着の変化があるかを組織学的、遺伝子的に捉えることを目的とする。

① リンパ浮腫における慢性炎症・線維化・脂肪沈着を免疫染色等による組織学的解析によって検証する。

②リンパ浮腫における慢性炎症、線維化、脂肪沈着に關与する遺伝子の検索
慢性炎症・線維化・脂肪沈着に關連する遺伝子をリアルタイムPCR で検索し、病態のメカニズムを究明する。

3. 研究の方法

(1)

リンパ浮腫患者の組織を採取し、組織学的特徴を確認した。まず、リンパ浮腫患者は術前に ICG リンパ管造影を行なっている。ICG が組織内の分布を偏光顕微鏡で確認した。

(2) リンパ浮腫患者の組織を手術の切開創から幅 3mm で皮膚皮下組織を切除して採取した。健常者の組織も同様に手術で採取した。すぐに RNA later に浸透させ、-20 度で保存した。ホモジナイザーで組織を十分に破碎し Quiagen 社の mini mRNA 抽出キットで mRNA を抽出後、cDNA 合成した。

また、mRNA サンプルを mRNA-sequence にて網羅的に解析し、リンパ浮腫の慢性炎症や脂肪沈着の原因となりうるマーカーを調べる。

cDNA サンプルは realtime-PCR で発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) リンパ浮腫患者の皮膚の組織学的解析

リンパ浮腫患者の組織を採取し、ICG の鬱滞を蛍光顕微鏡で観察した (図 1)。

ICG リンパ管造影検査では、diffuse pattern というびまん性に浮腫と鬱滞が存在する状態で ISL 分類では stage となる。実際に顕微鏡での所見は皮膚真皮と脂肪織への鬱滞を認めるが、大部分は脂肪織内に認め、図 2 では脂肪組織内への著名なリンパ液の鬱滞を認めることを確認した。つまり、リンパ浮腫により慢性炎症とその影響が真皮と脂肪織への両方に影響が及んでいると推測された。

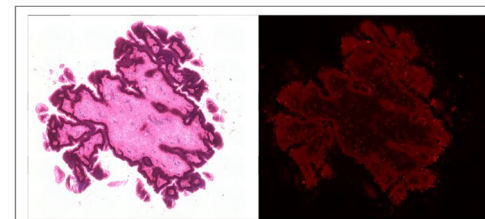


図 1 : 左 HE染色像、右 近赤外領域 偏光顕微鏡像 赤色がICG沈着部を示す

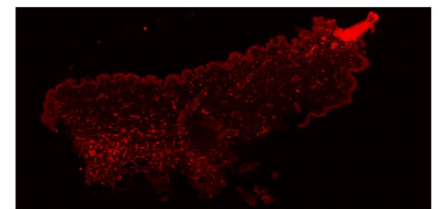


図 2 : ICGの脂肪織への鬱滞

(2) リンパ浮腫患者の遺伝子解析

リンパ浮腫患者の皮膚 mRNA と健常人皮膚 mRNA をそれぞれ抽出し、mRNA-sequence 解析を行なった。Table1 はサンプル情報を示し、Table2 はシーケンス結果のうち、リンパ浮腫における慢性炎症と線維化、脂肪沈着を示すと言われている遺伝子を検索した。

Table 1. Raw data stats						
Index	Sample id	Total read bases*	Total reads	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
1	Lymph-skin-5	4,709,413,658	46,627,858	52.50	98.45	95.30
2	Normal-skin-7	5,920,719,384	58,620,984	54.10	97.77	93.78

Table2. RNA sequence result		
GENE		lymph / control
IL6	interleukin 6	47.191014
TNFRSF19	TNF receptor superfamily member 19	6.780719
COL14A1	collagen type XIV alpha 1 chain	5.514051
ADIPOQ	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	-13.113329

その結果、炎症を惹起するマーカーが上昇し、また線維化も促されている状態と考えられる。脂肪沈着に関しては、アディポネクチンが減少することで、肥満傾向に傾き、沈着を促進するカスケードが働いていると推測された。

次に、real-time PCR を行い、上記遺伝子発現の定量を計画したが、シークエンスのような一定の発現定量は得られなかった（図3）

Real-time PCR では、炎症惹起や線維化の増加傾向に一定の傾向は認めなかった。この原因としては、まだ real-time PCR での再現性が確立していないことや、対象となるリンパ浮腫の病気にもよる可能性が考えられた。今後は、さらに検体数を増やすとともに、mRNAsequence でリンパ浮腫群に有意に上昇する遺伝子を定量し、さらにタンパク質の同定や組織的検討を加えていきたい。

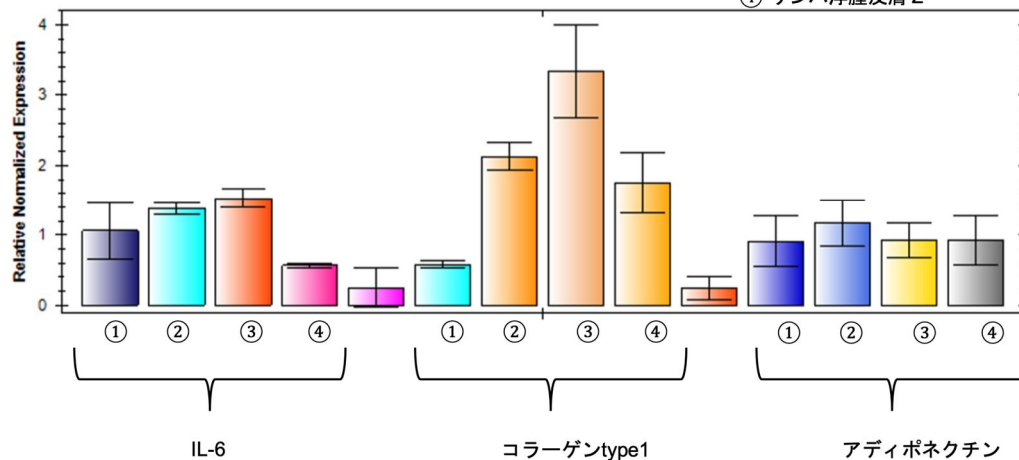
その結果により、慢性炎症のメカニズムの解明に近づくことで、今後の浮腫による影響を軽減する治療が可能になるかもしれない。

図3

real-time PCR

18sRNAにてNormalizedし、relative expressionを算出

- ① 健常皮膚1
- ② 健常皮膚2
- ③ リンパ浮腫皮膚1
- ④ リンパ浮腫皮膚2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 分担者

海野 直樹 (UNNO Naoki)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号 20291958

(2) 研究分担者

越宗 靖二郎 (KOSHIMUNE Seijiro)

岡山大学病院

形成再建外科学 医員

研究者番号：60600559