

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15748

研究課題名(和文)薬剤誘発リンパ管-静脈吻合によるリンパ浮腫に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文)Development of Novel Therapy for Lymphedema with Drug-induced Lymphatic-Venous Anastomosis

研究代表者

中村 優(Nakamura, Yutaka)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00739724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫は手術や外傷により浮腫が起こる疾患で、浮腫以外にも痛みやかゆみを生じ、進行すると不可逆性になるなど様々な問題が生じる。現在のところ臨床的には理学療法および手術療法(リンパ管静脈吻合など)が行われているが、根治は困難である。われわれは、個体発生時の静脈角においてリンパ管と静脈が合流することに着目した。静脈角形成時の静脈角周囲において発現しているVEGF-C及びTGF β 阻害薬を局所投与し、その治療効果について検討したところ、治療群それぞれで浮腫の改善傾向を認めしたが、有意差は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫は現在のところ臨床的には理学療法および手術療法リンパ管静脈吻合などが行われているが、現在のところ根治は困難であり、有効な治療を模索している状態である。われわれは局所に胎生期にリンパ管-静脈吻合がなされる際に発現する因子であるVEGF-C及びTGF β 阻害薬を薬剤を投与することでリンパ浮腫の状態の改善の傾向があることを確認した。これは、局所注射によりリンパ浮腫が治療出来る可能性を示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：Lymphedema is a disease which is caused by surgery or trauma. In addition to edema, it causes pain and itching, and when it progresses, it causes various problems such as irreversibility. Currently, physical and surgical treatments such as lymphatic vein anastomosis are clinically performed, but the cure is still difficult.

We focused on the confluence of lymphatic vessels and veins at the venous angle during ontogeny, and locally administered VEGF-C and TGF β inhibitors expressed around the venous angle during venous horn formation, and their therapeutic effects. We confirmed that there was a tendency for edema to improve in each treatment group, but no significant difference was obtained.

研究分野：再建・形成外科

キーワード：発生学 液性因子 薬剤性リンパ管静脈吻合 薬剤局所注入治療法 リンパ管静脈吻合 リンパ浮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は手術や外傷によるリンパ管の損傷、または先天性なリンパ管の形成不全の結果損傷部位の末梢側のリンパ液還流が阻害され、浮腫が起こる疾患で、浮腫以外にも痛みやかゆみを生じ、進行すると不可逆性になるなど、患者のQOLを著しく障害する。現在のところ臨床的には理学療法および手術療法（リンパ管静脈吻合など）が行われているが、根治は困難である。特に乳がんや子宮がんの手術の際に行うリンパ節郭清の術後に生じやすく、これら癌患者の苦痛の大きな要因の一つとなっており、画期的な治療法が待たれているのが現状である。

現在、リンパ浮腫の治療を目指した様々な基礎研究や臨床の試みが行われている。基礎研究では様々な手法を用いたリンパ管再生が行われており、様々な知見が蓄えられてきているものの、臨床応用に至るものはまだない。また、臨床ではリンパ管静脈吻合、リンパ節移植などの手術方法が開発されてきているが、治療に対する反応が一樣でないことや手術侵襲の問題がある。

そこでわれわれは、リンパ浮腫に対する治療を全く新しい視点から行うため、個体発生時に静脈角（左右リンパ本管が左右腕頭静脈に流入する部位）に発現する成長因子を投与することにより、リンパ管-静脈間での吻合が薬剤を用いて行えるという仮説を立てた。

本研究により薬剤を用いたリンパ浮腫治療が可能となった場合、これまでの手術治療に比べ低侵襲の治療であるため、現在のリンパ浮腫患者約15万人のみならず、これまで軽症であったため治療が行われていなかった患者や、腋窩、鼠径、または骨盤内リンパ節郭清が行われ、リンパ浮腫のリスクが高い患者に対しても予防的治療が可能となり、対象となる患者は約30万人に上ると考えられ、医療への影響は非常に高いと考えられる。

2. 研究の目的

われわれは、個体発生時の静脈角においてリンパ管と静脈が合流することに着目し、静脈角形成時の静脈角周囲において発現している液性因子の検討を行う。それにより、リンパ管-静脈間の吻合を薬剤性に誘導する新しい治療の可能性について検討を行い、これまでにない低侵襲な薬剤局所注入治療法の開発を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 候補因子の探索

マウスの器官形成期の胚から静脈角を取り出し、免疫染色や遺伝子発現解析の手法を用いて、リンパ管と静脈の吻合部である静脈角の形成にかかわる液性因子の探索を行う。また、候補となった因子の大腸菌内での精製を行う。

静脈角形成にかかわる因子の探索

マウスの器官形成期の胚より静脈角や原始リンパ囊の組織を採取する。採取した組織に対して、免疫染色および遺伝子発現(RT-PCR)の評価を行う。

-1: 免疫染色連続切片を用い、抗原の組織内発現を検出する。リンパ管内皮細胞のマーカー、血管内皮細胞のマーカーの染色を行い静脈角の同定を行う。同定した静脈角周囲の組織に対し、マーカーを連続的に染色してその発現の部位、強度を評価する。

-2: 遺伝子発現(RT-PCR)器官形成期の静脈角で発現している遺伝子の検出を、RT-PCR法にて行う。

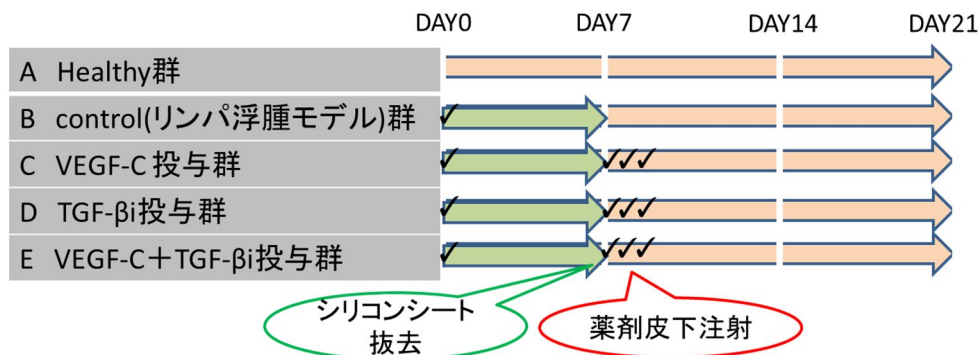
-1、-2で得られた結果より、静脈角形成に関わる候補タンパクを決定する。

大腸菌内での候補タンパクの精製にて静脈角の形成に関与している可能性があると考えられる候補タンパク質を、遺伝子組み換え大腸菌内で精製する。

(2) 慢性リンパ浮腫モデルの作成

治療に用いる候補因子として、文献的に治療効果が期待されるVEGF-C及びTGF-β阻害薬を用いることとした。北海道大学石川らの方法を参考に、リンパ浮腫マウスを作成した。

上記作成プロトコルにて10週齢のBalb/c雄マウス計15匹を対象として、鼠径部、膝窩のリンパ節を郭清した後、シリコンシートを縫い付けた。原法では10~14日後でシリコンシートを抜去するのだが、本検討ではシリコンシートを7日目に抜去して、薬剤投与を行うこととした(図1)。



(図1)慢性リンパ浮腫に対する薬剤投与治療のスケジュール

(3) 慢性リンパ浮腫モデルの治療

シリコン抜去日に薬剤投与群は、VEGF-C 及び TGF 阻害薬の局所投与によるリンパ浮腫の治療を行い、21 日後に効果判定を行った A : Healthy 群、B : control(リンパ浮腫モデル)群、C : VEGF-C 投与群、D : TGF- β 投与群、E : VEGF-C + TGF- β 投与群の 5 群 (それぞれ 3 匹ずつ、合計 15 匹) にて四肢周径および皮膚の厚さ、および組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 候補因子の探索について

マウス胎児の作成および、静脈角部分の切り出しは手技の確立に成功した。一方で、ここまでの確率に 1 年以上かかり、続く原因因子の同定に難航することが予測されたため研究進行を一旦凍結し、文献的に治療効果が期待される VEGF-C 及び TGF 阻害薬を用いることとし、以降の研究を並行して進めることとした。

(2) 慢性リンパ浮腫モデルの作成について

手順 (図 2)

1. 足背に 2% パテントブルー-5 μ L を局注
2. 鼠径部にて皮膚を一周切開剥離
3. 仰臥位で脂肪織と一緒に鼠径リンパ節を切除
4. 腹臥位で上下を 10-0 で結紮した後、膝窩リンパ節を切除
5. 1mm 厚 / 3mm 幅のシリコンシートの縫い付け
6. 7 日目にシリコンシート抜去



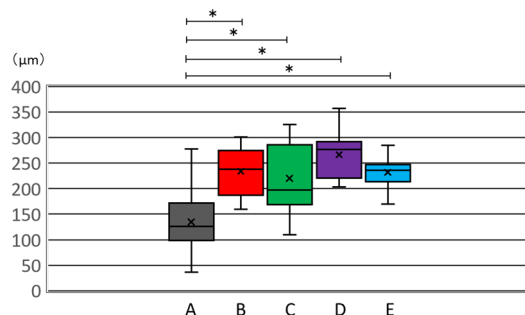
3. 鼠径リンパ節郭清

4. 膝窩リンパ節郭清

5. シリコンシート縫着

(図 2) マウス慢性リンパ浮腫モデルの作成

上記手順の通り、マウス慢性リンパ浮腫モデルを作成した。脚の皮膚~皮下組織の厚さの比較を行い、リンパ浮腫モデル群は healthy 群よりそれぞれ有意な皮膚の厚さ浮腫の残存を認めることを確認し (図 3) マウスの慢性リンパ浮腫モデル及び、薬剤投与と時期・方法のプロトコルの確立に成功した。



平均 A群134 μ m、B群234 μ m、C群220 μ m、D群266 μ m、E群232 μ m

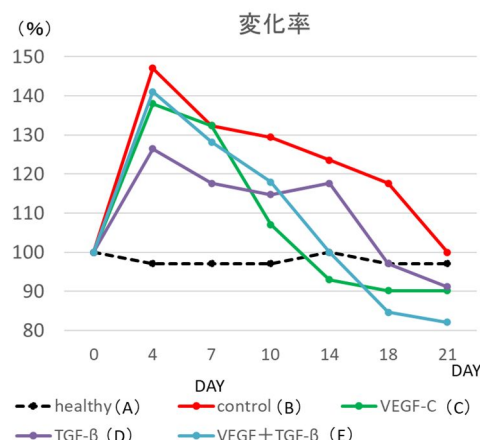
(図 3) 術後 21 日目の皮膚の厚さ

(3) 慢性リンパ浮腫モデルの治療について

治療群それぞれで浮腫の改善傾向を認めたが、有意差は得られなかった。浮腫の程度は control > TGF- β > healthy > VEGF-C > VEGF-C + TGF- β の順であった (図 4)。これは、VEGF-C、TGF- β それぞれに浮腫の改善効果の可能性が示唆される。一方で、施術による体重減少・廃用での四肢周径の減少の関与の可能性についても検討の必要があると考えられた。

ここまでで得られた成果をもって、日本形成外科学会基礎学術集會にて発表を行った。

その後、追加実験を行う過程において同一モデルが上手く作成できず、追加のデータを得ることができなかった。現在その原因を調査中であり、研究期間を超過してしまうが追加データを得られた後、最終的な論文文化を目指す。



(図 4) 術後 21 日目の後肢周径

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内堀貴文、高成啓介、蛭沢克己、菱田雅之、神戸未来、中村優、茂木公佑、亀井譲
2. 発表標題 形成外科におけるリンパ浮腫の手術療法について
3. 学会等名 第11回 がんのリンパ浮腫研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀井 譲 (KAMEI YUZURU) (10257678)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	蛭沢 克己 (EBISAWA KATSUMI) (20397459)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	中村 亮太 (NAKAMURA RYOTA) (40761060)	静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員 (83802)	
研究分担者	高成 啓介 (TAKANARI KEISUKE) (80378190)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神戸 未来 (KANBE MIKI) (50597862)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	菱田 雅之 (HISHIDA MASASHI) (50790143)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	