

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11544

研究課題名（和文）原発性リンパ浮腫患者に対する新たな治療法の開発（サイトカインを標的とした治療）

研究課題名（英文）A histopathological investigation to acquired primary lymphedema

研究代表者

三上 太郎（MIKAMI, Taro）

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：90315804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：原発性リンパ浮腫患者から得られた皮膚皮下組織の検体を、各種染色（通常のヘマトキシリン-エオジン染色のほかに、各種サイトカインや炎症マーカーに対する免疫組織化学的染色を含む）で処理し、続発性患者からの組織検体との組織学的な共通点と差異を検討した。この結果、TNF- α については原発性リンパ浮腫において（続発性リンパ浮腫と比較して）有意に集合リンパ管平滑筋層に沈着を認めた。

以上より、「原発性リンパ浮腫発症に TNF- α を中心としたサイトカインが関与しているという仮説」を2018年度内に論文の形で提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性疾患治療後に発症する続発性リンパ浮腫と異なり、原発性リンパ浮腫は原因が不明で発症する。四肢リンパ浮腫の保存治療の一環である弾性着衣について、現在わが国においては続発性患者に対してのみ経済的補助が下りているが、原発性リンパ浮腫患者にはその恩恵が適用されていない状況がある。

今回の成果は原発性リンパ浮腫の発症機序の解明に寄与したと考えられ、また薬物治療の可能性があることも示唆することができたと考えている。今後、既存の抗 TNF- α 薬を用いた治療方法の開発につながれば、多くの原発性リンパ浮腫患者に福音となると考えている。

研究成果の概要（英文）：We performed hematoxylin-eosin staining and immunostaining for LYVE-1, IL-1 β , IL-6, and TNF- α to collecting lymph ducts obtained from the lymphedema patients. TNF- α was more highly expressed in the smooth muscle layer in primary lymphedema patients than in secondary lymphedema patients. TNF- α -related inflammation in collecting ducts of lymphatic vessels is regarded as an important characteristic of the pathology of primary lymphedema.

We hypothesized that an autoimmune disease or self-inflammatory mechanism occurs in lymphatic vessels, leading to obstruction.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：原発性リンパ浮腫 慢性炎症 サイトカイン TNF- α 薬物治療

1. 研究開始当初の背景

原発性リンパ浮腫は、悪性腫瘍術後や外傷といった特別な既往がなく発症するリンパ浮腫の総称である。このうち、家族性における遺伝子異常 (Milroy 病など) を除くと殆どが原因不明である。診断については除外診断となる場合が多く、治療方法として確立されたものもない。わが国では 3000~4000 人の有病者数と推定されているが、医療機関を受診していない患者も多いと思われ、推測の域を出ていない。更に、保存的治療の主体となる弾性ストッキングについては、続発性リンパ浮腫の患者と異なり (2008 年から適用となった) 医療保険の補助も認められておらず、患者の経済的負担もより大きなものとなっていた。

原発性リンパ浮腫は続発性リンパ浮腫と異なる浮腫発症機構が予想されたが、発症の病態生理はいまだ明らかにされていなかった。これは一つには、動物モデルではなく、原発性リンパ浮腫患者のリンパ管についての病理組織学像が明らかになっていない部分が多いためであった。

われわれの施設で術中偶発的に採取された原発性リンパ浮腫患者の集合リンパ管ならびに周囲組織の組織学的所見から (1) 内皮細胞における podoplanin の消退を示唆する所見 (2) 集合リンパ管の中膜 (リンパ管平滑筋) の肥厚所見 (3) 集合リンパ管周囲への軽度の炎症細胞浸潤所見 が得られた。ここで、podoplanin については近年、ケモカインを介した免疫細胞運動の調節に関与している可能性が示されていた。このことから、われわれは原発性リンパ浮腫発症の機構に podoplanin に関する何らかの免疫学的な機構が関与しているのではないかと考え、これを患者の検体の病理像から検証しようと考えた。

2. 研究の目的

- (1) 原発性リンパ浮腫患者のリンパ管そのものの病理組織学的な検討---特に内皮細胞におけるポドプラニンの発現と平滑筋の肥厚について
- (2) 原発性リンパ浮腫患者のリンパ管周囲組織の病理組織学的検討---特に炎症細胞浸潤の程度と、これの原因となるケミカルメディエーターについて
- (3) 原発性リンパ浮腫発症メカニズムの仮説提唱

3. 研究の方法

(1) 検体の取得

横浜市立大学附属病院では、年間約 10 例の原発性四肢リンパ浮腫患者に対する外科的治療 (リンパ管静脈吻合術: 以下 LVA) を施行していた。

同院では倫理委員会通過後にこれらの患者様達から術中に (集合) リンパ管とその周囲組織を、同意が得られた症例に限り採取する。また、すでに同院倫理委員会を通過したプロトコールに則って (術中に切開する皮膚分の) 皮膚皮下組織も採取するため、これらの検体に対して後述する病理組織学的検証を行った。

組織学的検討には、後天性原発性リンパ浮腫 (AP-LE) 症例 8 検体と、続発性リンパ浮腫 (S-LE) 症例 6 検体を用いた。

(2) 病理組織学的検証

採取した検体はパラフォルムアルデヒド (PFA) で固定。その後、通常のヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) に加えて podoplanin や α -SMA に対する免疫染色を追加した (horse-radish peroxidase を使用)。検体の集合リンパ管についてリンパ管内皮細胞の状況を比較することも行った。

また、リンパ管周囲の炎症細胞浸潤の有無についても検証/確認を行った。すでに、象皮症の段階まで進んだリンパ浮腫 (続発性) においては組織内にびまん性に形質細胞の浸潤が認められることが知られているが、原発性リンパ浮腫においてはリンパ管-静脈吻合術の対象となる程度の段階においてもリンパ管周囲への炎症細胞浸潤が生じている可能性もあった。(この場合、「原発性リンパ浮腫についてはリンパ管への局所的な炎症が原因」という仮説が生じると考えられる)。

炎症細胞浸潤が組織内において健常皮膚と比較して多い傾向が認められたため、IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α や β , 補体 C3/C4 といったケミカルメディエーターや免疫関与タンパクの免

疫組織化学染色を追加し、組織内分布の有無について検証した。

4. 研究成果

(1) 原発性リンパ浮腫患者(AP-LE)と続発性リンパ浮腫患者(S-LE)における集合リンパ管の中膜肥厚

いずれの群においても既報のごとく、拡張タイプ、狭窄タイプ、硬化タイプの3タイプに分類できた。

また α -SMA (α -平滑筋アクチン)染色では狭窄タイプや硬化タイプにおける中膜の肥厚が平滑筋の集積によるものと判明し、この点においてはAP-LEとS-LEの間に差は認められなかった。(FIG. 1, 2)

(2) 原発性リンパ浮腫患者と続発性リンパ浮腫患者における集合リンパ管の内皮の状況

集合リンパ管の内皮(細胞)の状況を、LYVE-1およびPodoplaninの染色で評価した。これについても、AP-LEとS-LEの間に実質的な明らかな差は認められず、いずれも細胞は温存されていることが分かった。(FIG. 3)

(3) 原発性リンパ浮腫患者と続発性リンパ浮腫患者における集合リンパ管中膜へのTNF- α とIL-1 β の集積

リンパ浮腫患者の集合リンパ管における中膜へのさまざまなケミカルメディエーターの集積を見当した結果、集積が認められたもののうちIgGとC1qについてはAP-LEとS-LEとの間に有意な差は認められなかった(FIG. 4)。

一方、TNF- α とIL-1 β については一見したところで有意差が認められ、いずれもAP-LEにおいて密に集積している様相が認められた(FIG. 5)。更に、統計学的検討では単位断面あたり集積においてTNF- α は後天性原発性リンパ浮腫患者において有意に密に集積していた($P=0.0017$; Student-t検定, FIG. 6)。

(4) 以上より、原発性リンパ浮腫の発症あるいは病状進展について、集合リンパ管におけるTNF- α の集積がなんらかの関与をしていることが示唆された。また、IL-1 β とTNF- α の集積が集合リンパ管平滑筋に強く認められた一方で、本研究の検体においてはリンパ管周囲に炎症細胞の強い浸潤は認められなかった。こういったことから、サイトカインが平滑筋自体から産生されていることも推測された。

リンパ浮腫の病状進行に伴い、集合リンパ管の平滑筋層が厚くなることはすでに報告されている(1)。したがって、TNF- α の産生や集積抑制により中膜肥厚を阻止することが、原発性リンパ浮腫の病状悪化を緩和する可能性があると考えられた。

また、リウマチ様関節炎患者や乾癬患者に併発したリンパ浮腫がTNF- α の阻害により改善した報告も認められる(2-4)。

今後、TNF- α の阻害薬が後天性原発性リンパ浮腫の発症や病状進行の抑制に適用出来る可能性が示唆されたと考えている。

<引用文献>

1. Ogata F, Fujiu K, Koshima I, Nagai R, Manabe I. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in lymphoedema. *Br J Dermatol* 2015; 172:1286-1293.
2. Eyigor S, Karapolat H, Kirazli Y. Efficacy of etanercept and complete decongestive physical therapy in bilateral lower-limb lymphoedema associated with rheumatoid arthritis: A case report. *Adv Ther* 2008; 25:23-28.
3. Tong D, Eather S, Manolios N. Psoriatic arthritis and chronic lymphoedema: Treatment efficacy by adalimumab. *CLIN Rheumatol* 2009; 28:1349-1350.
4. Lekpa FK, Economu-Dubosc A, Fevre C, Claudepierre P, Chevalier X. Efficacy of etanercept in lymphedema associated with psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2009; 36:207-208.

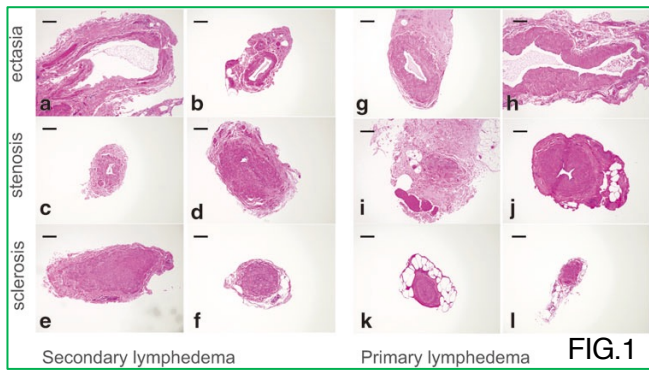


FIG. 1. HE staining of lymph ducts from lymphedema patients. The upper row shows the ectasia type of lymph ducts. The middle row shows the stenotic change of collective lymphatics. The thickness of the muscle layer is over 100 μ m. The lower row indicates the closed lumen of collective lymph ducts. (a) 59 years old: lower leg, (b) 49 years old: thigh, (c) 37 years old: lower leg, (d) 68 years old: thigh, (e) 44 years old: lower leg, (f) 59 years old: thigh, (g) 23 years old: lower leg, (h) 59 years old: thigh, (i) 39 years old: lower leg, (j) 19 years old: thigh, (k) 38 years old: lower leg, (l) 19 years old: thigh, (a–f) S-LE, (g–l) P-LE. Scale bar = 100 μ m. P-LE, primary lymphedema; HE, hematoxylin/eosin; S-LE, secondary lymphedema.

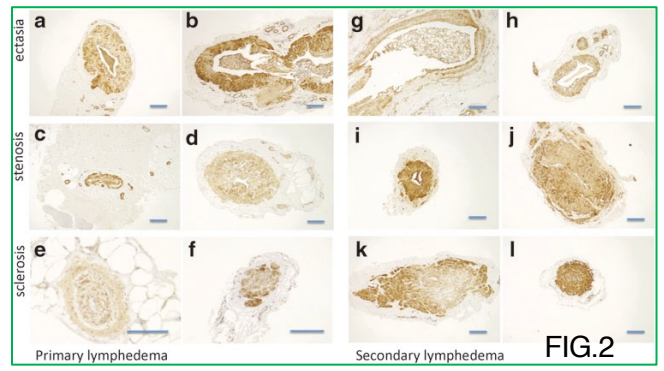


FIG. 2. Immunohistochemical staining of a-SMA. The upper row shows ectasia type lymph ducts. Although the smooth muscle layer has been already thickened, the lumens of the lymph ducts were preserved or dilated. The middle row shows stenotic changes of lymphatics from both P-LE and S-LE patients. The ratio of smooth muscle layer in diameter is much higher than that of the lumen of the lymphatics. The lower row shows the closed lumens of collective lymph ducts. Almost all sections were occupied with smooth muscle. The smooth muscle layers of the lymphatic vessels were stained with horseradish peroxidase as a secondary antibody. From (a) to (f) are specimens of patients with AP-LE, while the other six specimens were taken from S-LE patients. No significant differences were observed between the groups. (a) Primary left lower limb lymphedema in a 23-year-old female. (b) Primary right lower limb lymphedema in a 59-year-old female. (c) Primary left lower limb lymphedema in a 23-year-old female. (d) Primary left lower limb lymphedema in a 39-year-old female. (e) Primary bilateral lower limb lymphedema in a 19-year-old female. (f) Primary left lower limb lymphedema in a 19-year-old female. (g) Secondary left lower limb lymphedema in a 61-year-old female. (h) Secondary left lower limb lymphedema in a 49-year-old female. (i) Secondary right lower limb lymphedema in a 37-year-old female. (j) Secondary left lower limb lymphedema in a 68-year-old female. (k) Secondary left lower limb lymphedema in a 44-year-old female. (l) Secondary right upper limb lymphedema in a 59-year-old female. Scale bar = 100 μ m. a-SMA, alpha-smooth muscle actin; AP-LE, acquired P-LE.

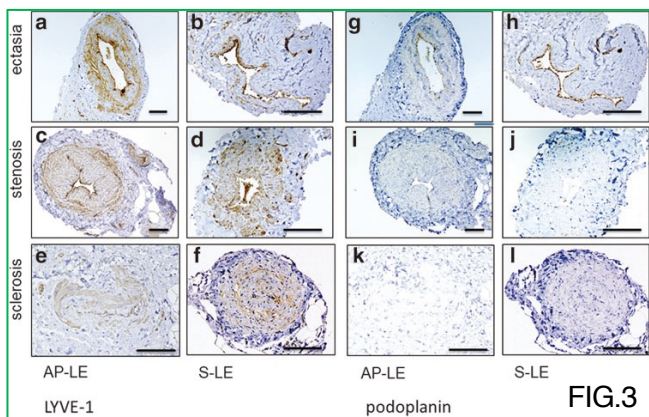


FIG. 3. Immunohistochemical staining of LYVE-1 and podoplanin. The first, second, and third rows show ectasia-, sclerosis-, stenosis-type lymphatic vessels, respectively. There was no substantial difference between the two groups regarding expression of LYVE-1 or podoplanin. (a, g) Primary left lower limb lymphedema in a 23-year-old female. (b, h) Secondary right lower limb lymphedema in a 64-year-old female. (c, i) Primary bilateral lower limb lymphedema in a 19-year-old female. (d, j) Secondary right lower limb lymphedema in a 37-year-old female. (e, k) Primary right lower limb lymphedema in a 39-year-old female. (f, l) Secondary right upper limb lymphedema in a 59-year-old female. Scale bar = 100 μ m.

FIG. 4

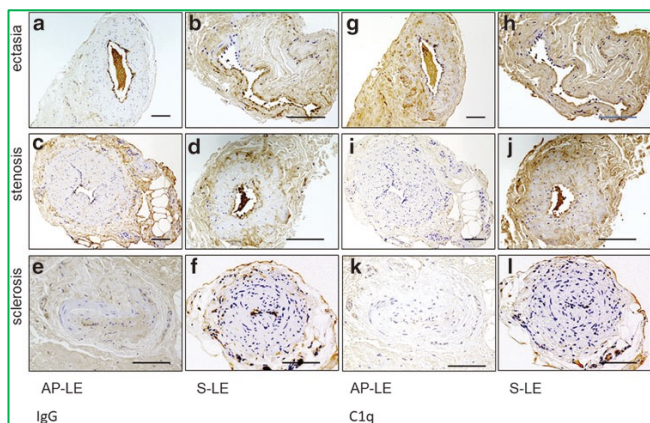


FIG. 4. Immunohistochemical staining of IgG and C1q. The first, second, and third rows show ectasia-, sclerosis-, stenosis-type lymphatic vessels, respectively. There was no substantial difference between the two groups regarding expression of IgG and C1q. (a, g) Primary left lower limb lymphedema in a 23-year-old female. (b, h) Secondary right lower limb lymphedema in a 64-year-old female. (c, i) Primary bilateral lower limb lymphedema in a 19-year-old female. (d, j) Secondary right lower limb lymphedema in a 37-year-old female. (e, k) Primary right lower limb lymphedema in a 39-year-old female. (f, l) Secondary right upper limb lymphedema in a 59-year-old female. Scale bar = 100 μ m.

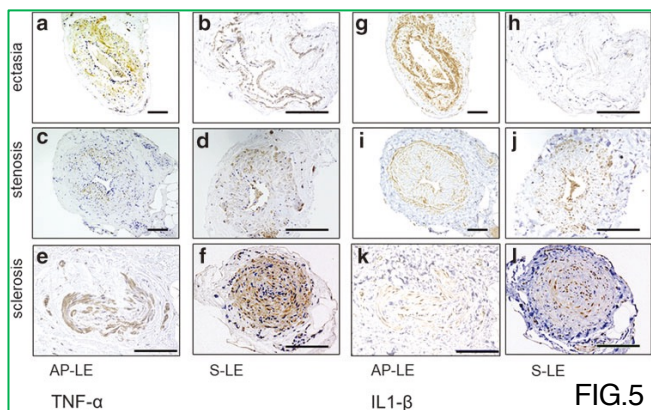


FIG.5

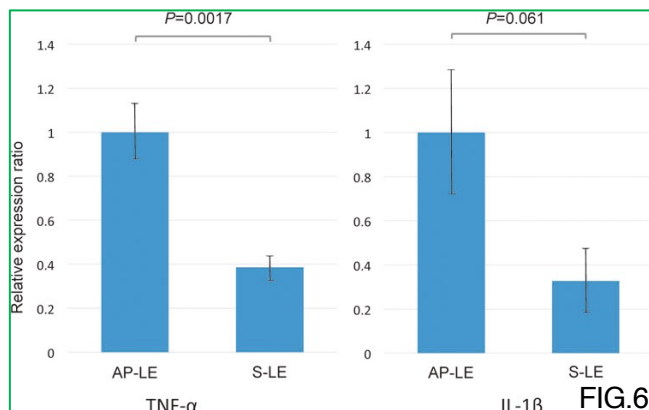


FIG.6

FIG. 5. Immunohistochemical staining of TNF- α and IL-1 β . TNF- α and IL-1 β were highly expressed in the smooth muscle layers in the specimens of both AP-LE and S-LE patients. These cytokines were expressed in all stages of lymphedema. (a, g) Primary left lower limb lymphedema in a 23-year-old female. (b, h) Secondary right lower limb lymphedema in a 64-year-old female. (c, i) Primary bilateral lower limb lymphedema in a 19-year-old female. (d, j) Secondary right lower limb lymphedema in a 37-year-old female. (e, k) Primary right lower limb lymphedema in a 39-year-old female. (f, l) Secondary right upper limb lymphedema in a 59-year-old female. Scale bar = 100 μ m. IL-1 β , interleukin 1- β ; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

FIG. 6. Relative expression ratio of TNF- α and IL-1 β . Expression levels of TNF- α and IL-1 β in specimens from AP-LE patients were higher than those of S-LE patients. The difference between AP-LE and S-LE was statistically significant for TNF- α expression, while the difference for IL-1 β was not. Error bar: standard deviation.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saori Asano , Taro Mikami , Shinobu Matsubara , Jiro Maegawa , Hiromichi Wakui , Kouichi Tamura , Ryusuke Yoshimi	4. 巻 18
2. 論文標題 Preliminary Report: The Relevance of Tumor Necrosis Factor- in Acquired Primary Lymphedema-A Histopathological Investigation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 232-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/lrb.2019.0046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平出さおり 三上太郎 松原忍 前川二郎
2. 発表標題 原発性リンパ浮腫の病理組織学的検討～サイトカインとの関連、診断への応用～
3. 学会等名 第三回 日本リンパ浮腫治療学会 学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro Mikami
2. 発表標題 Application of SPECT-CT Lymphoscintigraphy and the diagnosis and treatment of lymphedema
3. 学会等名 Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology（招待講演）（国際学会）
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	涌井 広道 (WAKUI Hiromichi) (10587330)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	矢吹 雄一郎 (YABUKI Yuichiro) (30610357)	横浜市立大学・附属病院・助教 (22701)	
研究分担者	前川 二郎 (MAEGAWA Jiro) (70244449)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	
研究分担者	吉見 竜介 (YOSHIMI Ryusuke) (70585265)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関