

令和元年6月25日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17040

研究課題名(和文)リンパ浮腫脂肪組織における免疫細胞解析による病態解明と免疫機能再建外科治療の確立

研究課題名(英文) Immunologic assessment in lymphedema adipose tissue and establishment of immuno-reconstruction

研究代表者

田代 絢亮 (Tashiro, Kensuke)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20622070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：二次性リンパ浮腫における脂肪組織の生理的变化を示した。長期に渡るリンパ液の貯留状態は、慢性炎症や進行性の線維化、脂肪組織の恒常性の破綻、再生能の減少、免疫細胞の異常などの変化を引き起こしていた。これらの病理学的変化は進行性で非可逆的であるため、早期の治療介入が重要と考えられる。また、各病期における最適な治療選択を考える上でも、本研究の視点は役立つと考えられる。リンパ浮腫の脂肪組織に関しては、まだ分かっていないことも多く、さらなる研究の促進がよりよい治療戦略へと結びつくだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫の脂肪組織の特徴がある程度明らかになりつつあることで、リンパ浮腫の病態生理の解明に役立つ可能性が考えられる。それにより、新しいリンパ浮腫治療法の開発にもつながりうる。脂肪組織を減少させる治療法や脂肪組織を用いたリンパ浮腫治療法を開発することで、リンパ浮腫の根治に向け、一歩前進できる。また、リンパ浮腫患者の多くは、蜂窩織炎に悩まされている。突然高熱が出て、患肢が赤く腫れ上がり、炎症反応が急激に上昇する。本研究が注目した、リンパ浮腫脂肪組織における免疫細胞の違いの研究をさらに進めることで、蜂窩織炎に対する新たな治療法・予防法の開発が進む可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Determining the best treatment strategy for each patient remains a challenge. The present study characterizes various pathophysiological changes in lymphedema adipose tissue: adipocyte hypertrophy, expanded extracellular spaces filled with lymphatic fluid, progressive fibrous deposits, hypertrophy of the dermal capillary lymphatics and deficiencies of ASCs and M2 macrophages. These findings suggest that long-term lymphatic volume overload induces chronic inflammation, progressive fibrosis, impaired homeostasis and remodelling of adipose tissue, impaired regenerative capacity, and immunological dysfunction. As these pathological changes are progressive and irreversible, treatment in the early stages of lymphedema is necessary to avoid these critical conditions and their associated complications. Further elucidation of the mechanisms underlying lymphedema will lead to more reliable therapeutic strategies.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫 再生医療 MSC 脂肪由来間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は、その初期においては、リンパ液の貯留により、リンパ管内圧の上昇が起きる。この状況が持続すると、リンパ管の平滑筋細胞の非可逆的な変性が起き、リンパ管の正常な収縮能が徐々に障害を受けていく。貯留したリンパ液は皮膚の毛細リンパ管へと逆流し、ICGリンパ管造影検査などで、皮膚逆流所見(dermal backflow pattern: DBF)として認知される。^{1,2}さらに貯留したリンパ液は脂肪組織の増生を引き起こす。増生した脂肪組織はさらにリンパ管にかかる負荷を増加させ、ポンプ作用を阻害する。このようなリンパ液の貯留、リンパ系の負荷と損傷、脂肪組織の増生が繰り返され、浮腫はますます悪化する。そして疾患の進行により、治療の難度も上がる。治療の方法としては、圧迫療法を中心にした保存療法、外科的治療として浮腫組織切除、顕微鏡を用いたリンパ管静脈吻合やリンパ節移植術、脂肪吸引術などが行われている^{3,4}が、リンパ浮腫のどの段階でどの治療が用いられるべきかなど、まだまだ議論の余地が多い。

2. 研究の目的

脂肪組織自体は、主に脂肪細胞の集合からなり、機械的な強度や整容面、免疫機能や代謝における中心的な役割などを担っている。間質には、脂肪幹細胞 (ADSC) や、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞等が含まれる。肥満やメタボリックシンドロームを引き起こす脂肪組織の研究は進んでいるが、リンパ浮腫の脂肪組織の研究はこれまでほとんどされておらず、まだまだ新しい研究分野と言える。また脂肪組織に常在する免疫細胞の機能の異常が、蜂窩織炎やリンパ管肉腫といったリンパ浮腫により引き起こされる合併症とどのような関係があるのかもはっきりしたことは分かっていないため、これらの各種細胞群とのリンパ浮腫の関連性につき、解析を行った。

3. 研究の方法

我々は、リンパ浮腫の脂肪組織の形態学的組織学的解析を行い、病態生理学的変化を調べた。本研究では、リンパ浮腫の重症度を問診、身体所見、ICGリンパ管造影検査により規定し、リンパ浮腫に対する外科治療時に通常なら廃棄される脂肪検体を用いて、同一患者のリンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織を比較した⁵。採取された切除検体に対しては、免疫組織染色やWhole-mount染色を行った。脂肪吸引により得られた検体に対しては、コラゲナーゼ処理を行い得られた間質細胞群に対し、フローサイトメトリー解析を行った。

4. 研究成果

【リンパ浮腫の評価】

第1図のような患者を対象に解析を行った。

【組織学的所見】

脂肪組織を固定化や薄切せずに観察するホールマウント染色においては、脂肪細胞をペリリピン、毛細血管をLectin、核をHoechstに

第1図

Patients and Methods

リンパ浮腫の評価は、病歴・臨床所見・ICGリンパ管造影にて行った。

Lymphedema	Bilateral	12
Limb (26 cases)	Unilateral	14

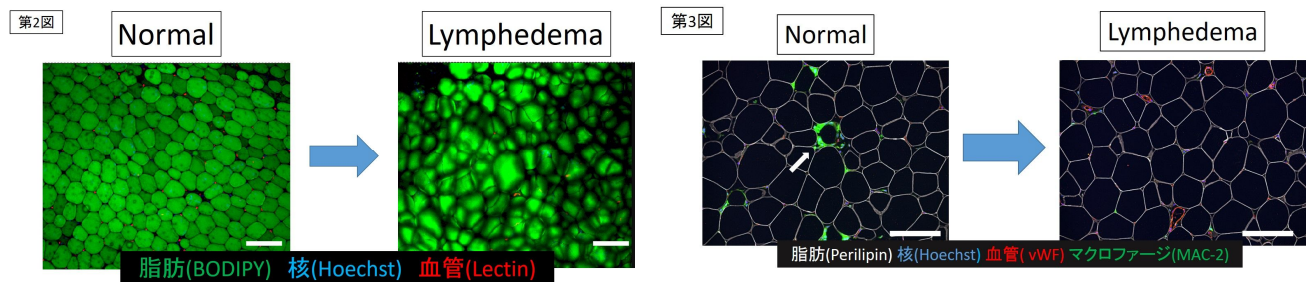
ISL Lymphedema Stage	Stage 0	9
	Stage 1	15
	Stage 2	23
	Stage 3	5

↓
片側性のもので健常側も術野の場合は、健常側からもサンプル採取し、リンパ浮腫側と比較した。

History	Edema(Av)	8.8年
	Compression(Av)	7.3年
	Radiation	9人
	Phlegmone	14人

て染色し、3次元構造を比較した。リンパ浮腫で脂肪細胞の配列の乱れがあり、浮腫が重症化すればするほど、過形成の脂肪細胞が目立つようになった。これらのことから、リンパ液の蓄積が慢性炎症を引き起こし、その結果組織の線維化が進んでいる様子が分かった。(第2図)

また、間質に存在するマクロファージに関しては、壊死した脂肪細胞をM1マクロファージが取り囲む"Crown-like structures"(王冠様構造)が、リンパ浮腫では減少していた。これは、組織間液の過度な貯留により、マクロファージの遊走能が阻害されたためと考えられた。(第3図)



【フローサイトメトリー】

吸引脂肪に対しては、コラゲナーゼ処理を行い、遠心後の間質細胞群(SVF)を回収し、CD31、CD34、CD45、CD14、CD206によるフローサイトメトリー解析を行った。

表面マーカーの違いにより、細胞は以下の4つに分けられた。CD45(+)細胞を血球系細胞とした。CD45(-)CD31(+)/CD34(+)の細胞を血管内皮細胞とした。CD45(-)CD31(-)CD34(+)の細胞を脂肪由来幹細胞とした。CD45(-)CD31(-)CD34(-)をその他の間質細胞とした。

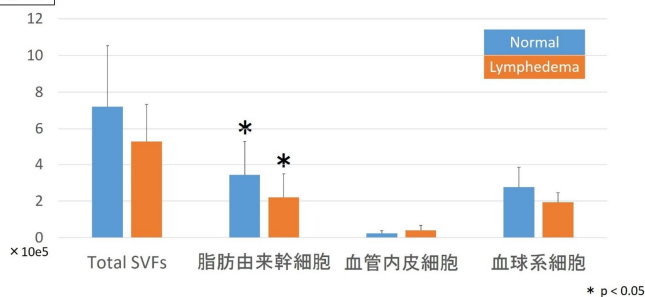
リンパ浮腫の脂肪組織 1ml から取れた SVF を解析したところ、脂肪由来幹細胞は $2.20 \pm 1.28 \times 10^5$ cells/ml、血球系細胞は $1.94 \pm 0.52 \times 10^5$ cells/ml、血管内皮細胞は $0.40 \pm 0.26 \times 10^5$ cells/ml であった。

それに対して、正常側の脂肪組織 1ml から取れた SVF を解析したところ、脂肪由来幹細胞は $3.44 \pm 1.83 \times 10^5$ cells/ml、血球系細胞は $2.76 \pm 1.09 \times 10^5$ cells/ml、血管内皮細胞は $0.24 \pm 0.14 \times 10^5$ cells/ml であった。

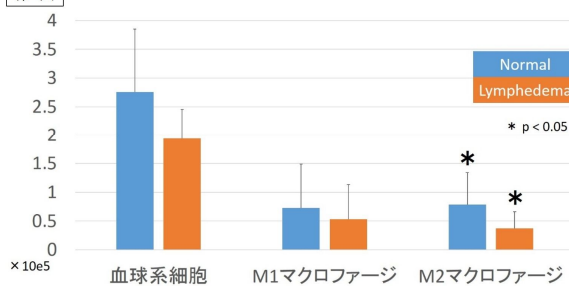
リンパ浮腫脂肪組織において、脂肪由来幹細胞が減少しているという結果になった。脂肪由来幹細胞は脂肪細胞のターンオーバーや修復に作用していると考えられる。リンパ浮腫の肢に関しては、しばしば創傷治癒の遅延が起こることが知られているが、その原因の一つとして、脂肪由来幹細胞が減少していることが関係していると考えられる。(第4図)

また、CD45(+)CD14(+)/CD206(-)の細胞をM1マクロファージ、CD45(+)CD14(+)/CD206(+)の細胞をM2マクロファージとしたところ、リンパ浮腫の脂肪組織にはM2マクロファージが有意に少ないことがわかった。(正常脂肪組織 $7.84 \pm 5.69 \times 10^4$ cells/ml、リンパ浮腫脂肪組織 $3.70 \pm 2.95 \times 10^4$ cells/ml、 $p=0.042$)このようなマクロファージの異常が、リンパ浮腫の免疫機能の異常に関与している可能性がある。(第5図)さらにはリンパ浮腫の進行に伴い、マクロファージの浸潤度が減少することが分かった。リンパ浮腫においては、M1/M2マクロファージのバランスがM1優位、M2低位になっているといった病態が考えられた。(第6図)

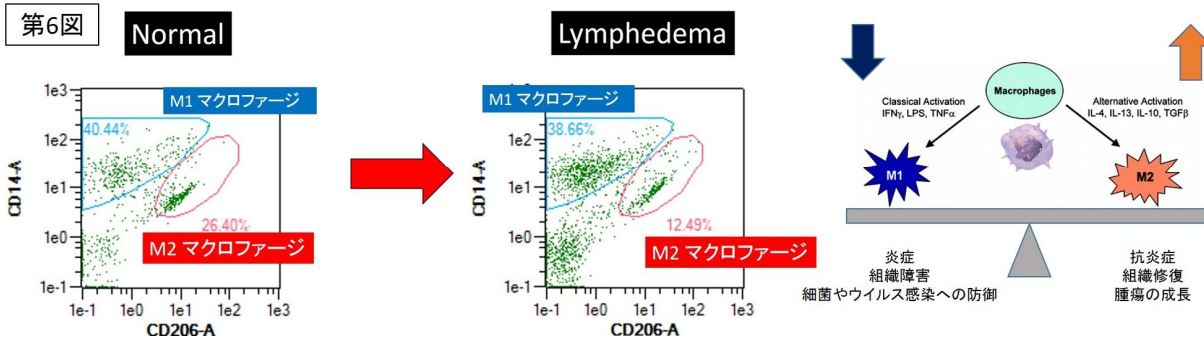
第4図



第5図



第6図



全身に分布する組織マクロファージ (Tissue Resident Macrophage) は、異物を貪食するとともに、組織の恒常性維持や炎症応答の制御に重要な役割を担う。近年になり、組織マクロファージは臓器によってフェノタイプ、受容体や機能が異なることが分かってきた。組織マクロファージは恒常状態では数が一定に保たれているが、造血幹細胞から供給されているわけではなく、組織内で増殖によって自己新生すると考えられている。マクロファージは、病原体侵入により活性化し、それらを排除するものを M1 型、アレルギー応答、脂肪代謝、創傷治癒および癌の転移・浸潤などに関与している細胞集団を M2 型としている。マクロファージが脂肪組織に浸潤する脂肪組織の慢性炎症が、メタボリックシンドロームの形成に大きく関わっていることが分かっている。また、最近の研究では、組織常在型の M2 マクロファージの一部が脂肪細胞のメンテナンスに関わっていることも明らかになり、本研究においてもリンパ浮腫において脂肪細胞の過形成を認めるとともに、M2 マクロファージの減少を認めた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件) 全て査読あり

1. Koshima I, Yoshida S, Imai H, Sasaki A, Nagamatsu S, Yokota K, Mizuta H, Harima M, **Tashiro K**, Yamashita S. Recent Topics on Fingertip Replantations Under Digital Block. Hand Clin. 2019 May;35(2):179-184.
2. Yoshida S, Koshima I, Imai H, Sasaki A, Fujioka Y, Nagamatsu S, Yokota K, Harima M, Yamashita S, **Tashiro K**. Indocyanine Green Lymphography Findings in Older Patients with Lower Limb Lymphedema. The Journal of Vascular Surgery. In press
3. **Tashiro K**, Arikawa M, Kagaya Y, Kobayashi E, Kawai A, Miyamoto S. Flap reconstruction after groin and medial thigh sarcoma resection reduces the risk of lower-extremity lymphedema. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2019 Jan 12. pii: S1748-6815(19)30030-0. doi: 10.1016/j.bjps.2019.01.009.
4. Yoshida S, Koshima I, Nagamatsu S, Yokota K, Yamashita S, Harima M, **Tashiro K**. Novel Interpositional Vein Grafting for Pedicle Extension of Island Pedicle Flaps. J Reconstr Microsurg Open 2018; 03(02): e50-54
5. **Tashiro K**, Arikawa M, Fukunaga Y, Nakatani F, Kobayashi E, Kawai A, Miyamoto S. Free Latissimus Dorsi Musculocutaneous Flap for External Hemipelvectomy Reconstruction. Microsurgery. 2018 Sep

6. doi: 10.1002/micr.30373.

6. Mashiko T, Takada H, Wu SH, Kanayama K, Feng J, **Tashiro K**, Asahi R, Sunaga A, Hoshi K, Kurisaki A, Takato T, Yoshimura K. Therapeutic effects of a recombinant human collagen peptide bioscaffold with human adipose-derived stem cells on impaired wound healing after radiotherapy. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jan 26. doi: 10.1002/term.2647. Epub 2018 Mar 4.
7. **Tashiro K**, Yamashita S, Narushima M, Koshima I, Miyamoto S. Hemi-Intravascular Stenting for Supermicrosurgical Anastomosis. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017 Nov 20;5(11):e1533.
8. **Tashiro K**, Yamashita S, Koshima I, Miyamoto S. Visualization of Accessory Lymphatic Pathways in Secondary Upper Extremity Lymphedema using Indocyanine Green Lymphography. *Annals of Plastic Surgery*. 2017 Oct;79(4):393-396.
9. **Tashiro K**, Feng J, Wu SH, Mashiko T, Kanayama K, Narushima M, Uda H, Miyamoto S, Koshima I, Yoshimura K. Pathological changes of adipose tissue in secondary lymphedema. *Br J Dermatol*. 2017 Jul;177(1):158-167.
10. **Tashiro K**, Yamashita S. Superficial Circumflex Iliac Artery Perforator Flap for Dorsalis Pedis Reconstruction. *Plast Reconstr Surg Global Open*. 2017 Apr 20;5(4):e1308.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. “SIEA 皮弁による乳房再建 適応と合併症回避のコツ”，第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会，大阪，April 11, 2017
2. ICG リンパ管造影検査の新しい分類パターン：近位型と遠位型”，第 41 回日本リンパ学会総会，鹿児島，June 2, 2017
3. “広背筋皮弁による骨盤半裁再建術”，第 21 回臨床解剖研究会，東京，October 21 2017
4. “遊離広背筋皮弁による骨盤半裁術後欠損の再建”，第 44 回日本マイクロサージャリー学会学術集会，宮崎，December 7, 2017
5. “移植脂肪組織によるリンパ管新生の臨床および基礎的解析”，第 29 回東京大学形成外科同門学術集会，東京，January 27, 2018
6. “鼠径部・大腿内側軟部肉腫切除に対する再建術と術後リンパ漏・リンパ浮腫”，第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会，福岡，April 13, 2018
7. “エクソソームの形成外科への応用とリンパ管新生”，第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会，福岡，April 13, 2018
8. “MSC エクソソームとリンパ管新生”，第 42 回日本リンパ学会総会・学術集会，弘前，June 22, 2018
9. “ADSC Exosome for Therapeutic Lymphangiogenesis”，第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会，大阪，October 19, 2018
10. “ASC Exosomes - Characteristics and Therapeutic Potentials”，2018 IFATS, Las Vegas, USA, December 14, 2018
11. “Lymphedema and Adipose Tissue: Pathophysiology and Therapeutic Approach”，43th Japanese Society of Lymphology, Tokyo, March 23, 2019

〔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) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

参考文献

- 1) Tashiro K, Yamashita S et al, Proximal and distal patterns: Different spreading patterns of

indocyanine green lymphography in secondary lower extremity lymphedema, J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2016 Mar;69(3):368-75.

- 2) Tashiro K, Shibata T et al, Indocyanine Green Lymphographic Signs of Lymphatic Collateral Formation in Lower Extremity Lymphedema After Cancer Resection, Ann Plast Surg. 2016 Aug;77(2):213-6.
- 3) Tashiro K, Fujiki M et al, Free Flap Salvage after Recurrent Venous Thrombosis by Means of Large-Scale Treatment with Medical Leeches. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2016 Dec 13;4(12):e1157.
- 4) Tashiro K, Yamashita S. Superficial Circumflex Iliac Artery Perforator Flap for Dorsalis Pedis Reconstruction. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2017 Apr 20;5(4):e1308.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。