

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08789

研究課題名(和文) 二次性リンパ浮腫の病態解明と新しい薬物治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of secondary lymphedema and development of new drug treatments

研究代表者

佐野 真規 (Sano, Masaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40733514

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)：二次性リンパ浮腫の病態をラットモデルを用いて解明した。急性期のマクロファージ、慢性期の筋線維芽細胞と増加した脂肪組織中マクロファージからTGF- β 1が産生され、SMADシグナルを介し、皮膚は線維化する。線維化した皮膚組織中のリンパ管機能は低下し、リンパ還流はさらに増悪する。エイコサペンタエン酸(EPA)は、脂肪細胞増加とTGF- β 1産生を抑制し、リンパ浮腫の皮膚線維化を改善した。皮膚組織中のリンパ管機能も改善した。ラットモデルとヒトリンパ浮腫皮膚から採取した線維芽細胞は、筋線維芽細胞に分化していた。培地中にEPAを添加で、TGF- β 1とコラーゲンの発現が抑制された。以上は英文誌へ掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮がんや乳がんなど、リンパ節郭清を伴う悪性腫瘍手術後に四肢リンパ浮腫が発症する。四肢体積は増加し、慢性期には皮膚が硬くなり、生活の質(QOL)は著しく障害される。しかし、マッサージや弾性着衣での圧迫など理学療法が中心で、有効な薬物治療はない。本研究は、リンパ浮腫の病態を解明し、新しい薬物治療の可能性を示した。今後の臨床研究、新しい薬物治療の開発への橋渡しになる研究である。

研究成果の概要(英文)：We showed the pathophysiology of secondary lymphedema using a rat model. Macrophages in the acute phase, myofibroblasts and macrophages in increased adipose tissue in the chronic phase were important. TGF- β 1 was produced from these cells, and caused skin fibrosis via SMAD signals. Lymphatic vessels were impaired in fibrotic skin tissue. Eicosapentaenoic acid (EPA) inhibited increase of adipocytes and TGF- β 1 signaling, and improved skin fibrosis. Lymphatic function was also improved. Fibroblasts were obtained from skin samples of rat model and patients with secondary lymphedema. These fibroblasts were differentiated into myofibroblasts. Addition of EPA to cultured myofibroblasts inhibited the expression of TGF- β 1 and collagen.

研究分野：血管外科

キーワード：リンパ浮腫 皮膚線維化 TGF- β 1 脂肪細胞 エイコサペンタエン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液は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心臓へ還流する。悪性腫瘍手術時のリンパ節郭清や、放射線治療等により、リンパ還流は障害され、リンパ浮腫が発症する。リンパ浮腫患者では四肢に腫脹・倦怠感・疼痛を認め、進行すると皮膚は硬化し、皮下脂肪が増生し、生活の質 (quality of life; QOL) は著しく障害される。本邦では約 20 万人、世界では約 2 億 5000 万人の患者がリンパ浮腫に罹患している。さらに悪性腫瘍患者数の増加と共に、リンパ浮腫患者も増加傾向である。リンパ浮腫治療のため、これまでにさまざまな薬物治療が試みられたが、いずれも有効ではなかった。そのため、現在の多くのガイドライン (国際リンパ学会、日本リンパ学会等) では、弾性ストッキングによる四肢の圧迫療法や、運動療法による理学的治療のみが強く推奨されている。リンパ浮腫に対する薬物治療開発の遅れは、適切な動物モデルが存在せず、病態が解明されていないことが原因である。リンパ浮腫の病態解明と、リンパ浮腫患者に対する安全な薬物治療の開発が、世界中で切望されている。

我々の研究グループは、これまでにリンパの診療・研究について従事し、様々な疾患におけるリンパ還流異常や (*PLoS ONE*, 9, e89830, 2014) (*Atherosclerosis*, 247, 127-134, 2016)、リンパ浮腫患者における蛍光リンパ管造影法の有用性について報告した (*J Vasc Surg*, 45:1016-1021, 2007)。この造影法は、簡便なリンパ浮腫の確定診断方法として確立され、世界中に普及した。また基礎研究としては、ヒトと同様に経過するラットモデルの開発に成功し、リンパ浮腫の病態解明についての研究も進めてきた。線維化を呈する他疾患 (肺線維症、肝硬変など) においては、筋線維芽細胞と TGF- β 1 が重要な役割を担っている。リンパ浮腫においては、急性期に浸潤したマクロファージから産生される TGF- β 1 により、線維芽細胞は筋線維芽細胞へ分化する。慢性期には筋線維芽細胞からの自己分泌された TGF- β 1 により、筋線維芽細胞からのコラーゲン合成が進行し、皮膚は線維化する。リンパ浮腫においても筋線維芽細胞と TGF- β 1 が皮膚線維化に重要な役割を持つことを示した (*Cancer Sci*, 2020; 111: 2620-2634)。しかし、ヒトリンパ浮腫に有効な薬物治療の開発には至っていない。

リンパ浮腫に有効な可能性のある薬物として、エイコサペンタエン酸 (EPA) に注目した。エイコサペンタエン酸は、魚油に含まれる不飽和脂肪酸であり、高脂血症の治療薬として本邦でも保険認可されている。エイコサペンタエン酸は TGF- β 1 を抑制し、肝硬変や心筋梗塞後の心筋線維化を改善する (*Borghi, C. Heart Int* 2:98, 2006)。またラットモデルやヒトリンパ浮腫症皮膚由来の線維芽細胞に、エイコサペンタエン酸 (EPA) を添加すると TGF- β 1 とコラーゲン発現が減少した。以上より、EPA が脂肪細胞増加の抑制と TGF- β 1 の抑制効果により、リンパ浮腫の皮膚線維化を改善するのではないかと、この仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「エイコサペンタエン酸を用いてリンパ浮腫の新しい薬物治療法を確立すること」である。

3. 研究の方法

ラットリンパ浮腫モデルにおける脂肪細胞の関与

12 週齢オス Sprague-Dawley ラットの下肢を用いてリンパ浮腫モデルを作成する。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採取し、皮下脂肪の顕微鏡観察 (Oil red O 染色、脂肪細胞の大きさ、数)、質量顕微鏡観察 (皮膚組織中のトリグリセリドの含有量)、real time PCR 解析 (皮膚組織中のアディポカイン (TNF- α 、MCP-1、IL-6 など)) をそれぞれ評価する。リンパ浮腫モデルでは、脂肪細胞の増加、皮膚組織中のトリグリセリドの増加、炎症性アディポカインの増加が予想される。

ラットリンパ浮腫モデルにおけるエイコサペンタエン酸の治療効果

ラットリンパ浮腫モデルを作成し、術後 3 か月からエイコサペンタエン酸を混餌投与する。術後 6 か月まで大腿部の皮膚を採取し、上記と同様の方法と、水置換法による下肢体積測定、蛍光リンパ管造影 (皮下リンパ液貯留の評価)、超音波顕微鏡 (皮膚硬度の評価) を行う。これらの結果を非投与群と比較し、エイコサペンタエン酸のリンパ浮腫に対する治療効果を検証する。エイコサペンタエン酸投与群では、脂肪細胞、トリグリセリド、炎症性アディポカインの発現が減少し、皮膚硬度が減少すると予想される。

ヒトリンパ浮腫症例におけるエイコサペンタエン酸の治療効果

我々の所属機関の血管外科外来に通院中の下肢二次性リンパ浮腫症例 (50 例) を対象とする。エイコサペンタエン酸 (1800mg/day) を投与し、投与前、投与後 3 ヶ月、6 ヶ月に皮膚硬度・弾力を計測し、皮膚硬度年齢、弾力年齢を算出し、投与前後の結果を比較する。エイコサペンタエン酸投与により、皮膚硬度年齢、皮膚弾力年齢の改善が期待される。

4. 研究成果

リンパ浮腫では、増大した皮下脂肪組織に浸潤したマクロファージが王冠様構造を作り、TGF- β 1 産生に関与することを示した (*Lymphat Res Biol*, in press, 10.1089/lrb.2021.0054, 2022)。これまでの結果と合わせ、リンパ浮腫の病態は、急性期のマクロファージ、慢性期の筋線維芽細胞と増加した脂肪組織中マクロファージから TGF- β 1 が産生され、SMAD シグナルを介し、皮膚は線維化すると考えられた。線維化した皮膚組織中のリンパ管機能は低下し、リンパ還流はさらに増悪する。エイコサペンタエン酸 (EPA) は、脂肪細胞増加と TGF- β 1 産生を抑制し、リンパ浮

腫の皮膚線維化を改善した。皮膚組織中のリンパ管機能も改善した。ラットモデルとヒトリンパ浮腫皮膚から採取した線維芽細胞は、筋線維芽細胞に分化していた。培地中に EPA を添加で、TGF- β 1 とコラーゲンの発現が抑制された。以上を英文誌へ投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masaki Sano	4. 巻 111
2. 論文標題 Potential role of transforming growth factor beta 1/Smad signaling in secondary lymphedema after cancer surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 2620-2634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sano Masaki, Hirakawa Satoshi, Yamanaka Yuta, Naruse Ena, Inuzuka Kazunori, Saito Takaaki, Katahashi Kazuto, Yata Tatsuro, Kayama Takafumi, Tsuyuki Hajime, Yamamoto Naoto, Takeuchi Hiroya, Unno Naoki	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of a Noninvasive Skin Evaluation Method for Lower Limb Lymphedema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 7~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/lrb.2018.0089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sano Masaki, Hirakawa Satoshi, Sasaki Takeshi, Inuzuka Kazunori, Katahashi Kazuto, Kayama Takafumi, Yamanaka Yuta, Tsuyuki Hajime, Endo Yusuke, Naruse Ena, Yokoyama Yurina, Sato Kohji, Yamauchi Katsuya, Takeuchi Hiroya, Unno Naoki	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of Subcutaneous Adipose Tissues in the Pathophysiology of Secondary Lymphedema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/lrb.2021.0054	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 二次性リンパ浮腫の病態へのTGF-β/Smadシグナルの関与
3. 学会等名 日本リンパ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 二次性リンパ浮腫の皮膚リンパ管障害へのTGF- β /Smadシグナルの関与
3. 学会等名 日本脈管学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 皮下脂肪細胞のリンパ浮腫病態への関与
3. 学会等名 日本リンパ学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 SVSスコアと大腰筋面積比を用いたPAD症例の生命予後評価
3. 学会等名 日本血管外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 ヒト大動脈壁内脈管の動脈硬化疾患への関与
3. 学会等名 日本血管生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 二次性リンパ浮腫の皮膚線維化におけるTGF- と脂肪細胞の関与
3. 学会等名 リンパ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 A noninvasive skin evaluation method for lower limb lymphedema
3. 学会等名 静脈学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 皮膚粘弾性測定器を用いたヒト下肢リンパ浮腫の皮膚評価方法の確立
3. 学会等名 静脈学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野真規
2. 発表標題 動脈硬化性の大動脈瘤と大動脈狭窄の病態は何が違うのか-大動脈壁内脈管に注目した考察-
3. 学会等名 脈管学会
4. 発表年 2019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	横山 由里奈 (Yokoyama Yurina) (30645875)	浜松医科大学・医学部附属病院・理学療法士 (13802)	
研究 分担者	片橋 一人 (Katahashi Kazuto) (60839091)	浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教 (13802)	

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
---------	---------