

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10031

研究課題名（和文）リンパ浮腫におけるBiotubeを用いた新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for lymphedema using Biotube

研究代表者

北山 晋也（KITAYAMA, Shinya）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：30714258

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：生体内で反応性に生成される管状構造物（Biotube）を利用して血管やリンパ管などの再生に応用し、新しい治療方法を開発することを目標として、Biotubeに関する基礎的な研究を行った。ラットの体内で3種類の太さのBiotubeを作成してラットの静脈に移植する実験を行い、想定通りの太さのtubeが生成されること、移植後も開存し静脈の代わりとして機能していること、太さによって特性が異なること、tube内腔の細胞構造が血管様に変化していることなどが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、動脈より口径が小さく流量が少ない静脈やリンパ管に対してもBiotubeが応用可能であることが示唆された。静脈やリンパ管に対するBiotubeの応用は本研究以前には報告が少なく、新しい知見として学術的な意義がある。また静脈やリンパ管の機能廃絶を背景とする疾患は未だ非常に難治であり、Biotubeを用いた新しい脈管再生治療が発展し、新しい治療オプションとなれば社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：With the goal of developing a new treatment method for the regeneration of blood vessels and lymphatic vessels by using tubular structures called Biotubes that are reactively generated in vivo, We conducted basic research on Biotubes.

We made three different caliber Biotubes in rats and implant them into rats veins. The results showed that tubes of the expected diameter were produced, tubes remained patent after implantation and functioned as a replacement for veins, the characteristics differed depending on the diameter, and the cell structure of the tube lumen changed to resemble blood vessels.

研究分野：リンパ浮腫、再建外科、マイクロサージャリー、再生医療

キーワード：lymphedema biotube microsurgery regenerative medicine

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療において、これまでは新規治療法の開発や早期発見などの対策に重きが置かれ、がんを根治することが社会的目標であった。しかし、治療成績の向上とともにがん治療を経験した人「キャンサーサバイバー」が増加しており、彼らがいかに自分らしく社会の中で生きるか、そのためにはどのようなサポートが必要かを考える取り組みが広がっている。

がん治療後の合併症である続発性リンパ浮腫は、リンパ節郭清や放射線性障害などで中枢のリンパ流が閉塞し、末梢のリンパ管内圧が上昇することでリンパ管が障害されるため生じる (Mihara M, et al. PlosONE. 2012)。本邦における発症率は婦人科癌術後で 2.4% ~ 36%、乳癌術後で 21.4% (リンパ浮腫診断治療指針、リンパ浮腫療法士認定機構、2013 年発行)、有病者数は全国で 10-20 万人とされている。さらに、乳癌をはじめとした悪性腫瘍は罹患率、有病率ともに増加の一途を辿っており、これらを解決する社会的ニーズは非常に高まっている。

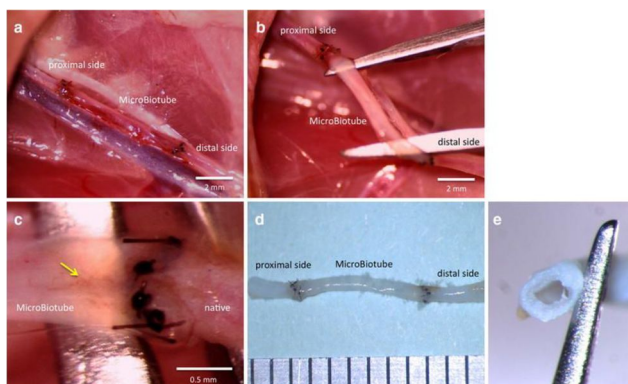
それに対し現行の治療では、上昇したリンパ管内圧を物理的に減ずる手術「リンパ管静脈吻合術」が近年活発に行われている。これは、顕微鏡下に鬱滞したリンパ管を静脈に吻合しシャントを直接形成する手術である。その有効性と吻合部長期開存の証明は長らくされていなかったが、我々は世界に先駆けてそれらを証明した (Yabuki Y, et al. Japanese Journal of Lymphology. 2011 / Maegawa J, et al. Journal of vascular surgery. 2012)。しかし、リンパ浮腫が進行するとリンパ管は狭窄や閉塞をきたす。その結果、吻合可能なリンパ管が同定できず手術が困難となるばかりか、変性したリンパ管はリンパ液の輸送能が低下しており更なるリンパ液の鬱滞を引き起こす。そのため、変性の無い機能的なリンパ管を再生・創出する、という根治的な治療法の研究とその開発が待望されている状況であった。

## 2. 研究の目的

前述の解決課題に対し、我々は biotube と呼ばれる脈管様組織の再構築に関する研究に着目した (Watanabe, T. et al, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011 / Ishii, D. et al, J Artif Organs. 2016) (図 1)。これは、生体内に移植した異物周囲に形成される管状の癒痕組織を Scaffold として利用する技術であり、小口径の動脈に関しては良好な結果が得られている。しかし、詳細な追報はないうえに、静脈やリンパ管に応用した文献的報告はない。同様の領域では、「脱細胞血管」が一定の成績を収めている。これは脱細胞処理した血管を graft / scaffold として用いる手法であるが、1mm 未満の小口径 ~ 超小口径 graft や長尺 graft においては閉塞や仮性動脈瘤形成のリスクが高い、と報告されている。それを回避するためには graft 内の内皮化が重要と考えられており、内皮細胞接着性ペプチドを添加する手法などが研究・報告されている (Yamanaka, H. et al. Biomaterials, 2018)。

そういった近隣領域の報告から、1mm 未満の小口径 ~ 超小口径 biotube の作成とリンパ管への応用における要点は「biotube にかかる内圧」と「biotube 内の内皮化」であろうと考えた。つまり、biotube へ形成外科的な手技である超微小脈管吻合を直接的に行うことでリンパ流の再建を確実にし、再構築リンパ管の内圧の維持を施す。また、培養した自家リンパ管内皮細胞を移植することで速やかな内皮化を誘導する。これらにより、再構築組織の中長期的な開存が期待できると考えた。

これらを踏まえ、Biotube を用いて新たなリンパ管を再生・創出し、リンパ浮腫に対する新しい治療法を開発することを目的として本研究を行った。



(図 1) ラット皮下へ 600 μm 径のステンレスワイヤーを移植し、得られた脈管様組織を用いて動脈吻合を行っている。吻合後 1 か月における血流開存と組織学的な再構築を報告している。(Ishii, D. Development of in vivo tissue-engineered micro-vascular grafts with an ultra small diameter of 0.6mm (Micro-Biotubes), J Artif Organs. 2016)

### 3. 研究の方法

本研究は大きく3つのパートからなり、詳細は以下の通りである。

#### (1) ラットにおける Biotube の作成と組織学的解析

ラット皮下へ微小外径の棒状シリコン片を移植する(図2)。シリコン片は鼻涙管狭窄症に用いる涙道チューブなど複数の異なる口径を持つものを用いる。移植し1か月、3か月後に再構築された biotube を回収し、組織学的な解析を行う。解析項目は、HE 染色、EVG 各染色に加え、I 型コラーゲン抗体、LYVE-1 抗体、抗平滑筋抗体による免疫染色を行う。

#### (2) ラットにおける超微小脈管吻合技術を用いた検証

形成外科の専門的な手技の一つである微小脈管吻合術を用いた検証を行う。ラット皮下で作成した biotube と大腿部もしくは腹腔内のリンパ管を顕微鏡下に吻合する。術直後、術後1か月、術後3か月におけるリンパ管様組織の開存性を蛍光リンパ管造影法で確認する。その後にリンパ管様組織を回収し、(1)と同様に組織学的な解析を行う。

#### (3) ヒト/ラットリンパ管内皮細胞の培養とその特性解析

リンパ浮腫に対するリンパ管静脈吻合術時に生じる余剰リンパ管の供与を受け、ヒトリンパ管内皮細胞を培養する。同時にラット正常リンパ管を採取し、同様にラットリンパ管内皮細胞を培養する。培養は DMEM-F12 培地を基礎培地とし、低酸素環境下での培養を行う。それによって得られる細胞群の形態的变化や増殖性、組織分化性など基本的な特性を解析する。

コントロールとしてヒト新生児皮膚由来リンパ管内皮細胞(HULEC)を用いる。増殖性は MTT アッセイを行い、増殖曲線の作成と細胞倍加時間の算出を行う。組織分化性は PCR を行い、mRNA の確認を行い比較検討する。血管内皮マーカー CD31 や、リンパ管新生増強因子 VEGF-C、リンパ管内皮マーカー VEGFR-3 などの確認を行う。培養した細胞群は免疫不全マウスやラットにおいて biotube と併せて移植し、2と同様の実験系において追加検討する。

図2：再生医療技術を用いたリンパ管様組織の再構築

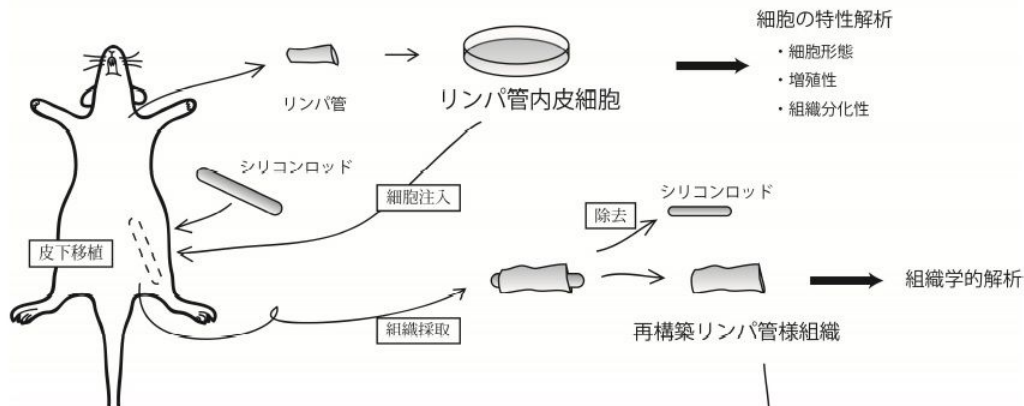
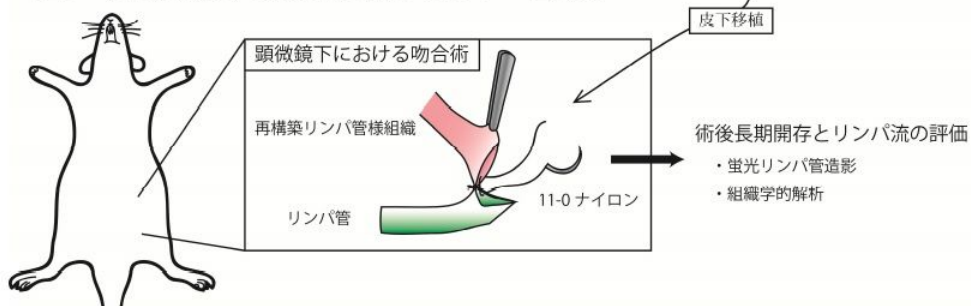


図3：超微小脈管吻合技術を用いたリンパ管吻合



#### 4. 研究成果

当初計画していた biotube のラットリンパ管への吻合は、ラットリンパ管径が極めて小さいために口径差の問題や技術的な問題から困難であった。そのため、発生・解剖学的にリンパ管に近い脈管であり、過去に biotube 移植の報告の少ない静脈へ biotube を吻合して各所所見を得る方針とした。その結果 2021～2023 年度までの研究により、biotube の作成と大腿静脈への吻合・開存性に関して以下の成果を得た。

(1) 収縮により樹脂の外径よりやや小さい内径となるものの、概ね外径に対応した内径の biotube が形成された。600  $\mu\text{m}$  程度の小口径の樹脂を用いた場合に biotube 周囲の炎症細胞浸潤と壁の肥厚が見られる例があり、至適口径や限界口径などが存在する可能性が示唆された。

(2) 開存率は 50% (14 部位中 7 部位) で、口径別では大腿静脈と口径差の少ない樹脂 B で最も高く (57%)、最も内径の小さい樹脂 C で最も低い (33%) 結果であった。動脈に biotube を吻合した過去の報告よりも開存率は低く、flow の強さや樹脂の口径 / 表面性状などの影響を受けている可能性が示唆された。また、回収した biotube の組織学的な解析として HE・EVG・SMA・CD34 の各染色を行い、正常血管 (動脈・静脈) を比較対象として以下の所見を得ている。

(3) 正常血管では中膜に EVG や SMA で染色される組織を認めたが、biotube では吻合前・後に関わらずそれらを認めず、中膜用組織の再構築は認めなかった。(4) 開存を認めた biotube の内腔には正常血管よりも薄いものの CD34 陽性細胞の層を認め、tube 内の内膜化が起きていることが示唆された。

次いで、ヒト / ラットリンパ管内皮細胞の特性解析等を試みたが、内皮細胞の培養に際して安定した培養条件や操作の模索に時間を要し、COVID-19 による影響を強く受けたこともあり、細胞増殖性や組織分化性などの解析を行うまでには至らず、今後の課題として持ち越しとなった。

本研究の結果から、より口径や flow の少ない脈管であっても半数程度で biotube の開存性は保たれ、かつ内膜化も確認された。今後内皮細胞の付加などの工夫を加えることで、成績を向上させ、新しい治療法として発展させていく可能性があると考えられた。

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 矢吹雄一郎、玉野井慶彦、足立英子、鍵本慎太郎、北山晋也、前川二郎
2. 発表標題 Biotubeを用いた小口径静脈の再生に関する研究
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
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	鍵本 慎太郎  (Kagimoto Shintaro)  (10737480)	公益財団法人がん研究会・有明病院・副医長   (72602)	
研究分担者	矢吹 雄一郎  (Yabuki Yuichiro)  (30610357)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師   (22701)	
研究分担者	前川 二郎  (Maegawa Jiro)  (70244449)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授   (22701)	
研究分担者	三上 太郎  (Mikami Taro)  (90315804)	横浜市立大学・医学研究科・客員准教授   (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
---------	---------