

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：80131

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11318

研究課題名（和文）リンパ管網含有立体ヒト皮膚モデルを用いた超音波による新規リンパ浮腫治療法の開発

研究課題名（英文）Development of three-dimensional human skin model containing lymphatic network and novel lymphedema treatment using ultrasound

研究代表者

成田 大一（Narita, Hirokazu）

公益社団法人函館市医師会函館市医師会看護・リハビリテーション学院（生体医工学研究センター）・生体医工学研究センター・生体医工学研究センター長

研究者番号：90455733

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ヒトの皮膚を高度に再現する3次元ヒトモデルの構築を目指し、世界で初めてリンパ管網を内在する3次元ヒト皮膚モデルを作製することに成功した。またリンパ管網を含有する真皮層モデルならびにリンパ管内皮細胞の単層培養系に低出力パルス超音波を照射し、超音波がリンパ管新生を促進する可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する手術療法や放射線療法が進歩し生命予後を改善している一方で、治療の副作用としてのリンパ浮腫に悩まされている患者も多い。これまでに我々は、放射線によりリンパ管ネットワークを破綻させたラットに超音波を照射することで、皮下のリンパ管新生が誘導される可能性を見出している。しかし、動物実験で得られた成果を直接ヒトに適用することへの危険性も同時に指摘されている。

本研究課題では、ヒトの皮膚を高度に再現する3次元ヒト皮膚モデルの構築とともに、超音波照射によるリンパ管新生を促進する可能性を見出している。これらの成果は、新しいリンパ浮腫治療法の開発の基盤になると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to construct a three-dimensional human skin model that highly mimic the human living skin. We have successfully created the human skin model with the network of lymphatic vessels for the first time in the world.

Additionally, we irradiated a monolayer of lymphatic endothelial cells and a dermis model containing lymphatic network with low intensity pulsed ultrasound, and demonstrated the ultrasound have the potential to promote lymphangiogenesis.

研究分野：解剖学

キーワード：リンパ管ネットワーク 3次元ヒト皮膚モデル 超音波 リンパ管内皮細胞 リンパ管新生

## 1. 研究開始当初の背景

がん手術などによるリンパ節郭清に起因したリンパ管ネットワークの破綻であるリンパ浮腫は患者の Quality of Life を低下させる大きな問題となっている。しかし、リンパ浮腫の治療方法は、外部から力を加えて組織液の排液を促す複合的理学療法などの対症療法、もしくは残されたリンパ管と周囲の静脈をつなぐリンパ管静脈吻合術のような限られた施設でのみ行われている侵襲的な外科療法しかなく、いずれの方法でも完治は困難である。

近年、血管やリンパ管の形態形成において、流れや超音波、電気刺激といった物理的な刺激が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている<sup>1)</sup>。中でも超音波は、虚血組織に対して phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signal を介した血管新生を誘導することが報告され<sup>2)</sup>、既に狭心症患者に対する臨床研究も開始されている非常に有用な非侵襲的治療ツールである。同様に、リンパ管新生を促進するシグナルの一つとして PI3K の重要性が最近動物実験によって明らかにされている<sup>3)</sup>。また、我々は放射線によりリンパ管ネットワークを破綻させたラットに超音波を照射することで、皮下のリンパ管新生が誘導される可能性を見出している(未発表)。これらのことから超音波はリンパ管新生を通じた新しい非侵襲的なリンパ浮腫治療法として期待できるものである。しかし、これまでの研究結果は実験動物によるもののみであり、この治療方法を臨床応用へと繋げるためには、まずヒトの試料を用いて、その基盤となる超音波によるリンパ管新生メカニズムと照射条件を明らかにし、エビデンスを構築する必要がある。

## 2. 研究の目的

機能的なリンパ管ネットワークを持ったよりヒトに近い *in vitro* モデルを構築し、このモデルを用いて超音波のリンパ管新生誘導に対する有効性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) リンパ管網含有 3 次元ヒト皮膚モデルの構築方法

ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) ならびにヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) を 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度下で拡大培養した後、剥離・回収した。回収した NHDF に Layer-by-Layer (LbL) 法<sup>4)</sup>を用いて、フィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) でナノフィルムコーティングした後、24-well 用 Transwell® insert に 0.5 層分の HDLEC を 4 層分の NHDF でサンドイッチ状に挟み込むように積層化してリンパ管網を含有する真皮層を作製した (従来モデル)。

また、真皮層をより生体類似のモデルとして再現することを目的として 1 層分の reticular cell を FN/G ナノフィルムコーティング後、0.5 層分の HDLEC と混合し、4 層分の NHDF でサンドイッチ状に挟み込むように積層化するモデルも作製した (reticular cell 混合モデル)。

これらの真皮層を作製後、その表層を 0.04 mg/ml Type I V collagen でコーティングし、拡大培養した正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を 3 層分播種した。その後、10% FBS 含有 DMEM と EpiLife™ の等量混合培地に 25 µg/ml アスコルビン酸を添加した培地を用いて air-lift 培養を 7 日間行い、真皮と表皮より成る皮膚モデルを構築した。

構築された皮膚モデルを光学・電子顕微鏡を用いて解析した。

### 2) 真皮層 (従来モデル) に対する超音波照射

上述の従来モデルの真皮層を構築後、超音波 (強度: 0.3 w/cm<sup>2</sup>, 周波数: 1.5 MHz, 頻度: 10 分/day) を 3 日間、Transwell® insert の底面より照射した。最後の照射から 24 時間後に 3 次元組織を固定・染色し、リンパ管網の形成を非照射群と比較・検討した。

### 3) ヒトリンパ管内皮細胞単層培養に対する超音波照射

HDLEC 単層培養に対する超音波照射の効果を検証するために scratch assay を実施した。HDLEC を 100%コンフルエントに達するまで 24well プレートで拡大培養し、200 µl ピペットチップを使用して各 well 中央部分にギャップを形成した。続いて超音波照射群では well 上方から超音波 (強度: 30 mw/cm<sup>2</sup>, 周波数: 3.0 MHz, 頻度: 10 分/day) を 1 日 1 回計 2 回照射した。そして照射群ならびに非照射群の 24 時間後、48 時間後のギャップの閉鎖状態を観察・比較した。

## 4. 研究成果

### 1) リンパ管網含有 3 次元ヒト皮膚モデルの解析結果

従来モデルでは、真皮層にリンパ管内皮マーカーの一つである LYVE-1 陽性の拡張した毛細リンパ管網が形成されていた。また真皮層の厚さは約 70µm で、細胞外基質に比して線維芽細胞が密に存在していた。一方、reticular cell 混合モデルでは、真皮層の厚さは約 95 µm で従来モデルに比べて厚くなっており、細胞密度も小さくなっていった (Fig. 1a-d)。リンパ管構造は reticular cell 混合モデルでは、従来モデルのような管腔の拡張は認められず、密な網を形成していた (Fig. 1e)。表皮については、階層的に分化が進行し、角化を含む厚い表皮層の形成が確認された (Fig. 1f)。

以上の結果から、本研究課題では従来モデル、reticular cell 混合モデルともに真皮層にリンパ管網を含む 3 次元ヒト皮膚モデルの構築できたと考えられる。また、生体における脈管網の周囲には細網線維が密に分布していることから reticular cell をリンパ管網周囲に播種することで、よりヒト生体のリンパ管に近い構造を形成できると考えられた。

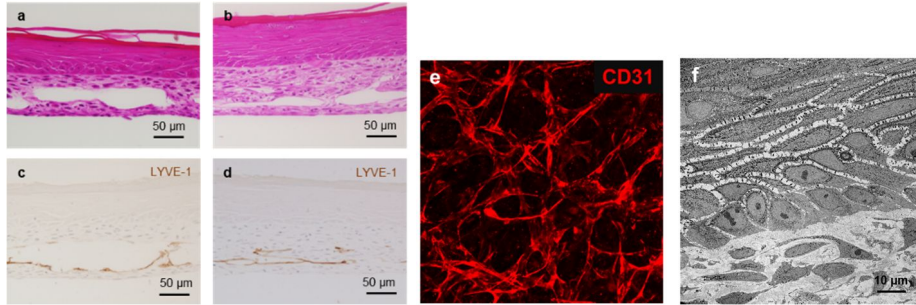


Fig.1 リンパ管網含有3次元ヒト皮膚モデルの組織像。a, c. 従来モデル組織切片像。真皮層に LYVE-1 陽性の拡張したリンパ管が見られる。b, d, e, f. reticular cell 混合モデル。b, d. 組織切片。リンパ管の拡張が抑えられ、従来モデルに比べて豊富な細胞外基質により真皮層も厚くなっている。e. 真皮層 Whole-mount 標本の CD 31 に対する免疫染色像。3次元的に広がるリンパ管のネットワークが見られる。f. 表皮層の TEM 像。表皮層の階層的な分化が見られる。

## 2) 真皮層（従来モデル）に対する超音波照射の結果

超音波照射群ならびに非照射群ともに3次元組織全体に LYVE-1 (リンパ管マーカー)ならびに CD31 (内皮細胞マーカー)共陽性のリンパ管網が形成されていた。非照射群と比較して照射群では CD31 (内皮細胞マーカー)の蛍光強度が低下し、LYVE-1 (リンパ管マーカー)の蛍光強度が増加する傾向がみられた (Fig. 2)。このことから超音波照射により、リンパ管形態形成を促進する可能性が考えられた。しかし、3次元組織は組織構築のためにウシ胎児血清含有の培地を使用しており、超音波による作用よりも種々のサイトカインが強く影響した可能性がある。このことから、よりシンプルな単層培養系で超音波の照射条件を検証していく必要があると考えられた。

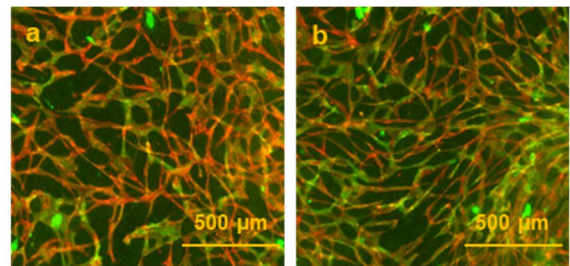


Fig. 2 従来モデルにおける真皮層 Whole-mount 標本の CD 31 (red)ならび LYVE-1 (green)に対する免疫染色像。a. 非照射群。b. US 照射群。US 照射群で CD31 陽性の脈管が減少し、LYVE-1 陽性の脈管が増加している。

## 3) ヒトリンパ管内皮細胞単層培養に対する超音波照射の結果

超音波照射群で有意にギャップの面積が減少しており (Fig. 3)、超音波によるリンパ管新生の可能性が示された。今後は関連分子などの機能形態変化をさらに詳細に追求し、リンパ管新生誘導に対する新しい治療法の確立につなげていく。

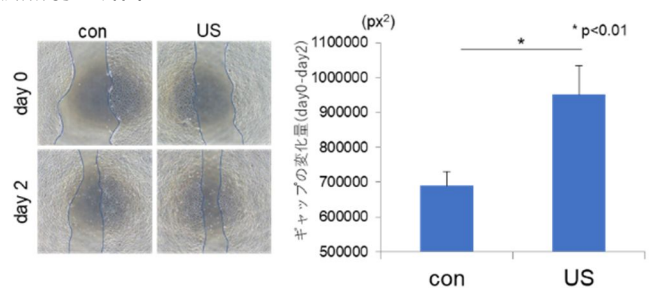


Fig. 3 Scratch assay の結果

## 5 . References

- Shindo T et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Enhances Angiogenesis and Ameliorates Left Ventricular Dysfunction in a Mouse Model of Acute Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016. 36:1220-9.
- Lu ZY et al. Therapeutic ultrasound reverses peripheral ischemia in type 2 diabetic mice through PI3K-Akt-eNOS pathway. *Am J Transl Res.* 2016. 8:3666-77.
- Han L et al. Interleukin-33 promotes inflammation-induced lymphangiogenesis via ST2/TRAF6-mediated Akt/eNOS/NO signalling pathway. *Sci Rep.* 2017. 7:10602.
- Nishiguchi A et al. Effects of angiogenic factors and 3D-microenvironments on vascularization within sandwich cultures. *Biomaterials.* 2014. 35:4739-48.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Murakami M, Akagi T, Sasano Y, Chiba T, Narita H, Shimoda H, Akashi M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Observation of a tight junction structure generated in LbL-3D skin reconstructed by layer-by-layer cell coating technique	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Tissue Eng Regen Med	6. 最初と最後の頁 798-803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.3221	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 -

1. 著者名 千葉智博, 成田大一, 渡邊誠二, 野見山早苗, 加治屋健太郎, 下田浩	4. 巻 45
2. 論文標題 ヒト毛細リンパ管と集合リンパ管の配向性について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 リンパ学	6. 最初と最後の頁 32-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成田大一, 新田祥子, 渡邊誠二, 千葉智博, 明石満, 下田浩
2. 発表標題 ヒト皮膚を高度に再現するリンパ管網内蔵型3次元ヒト皮膚モデルの開発
3. 学会等名 第44回日本リンパ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田大一, 高橋一人, 松崎典弥, 渡邊誠二, 千葉智博, 明石満, 下田浩
2. 発表標題 ヒト皮膚を高度に再現するリンパ管網内蔵型3次元ヒト皮膚モデルの構築
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野大輔, 渡邊誠二, 浅野義哉, 成田大一, 千葉 智博, 忠平和子, 下田 浩
2. 発表標題 Construction of blood and lymphatic networks in 3D engineered human tissues and their functional morphogenesis
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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	下田 浩  (Shimoda Hiroshi)  (20274748)	弘前大学・医学研究科・教授   (11101)	

	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 協力者	千葉 智博  (Chiba Tomohiro)	弘前大学・医学研究科・助教   (11101)	

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