

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09849

研究課題名（和文）リンパ浮腫における炎症性サイトカインに関する解析と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of inflammatory cytokines and development of new therapeutic methods in lymphedema

研究代表者

矢吹 雄一郎（YABUKI, Yuichiro）

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：30610357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で作成したリンパ浮腫モデルマウスの後肢は、術後2週間においてリンパ液のうっ滞を認めた。健康な後肢皮膚皮下組織厚は約0.59mmであったのに対し、リンパ浮腫モデルマウスのそれは約0.720mmであった。免疫組織学的解析ではII型アンジオテンシンII受容体の染色性が真皮、間質などを中心に上昇していた。また、本研究ではリンパ機能評価方法の標準化、規格化を目的として、リンパシンチグラフィの撮影条件を最適化するための定量的解析を行った。また、最適と考えられた撮影条件で重症度を分類した症例においてリンパ管静脈吻合術後吻合部開存率の経時的変化を比較検討した。これらの成果は国内専門学会で口演発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究でリンパ浮腫患者の皮下集合リンパ管においてアンジオテンシンII TypeII受容体の染色性が正常と比較し上昇していたことを報告した。今回、作成したリンパ浮腫モデルマウスにおいてもヒト検体と同様の結果を得た。以上より、このモデルマウスはヒトにおけるリンパ浮腫発症と同様の組織学的変化を来している可能性がある。今後これらを用いて基礎医学的解析が進むことが期待される。さらに、本研究ではリンパシンチグラフィの最適な撮影条件を検討した。今後はこの検討を重ねることにより、リンパ機能評価法の標準化につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：ICG fluorescence lymphangiography showed lymphatic stasis in the hindlimb of the lymphedema model mice in this study at 2 weeks postoperatively. The thickness of the subcutaneous tissue of the healthy hindlimb was approximately 0.59mm, whereas that of the lymphedema model mice was approximately 0.72mm. Immunohistological analysis showed that staining for angiotensin II type II receptors was elevated mainly in the dermis and stroma. In addition, quantitative analysis was performed in this study to optimize the imaging conditions for lymphoscintigraphy with the aim of standardizing the method of lymphatic function evaluation. We also compared changes over time in the postoperative anastomotic patency rate after lymphatic vein anastomosis in cases classified by severity of disease using imaging conditions that were considered optimal. These results were presented in an oral presentation at a domestic professional conference.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ浮腫 線維化 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は何らかの原因でリンパ機能が障害されることにより発症し、その多くは慢性化する。時として徐々に増悪し、皮膚皮下組織やリンパ管に線維化など不可逆的な変化をきたす。世界的にはフィラリア感染症によって発症するものが最も多く、その有病者数は1億4千万～2億5千万人と推定されている。本邦においては、悪性腫瘍に関連する外科治療や放射線治療によって生じた続発性リンパ浮腫が圧倒的に多い。その発症率は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)によると、婦人科癌術後で2.4%～36%、乳癌術後で21.4%とされている。有病者数は明らかにはされていないが、本邦における悪性腫瘍罹患率と手術施行数などを考慮すると、続発性リンパ浮腫有病者数は計り知れない。

その一方でリンパ浮腫の発症や病状の進行など、病態生理に関する基礎的解析は進んでいない。つまり、どういった治療を受けた患者がリンパ浮腫を発症しやすいのか、なぜ病状が進行するのか、そういった臨床的課題がいまだに解決されていない。

これらを解決すべく分子生物学的なアプローチによる解析が行われている。中でも我々は以前よりレニン・アンジオテンシン(以下RAS)系とそれに関連する炎症性サイトカインに着目していた。そして、平成26-28年に科学研究費助成事業「リンパ浮腫の発症メカニズムに介入する非侵襲的予防的治療法の開発(若手研究B)」で種々の検証を行っている。その中で、リンパ浮腫モデルラットの作成とその解析を行うと同時に、ヒトリンパ浮腫患者の皮下集合リンパ管を組織学的に解析した。そのところ、ヒトリンパ浮腫患者の皮下集合リンパ管は正常なものと比較し、II型アンジオテンシンII受容体抗体による染色性が高かった。さらに炎症・自己免疫関連因子(IgG、補体、IL-6、IL-1、TNF)に関して解析したところ、原発性リンパ浮腫患者における皮下集合リンパ管の肥厚した平滑筋層でIL-1、TNFの発現を認めた。以上より、我々は慢性リンパ浮腫におけるリンパ機能障害にはRAS系シグナルと炎症性サイトカインが関与しているものとして着目している。

さらに、リンパ機能の評価方法が標準化、規格化されていないこともリンパ浮腫の病態生理に関する解析が進まない要因の一つと考えている。リンパ機能の評価はヒトにおいてはリンパシンチグラフィやICG蛍光リンパ管造影などを代表とし、様々な方法で行われている。しかし、いずれの検査方法においても、それらを行う医療機関において独自に決定したプロトコルに基づいて行われているため、施設間でデータの比較が難しい。例えば、頭部セファログラムのように撮影条件を標準化、規格化することにより、多くのデータを横断的に比較検討することが可能である。しかし、リンパシンチグラフィにおいては、核種の投与量、投与部位、撮影時間、トレーサーの種類、ディテクターの感度など数多くの撮影条件があるが、全国的に統一されていない。そのため、施設間での情報共有や比較検討を行うことができておらず、臨床研究の推進性を損なう一因となっている。つまり、リンパシンチグラフィやICG蛍光リンパ管造影などいずれの評価方法においても、どういった撮影条件がリンパ浮腫におけるリンパ機能の評価するのに適しているのか解析し、それらを標準化、規格化していくことが重要であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的はリンパ浮腫の発症におけるRAS系を始めとした炎症性サイトカインの関与を評価する事と、リンパ機能評価方法の標準化に向けた解析を行うことである。具体的には、(1)リンパ浮腫モデルマウスを作成し、それにおいて組織学的解析を行うこと、(2)ヒト慢性リンパ浮腫患者のリンパシンチグラフィ画像を評価し、最適な撮影条件を検討する事である。

3. 研究の方法

(1)リンパ浮腫モデルマウスの作成と組織学的解析

我々は先行研究においてリンパ浮腫モデルラットを作成し、その評価を行っている。しかし、免疫組織学的解析を行うにあたり、抗原性が安定している動物種を選択するという目的からリンパ浮腫モデルマウスの作成を試みた。9週齢のマウス(C57BL/6J)の後肢片側でICG蛍光リンパ管造影を行った後、鼠径部全周性皮膚切開、鼠径部・膝窩部リンパ節郭清、大腿動静脈周囲リンパ管切除、皮膚内反縫合を行った。これらの手技の多くは手術用顕微鏡を用いて鏡視下に行った。これらの操作を行った肢をLE群とした。その他、皮膚切開と縫合のみを行ったSham群、一切手術操作を行わないNull群を設けて、それらを比較検討した。

リンパ節郭清などの手術を行った14日後に、対象となる後肢にICG蛍光リンパ管造影を行いリンパ流の評価を行った。その後、皮膚皮下、筋組織を全て一塊として全層的に採取した。Null群、LE群、Sham群に分け、皮膚皮下組織厚の評価と、免疫組織学的評価を行い、比較検討した。

(2)リンパ機能評価法の標準化に向けた解析

リンパ浮腫の診断や重症度評価においてはリンパシンチグラフィを用いることが世界的な標準となっている。我々も客観性の高さなどから長らく用いてきた。しかし、同一患者においても撮影条件が異なると画像のコントラストや明瞭度に差が生じることに着目していた。とくに放射性トレーサーの差異が画像に大きな影響を与えていると予想し、それに関する検討を行った。

2012年4月から2017年9月に撮影したSPECT-CTリンパシンチグラフィのうち、同一患者においてヒト血清アルブミン(HSA)およびフチン酸(phytate)、それぞれの放射性トレーサーでリンパシンチグラフィを撮影した症例を対象とした。

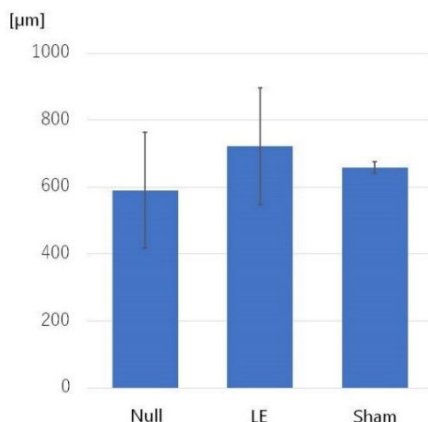
リンパシンチグラフィの核種は^{99m}Tcを用いた。1肢あたり80MBq投与し、120分後に撮影した。撮影には角度可変式ガンマカメラSymbia T16®(SIEMENS社)を用いた。

撮影したSPECT-CTリンパシンチグラフィから再構成したMIP画像の正面像を画像解析ソフトSYNAPSE VINCENT® ver 5.3.0001(富士FILM)を用いて解析した。皮膚逆流現象(Dermal Back Flow: DBF)と線状陰影(Linear Pattern; LP)に関心領域(region of interest: ROI)を設定し、ガンマ線の平均カウント値や最大カウント値を計測した。それらを用いて、DBFにおいてはコントラストノイズ比(Contrast Noise Ratio: CNR)を算出した。LPにおいては標準取り込み値比(Standardized Uptake Value Ratio: SUVR)を算出した。これらの値をHSAおよびphytateを用いた場合で比較検討した。

4. 研究成果

(1)リンパ浮腫モデルマウスの作成と検証

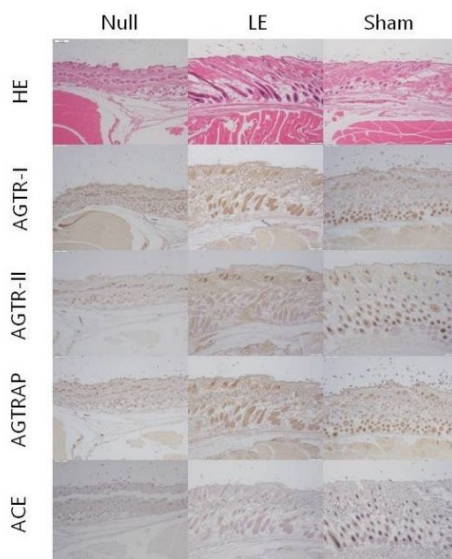
Null群においては線状陰影が数条に渡って観察でき、膝窩および鼠径においてリンパ節と思われる蛍光色素の集積を認めた。一方、LE群とSham群においてはNull群と比較し細く蛇行した線状陰影を多数認めた。採取した検体において、1検体あたりランダムに3箇所選択し、皮膚皮下組織厚を測定した。Null群においては $589 \pm 173 \mu\text{m}$ であったのに対し、LE群は $721 \pm 174 \mu\text{m}$ 、Sham群は $658 \pm 17 \mu\text{m}$ であった(図1)。



(図1)リンパ浮腫モデルマウスの皮膚皮下組織厚の比較

組織学的解析においては、HE染色に加え、RAS系に関する免疫染色を行った。具体的には、アンジオテンシンII受容体Type-I(AGTR-I)、アンジオテンシンII受容体Type-II(AGTR-II)、Angiotensin II Receptor Associating Protein(AGTRAP)、アンジオテンシン転換酵素(ACE)を染色した。

AGTR-IIを除き、染色性は概ね同一であった。AGTR-IIはLE群の真皮や皮下組織においてNull群と比較し染色性が上昇していた。に真皮や皮下組織で高かった(図2、図3)。



(図2)リンパ浮腫モデルマウスにおける皮膚皮下組織の免疫組織学的評価



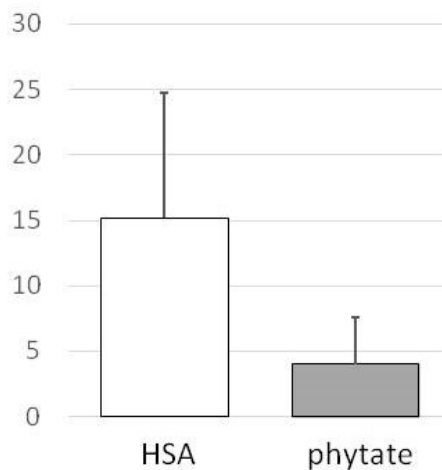
(図3)リンパ浮腫モデルマウスにおける皮下組織、筋組織の免疫組織学的評価

(2)リンパ機能評価法の標準化に向けた解析

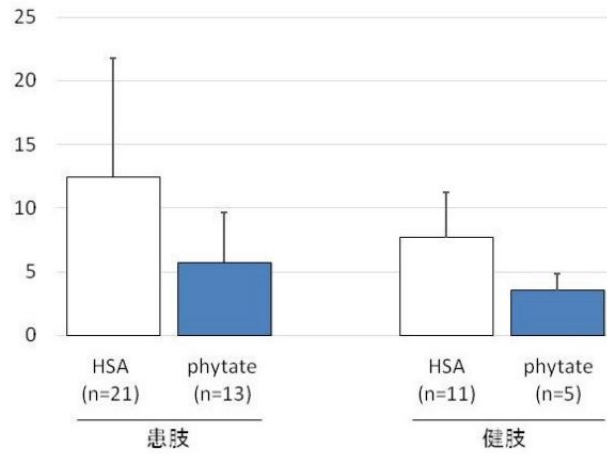
対象は16例、平均年齢 57.9 ± 10.3 歳、男性は1例、女性は15例であった。両側性は5例、片側性は11例であった。そのうち健側11肢、患側21肢を評価した。いずれもHSAを用いたリンパシンチグラフィを先行して撮影しており、phytateを用いた撮影とは約3年の期間が空いていた。

DBFのCNRはHSA使用時とphytate使用時それぞれ 15.2 ± 9.6 、 4.0 ± 3.6 であり、HSAの方が有意に高値であった ($p < 0.01$, Wilcoxon signed rank test) (図4)。つまり、DBFのコントラストは放射性トレーサーとしてHSAを使用した時の方が高いという結果であった。

患肢におけるLPのSUVRはHSA使用時とphytate使用時それぞれ 12.5 ± 9.4 、 5.7 ± 4.0 であり、HSAの方が有意に高値であった ($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test) (図5左)。健肢におけるLPのSUVRもHSA使用時とphytate使用時それぞれ 7.6 ± 3.6 、 3.5 ± 1.4 であり、HSAの方が有意に高値であった ($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test) (図5右)。つまり、LPの描出においても放射性トレーサーとしてHSAを使用した時の方がPhytateを使用した時と比較して明瞭度が高いという結果であった。



(図4)DBFのコントラストノイズ比



(図5)LPの最大取り込み値比(SUVr)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢吹雄一郎、小池智之、足立英子、北山晋也、前川二郎
2. 発表標題 リンパ浮腫に対するリンパシンチグラフィにおいて各種の投与量が画像に与える影響
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹雄一郎
2. 発表標題 リンパ流の可視化とその応用
3. 学会等名 第45回日本リンパ学会・学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹雄一郎、足立英子、北山晋也、前川二郎
2. 発表標題 リンパ管静脈側端吻合術の吻合部長期開存に関する検討
3. 学会等名 第47回 日本マイクロサージェリー学会学術集会
4. 発表年 2020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	北山 晋也 (KITAYAMA Shinya) (30714258)	横浜市立大学・附属病院・助教 (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	足立 英子 (ADACHI Eiko) (30747580)	横浜市立大学・医学研究科・共同研究員 (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	小池 智之 (KOIKE Tomoyuki) (80723345)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教 (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