

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11241

研究課題名(和文) 運動負荷により続発性リンパ浮腫は軽減するか？ - 動物モデルを用いた基礎研究 -

研究課題名(英文) Effects of exercise in the structures of lymphatic networks in secondary lymphedema: an analysis using a rat model.

研究代表者

小阪 淳 (Kosaka, Jun)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40243216

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)：タキソイド抗腫瘍剤・ドセタキセルは、副作用として続発性リンパ浮腫を引き起こす。そこで、ドセタキセル注入により、リンパ浮腫の動物モデルが作成できるかどうかを検証した。ドセタキセルをラットの腹腔内へ複数回投与後、体重、下肢径の変化を測定し、浮腫の有無を調べた。下肢全周パラフィン組織標本作製し、podoplanin抗体による免疫組織染色によりリンパ管形態を観察した。ドセタキセル注入ラットの下肢全周標本で、podoplanin陽性リンパ管内皮細胞の同定に成功した。しかし、ドセタキセル注入により、再現性を有した形で続発性リンパ浮腫をラットに誘導するには、投与方法等の検証がさらに必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

四肢の続発性リンパ浮腫に対しては、現在、科学的な裏付けのある治療法がない。リンパ浮腫の動物モデルが未だ確立されていないことが、研究の発展を妨げている。続発性リンパ浮腫の実験動物モデルを確立することは、リンパ浮腫の基礎研究を強力に推進することになり、非常に重要である。一方で、実験動物に浮腫を誘導した場合、その浮腫の同定法が問題となる。podoplanin抗体によるリンパ管内皮細胞の免疫組織化学染色法は、組織切片上で続発性リンパ浮腫により変化したリンパ管形態を同定でき、その浮腫の病態を組織レベルで定性的・定量的に評価できる優れた方法であることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Laboratory animal models of lymphedematous responses has not been established yet in the research field for lymphedema. In this study, I tried to induce secondary lymphedema to the Wistar rats by repeated injection of anticancer drug, Docetaxel, that occasionally induces lymphedematous responses as a side effect. The ankle circumference and body weight were measured and the structure of lymphatic vessels was visualized in the horizontal slice section of rat whole hind limb, by immunohistochemical staining against podoplanin. The docetaxel injection did not induce secondary lymphedema in this rat model reproducibly. I have succeeded in detecting the structures of lymphatic vessel in the hind limb of the docetaxel injected rat. I need to consider conditions of this research design using docetaxel in more detail. However, immunohistochemical detection against lymphatic endothelium in the whole hind limb was the useful strategy to evaluate the grade of lymphedema, quantitatively.

研究分野：解剖学

キーワード：リンパ浮腫 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

乳癌や骨盤内悪性腫瘍の外科手術後にしばしば発症する四肢の“続発性リンパ浮腫”は、術後の患者のADL(Activities of Daily Living), QOL(Quality of Life)を著しく低下させる。現在、リンパ浮腫の治療としては、圧迫療法、リンパ・ドレナージ、運動療法や、静脈-リンパ管吻合手術等の症状改善策が試みられている。乳癌術後の上肢リンパ浮腫のリスクに対して、運動療法がリンパ浮腫の発症率を下げ筋力を向上させることがリンパ浮腫学会の診療ガイドラインにも記されている。しかし、効果がある場合とない場合があり、それらの差がどのような科学的根拠に基づくのか明確ではない。また、下肢リンパ浮腫については、ランダム化比較試験でも明確な効果は報告されていない。つまり、それぞれの治療法に、明確な基礎科学の証拠が不足している状態である。その理由の1つとして、リンパ管形成の基礎的研究が立ち遅れていることがあげられる。特に、リンパ浮腫については、その病態を再現できる実験動物モデルの決定版が未だ確立されていないことが研究上の大きな課題である。申請者は、リンパ浮腫の動物モデルを作成することを目指し、研究を遂行してきた。2018年に形成外科領域の微細手術法(microsurgery)の手法を駆使した動物モデルを作成し、一過性の“続発性リンパ浮腫状態”を作り出すことに成功した。この動物の下肢全周組織標本を作製し、組織化学的に解析した結果、浮腫の進行につれてリンパ管数が、特に表層部で優位に増加することを突き止めた。この事実は、ヒトにおいても、リンパ浮腫発症の患肢において、リンパ管網の再構築が起こっていること、さらに浮腫の増悪・寛解につれて、リンパ管数の変化が起こっていることを強く示唆する。そこで、「リンパ浮腫の発症、増悪、及び様々な処置により寛解した場合、リンパ管網が時間経過に伴って、質的量的に変化するのだろうか？」を、研究課題の核心をなす学術的「問い」として設定した。

ヒトに発症した上肢の続発性リンパ浮腫に対しては、上記で述べたように運動療法が試みられている。しかし、どのような運動療法を行えばよいのか、どのような強度で運動を行えばよいのか等、基礎研究レベルの根拠が乏しい中で、保険診療の範囲内で治療が試みられている。これは運動療法のみならず、圧迫療法、リンパ・ドレナージ、microsurgeryを用いた静脈-リンパ管吻合手術等、すべての試みについても当てはまると言ってもよい。そこで、本研究では、リンパ浮腫が運動負荷によって軽減されるかどうか、かつ、その過程でリンパ管数の変化を伴うかどうかを、基礎実験レベルで検証することを研究開始当初の目標とした。

2. 研究の目的

申請者が報告した動物モデルは、形成外科領域のmicrosurgeryの手法を駆使し、ラットの片側下肢を切断し、直ちに動静脈を吻合することで(amputation and replantation)、続発性のリンパ浮腫を誘導するものである(図1)。汎用される実験動物ラットを用いて、リンパ浮腫を再現できる極めて優れた手法であるが、以下の2点で、改善すべき問題が残されている。(1)まず、microsurgeryの手法が極めて難しく、簡単に実施できる手法ではないという点である。臨床現場で用いられる微細血管吻合の手法は、形成外科の専門医のみが駆使できるもので、習熟するには、大変な労力と時間が必要である。(2)次に、この動物モデルでも、ヒトで発症する続発性リンパ浮腫が完全に再現できるものではないという点があげられる。ヒトの続発性リンパ浮腫は、運動療法、圧迫療法、リンパ・ドレナージ等の治療を試みても改善しないケースが多々ある。しかし、このラットの動物モデル続発性のリンパ浮腫は必ず一過性で、手術実施後7日～

10 日で、見かけ上のリンパ浮腫は自然消失してしまう。以上の様な欠点を克服することなしでは、続発性リンパ浮腫の実験動物モデルの決定版とは言い難い。さらには、多数の実験群での動物数 (n) が必要となる、行動解析や、分子細胞生物学的な解析、またそれらのデータの統計解析は、実施が難しいという状況がある。

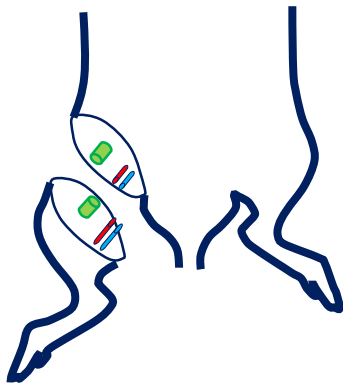


図1 (左図) microsurgery を利用したラット・リンパ浮腫誘導モデル。動脈、静脈を微小吻合する。骨、皮膚、筋、皮下組織は端々吻合する。リンパ管は吻合しない。**(右図)** 術後 3 日目。下肢周囲径計測のため剃毛してある。参考文献より改変。

本研究では、まず、簡便な新しい実験動物モデルの確立を目指すことを第一の研究目的とした。そこで、臨床現場で、続発性リンパ浮腫を副反応として引き起こすタキソイド系抗腫瘍剤・ドセタキセルを用いることで、新たなリンパ浮腫モデルが作成できるか否かを検証した。その動物モデルが完成後、運動療法によりリンパ浮腫が改善するかどうかの検証を行う目標を立てた。さらにリンパ管の標識マーカーである podoplanin 抗体により、組織標本を免疫染色し、リンパ管の同定を行い、リンパ管形態の変化、リンパ管数の変化を捉えることを試みた。

3. 研究の方法

10mg/kg-体重のドセタキセルをWistarラットの腹腔内へ週1回の頻度で3週間にわたり注入した。その後、時間経過を追って、体重、および下肢径の測定を行った。組織化学的解析には、動物を麻酔薬の大量投与下で開胸し、左心から4%パラホルム・アルデヒド溶液を灌流し固定した。片測の下肢を股関節下で離断し、さらに一昼夜浸漬固定した。次に、組織を10%EDTA溶液に1ヵ月間浸漬し脱灰した。その後、パラフィンに包埋し、下肢の水平断全体の組織標本とした。HE染色により、組織標本の状態を確認後、以降の組織化学的解析に用いた(図2)。リンパ管内皮細胞のマーカーとして知られている、LYVE-1抗体(Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1抗体)、及びpodoplanin抗体による免疫組織染色を行ってリンパ管内皮細胞形態の変化を観察した。2次抗体は、HRP抱合・抗マウスIgG抗体を使用し、DAB発色を行った。発色後、標本を脱水し永久組織標本とし、リンパ管内皮構造の解析に用いた。

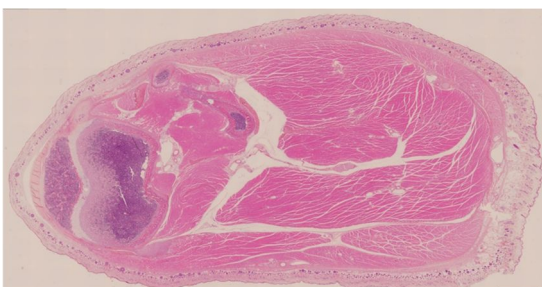


図2 ラット下肢全周の組織標本 (HE 染色)。HE 染色により、組織の状態を確認後、リンパ管内皮特異抗体による免疫組織化学に使用した。参考文献より改変。

4. 研究成果

下肢全周径を測定し、陰性対照と比較したところ、顕著な差は認められなかった。体重の変化を見たところ、ドセタキセル注入により、むしろ体重減少の傾向が見られた。ドセタキセル注入ラットの下肢全周標本で、免疫組織化学染色を実施したところ、LYVE-1抗体による免疫組織化学染色では、染色像が安定せず、使用不可と判断した。一方で、podoplanin抗体は、再現性高くリンパ管内皮を染色した(図3)。podoplanin陽性リンパ管内皮細胞の数、形態変化をドセタキセル注入ラットと対照正常ラットで比較したが、リンパ管形態の大きな差、リンパ管数の差、および、浮腫の組織像は見られなかった。

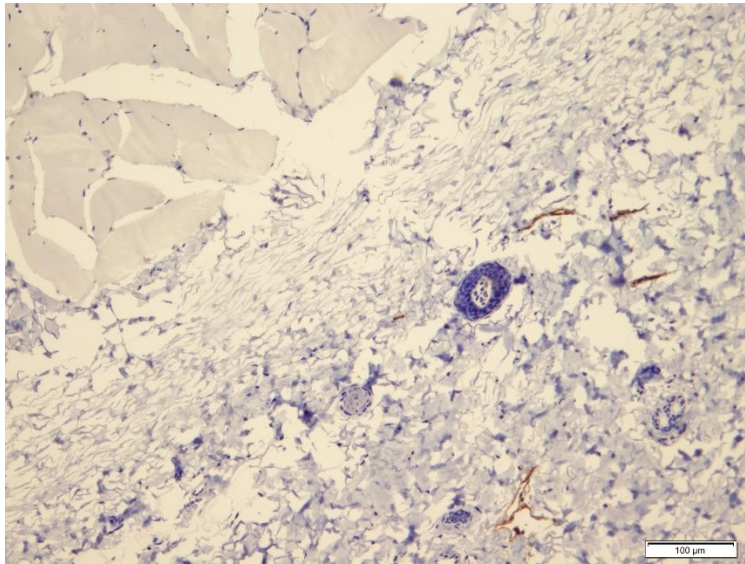


図3 ドセタキセル注入ラット下肢全周・水平断パラフィン切片の podoplanin 免疫染色像。真皮内に podoplanin 陽性リンパ管(茶色)が同定できた。ヘマトキシリンによる対比染色を実施(未発表)。

ドセタキセル注入によるリンパ浮腫の誘導は、下肢切断-動静脈再吻合によるリンパ浮腫誘導の手法に比べて極めて簡便な操作ではある。しかし、再現性を有した形で、続発性リンパ浮腫状態をラットに誘導するには投与量、投与方法等の条件検討がさらに必要であると考えられた。podoplanin抗体によるリンパ管内皮細胞の免疫組織化学染色は、組織切片上で続発性リンパ浮腫状態を定量的に同定し、その病態を組織レベルで定量的に評価できる優れた方法であることが確認できた。

<引用文献>

Kumiko Matsumoto, **Jun Kosaka**, Hiroo Suami and Yoshihiro Kimata. (2018). Enhancement of lymphatic vessels in the superficial layer in a rat model of a lymphedematous response. *Plastic and Reconstructive Surgery-Global Open* **6**, e1770, doi: 10.1097/GOX.0000000000001770

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaya Ishii, Kyutaro Kawagishi, Shogo Hayashi, Shinnosuke Yamada, Hirotaka Yoshioka, Yoshiharu Matsuno, Yasutake Mori, Jun Kosaka	4. 巻 43
2. 論文標題 A bilateral third head of the gastrocnemius which is morphologically similar to the plantaris.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical & Radiologic Anatomy	6. 最初と最後の頁 1095-1098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00276-020-02670-w	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 Satoshi Shibuta, Tomotaka Morita, Jun Kosaka	4. 巻 17(8)
2. 論文標題 Effect of preconditioning on propofol-induced neurotoxicity during the developmental period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273219	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 Takaya Ishii, Kyutaro Kawagishi, Shogo Hayashi, Shinnosuke Yamada, Hirotaka Yoshioka, Yoshiharu Matsuno, Yasutake Mori, Jun Kosaka	4. 巻 245
2. 論文標題 A novel categorization of the muscular branches of the tibial nerve within the popliteal fossa.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Anatomy	6. 最初と最後の頁 151997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aanat.2022.151997	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小阪 淳、洞口 哲、石井 貴弥
2. 発表標題 動物モデルを用いたリンパ浮腫発症-治癒過程のリンパ管動態の組織化学的解析
3. 学会等名 第10回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井 貴弥、川岸 久太郎、林 省吾、山田 晋之介、吉岡 広陽、松野 義晴、森 泰丈、小阪 淳
2. 発表標題 ヒト膝窩部における脛骨神経の筋枝分布
3. 学会等名 第11回・国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小阪 淳、洞口 哲
2. 発表標題 続発性リンパ浮腫発症に関わる浅層リンパ管網のリモデリング
3. 学会等名 第11回・国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小阪 淳、森田 知孝
2. 発表標題 iPS由来中枢神経細胞に対する麻酔薬の効果
3. 学会等名 第13回・国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際医療福祉大学・医学部・教室紹介（解剖学教室・業績） https://narita.iuhw.ac.jp/labo-kaibou/result.html 国際医療福祉大学・医学部・教室紹介（解剖学教室・教室紹介・研究についてResearch） https://narita.iuhw.ac.jp/labo-kaibou/

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

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