

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12593

研究課題名（和文）リンパ浮腫による脂肪組織の肥大化および線維化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of adipose tissue hypertrophy and fibrosis in lymphedema

研究代表者

菅原 路子 (Sugawara, Michiko)

千葉大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30323041

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）：リンパ浮腫において、脂肪組織を構成する脂肪細胞の肥大化および線維化がおこると考えられるものの、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、脂肪酸が脂肪細胞の脂肪蓄積およびコラーゲン分泌に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。その結果、脂肪酸の高濃度化は脂肪蓄積量の増加および脂肪滴の肥大化を引き起こし、リンパ浮腫による脂肪組織の肥大化を促進する可能性が示された。また、脂肪酸の高濃度化はコラーゲン量の増加を引き起こし、脂肪細胞へ分化中の前駆脂肪細胞のコラーゲン構造を変化させることで、脂肪組織の線維化を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫は、リンパ節切除を伴う婦人科がん手術後の患者に多く発症し、ひとたび発症すると完治しない。そのため、がんサバイバーのQOL向上には、リンパ浮腫治療法の確立が必須である。本研究では、皮膚下の脂肪組織を構成する脂肪細胞において、脂肪酸が肥大化および線維化メカニズムにおよぼす影響を明らかにした。この結果は、リンパ浮腫患部にみられるむくみや線維化に対する治療法の確立にあたり重要な知見であり、リンパ浮腫治療法確立の観点から本研究成果の学術的意義および社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In lymphedema, the mechanisms underlying the hypertrophy and fibrosis of adipocytes, which constitute the adipose tissue, remain unclear. Therefore, in this study, we attempted to elucidate the effects of fatty acids on adipocyte lipid accumulation and collagen secretion. As a result, high concentrations of fatty acids were found to induce increased lipid accumulation and enlarged lipid droplets, potentially promoting the hypertrophy of adipose tissue in lymphedema. Furthermore, elevated levels of fatty acids were shown to increase collagen production and alter the collagen structure of preadipocytes, suggesting a potential role in promoting fibrosis in adipose tissue.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：リンパ浮腫 脂肪細胞 肥大化 脂肪滴 線維化

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は、皮下組織へのリンパ液貯留により四肢に強いむくみをきたす疾患であり(図1)、高膠質浸透圧のアルブミンが皮下に滞留することを特徴とする。リンパ節切除を伴う婦人科がん手術後の患者に多く発症し、ひとたび発症すると完治しない。そのため、がんを克服したがんサバイバーのQOL向上には、リンパ浮腫治療法の確立が必須である。現在は、マッサージにより圧力を負荷し、鬱滞したリンパ液を排出するドレナージを行うことにより、リンパ浮腫の悪化を防ぐことが一般的に行われているものの、本手法は対症療法にすぎない。現時点において、リンパ浮腫の病態メカニズムは未知であり、基礎的研究から治療法確立まで全く不十分である。

これまでリンパ浮腫患者の皮下脂肪組織に関する数少ない研究の一つとして、電子顕微鏡観察結果が報告されている。そこで申請者は事前実験として、株化線維芽細胞 3T3-L1 を分化誘導させて得られた脂肪細胞を用い、リンパ浮腫患者における細胞外化学環境を模した高脂肪酸含有環境において、脂肪細胞が貯蓄する脂肪滴の大きさを計測した。その結果、コントロールと比較し脂肪滴の大きさが増大し、かつ分散が大きいくことを明らかにした。これは、脂肪組織増大が、リンパ浮腫特有の細胞外化学環境によって細胞レベルで生じたことに伴うことを示唆する。また一般に脂肪細胞は、マクロファージと共存することによりコラーゲンを活発に分泌することから、脂肪細胞とマクロファージの共存が組織の繊維化に影響を及ぼすことが予想される。さらに、細胞外基質の力学特性が、脂肪細胞のサイトカイン分泌量に影響を及ぼすことが報告されていること、および前述の組織の肥大化・繊維化はすなわち細胞外力学特性を変化させる要因であることから、リンパ浮腫特有の細胞外力学環境が脂肪細胞に及ぼす影響を考慮することも重要である。以上を鑑みると、リンパ浮腫病態メカニズムの解明のためには、リンパ浮腫特有の細胞外化学環境および力学環境を考慮し、それらの要因を複合的に考えることが重要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、リンパ浮腫に特有の細胞外化学環境および力学環境を複合的に考慮し、リンパ浮腫病態メカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、株化線維芽細胞 3T3-L1 を分化させた脂肪細胞細胞を用いた。分化誘導前の 3T3-L1 細胞および分化誘導後の脂肪細胞を図1に示す。細胞に対して脂肪酸のみ、および脂肪酸とアルブミンを同時添加した実験を実施した。また Control として、それらを添加しない実験を同時並行して行った。

肥大化に関する実験では、脂肪蓄積量を計測するにあたり、Oil red を用いて脂肪滴を染色後、染色液を抽出し、その吸光度を計測した。また、Nile red を用いて脂肪滴を蛍光染色し、共焦点顕微鏡にて脂肪滴の観察を行い、脂肪滴の大きさから脂肪蓄積量を予測することも並行して実施した。Oil red および Nile red による脂肪滴染色の一例を図2に示す。

一方線維化に関する実験では、コラーゲン量を計測するにあたり、Sirius red を用いて染色後、吸光度、染色液を抽出し、その吸光度を計測した。また、1型コラーゲンを免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。

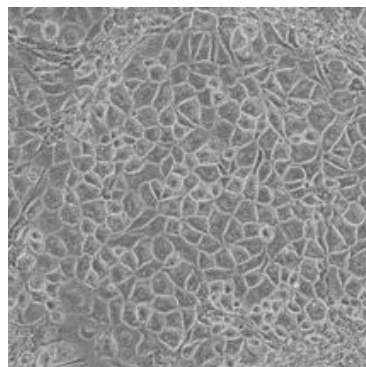


図1 分化誘導後の脂肪細胞の一例。

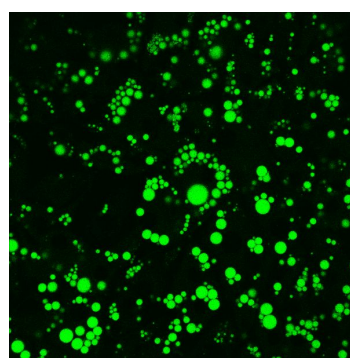
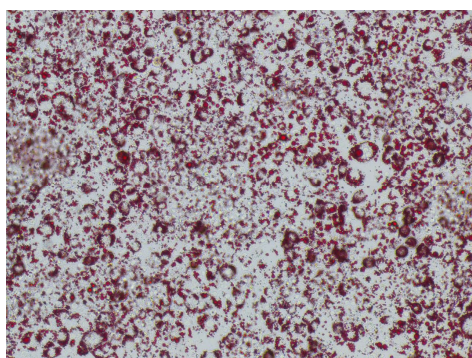


図2 脂肪滴染色の一例。Oil red により染色した図(左)および Nile red により染色し蛍光観察した図(右)を示す。

#### 4. 研究成果

オレイン酸またはパルミチン酸をアルブミンとともに脂肪細胞に添加した。その際の脂肪蓄積量の計測結果を、図3に示す。なお、脂肪蓄積量は、脂肪酸を添加しないコントロールの吸光度を1として正規化した。図3より、オレイン酸およびパルミチン酸の添加は、脂肪細胞の脂肪蓄積量を増加させることが示された。また、オレイン酸を添加した条件とパルミチン酸を添加した条件の間に差は見られなかった。図4に、オレイン酸またはパルミチン酸をアルブミンとともに添加した脂肪細胞における、脂肪滴半径の頻度分布を示す。図より、小さな脂肪滴ほど頻度が高く、半径が大きい脂肪滴ほど頻度が減少する傾向がみられた。また、オレイン酸とパルミチン酸の間で、脂肪滴半径に与える影響に関する差異は見られなかった。

以上の結果から、オレイン酸およびパルミチン酸の高濃度化は、脂肪細胞の脂肪蓄積量を増加させることが示された。これにより、リンパ浮腫による脂肪組織中の脂肪酸の高濃度化が脂肪組織の肥大化を促進することが示唆された。

次に、オレイン酸およびパルミチン酸をアルブミンとともに添加した脂肪細胞における、コラーゲン量の計測結果を、図5に示す。なお、脂肪酸を添加しないコントロールの吸光度を1として正規化した。計測の結果、コラーゲン量は、オレイン酸の添加により10%増加し、パルミチン酸の添加により25%減少した。免疫蛍光染色しコラーゲン分布を観察したところ、脂肪細胞に分化途中の前駆脂肪細胞において、細胞底面にスポット状に局在したコラーゲンが、脂肪酸の高濃度化に伴い細胞間を繋ぐような繊維状のコラーゲン構造に変化する様子が観察された。これは、脂肪組織の線維化において見られるコラーゲン構造と類似していた。また、脂肪細胞に対する脂肪酸の高濃度化においては、高濃度化の前後でコラーゲン構造はいずれも繊維状であった(図6)。

以上の結果から、オレイン酸の高濃度は脂肪細胞のコラーゲン量を増加させることが示された。また、コラーゲン構造は前駆脂肪細胞に対するオレイン酸の高濃度化において構造変化が確認され、脂肪組織の線維化に關与する可能性が示された。

ここまでの結果はすべてガラス基板にて実施したが、脂肪組織の線維化に伴う細胞外力学環境の変化が予想されることから、同様の実験を硬さが異なるポリアクリルアミド弾性基板上において実施することを試みた。弾性基板において脂肪細胞を培養するにあたり、ガラス基板上と同様とならず、脂肪滴の大きさのみ検討を行った。その結果、弾性基板の硬さにより脂肪滴の大きさが変化する結果が得られた。これは、細胞内における脂肪滴の形成および融合が変化した結果であると予想された。したがって、線維化に伴う脂肪組織の硬化は、脂肪細胞の脂肪蓄積機能に影響をおよぼすと考えられた。

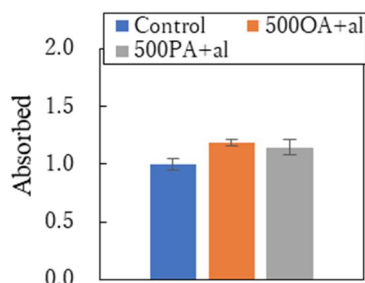


図3 脂肪蓄積量の計測結果。

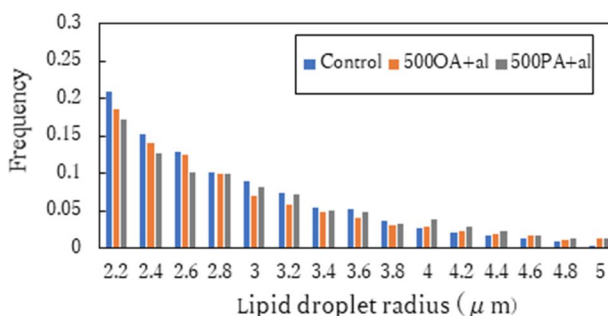


図4 脂肪滴半径の計測結果。

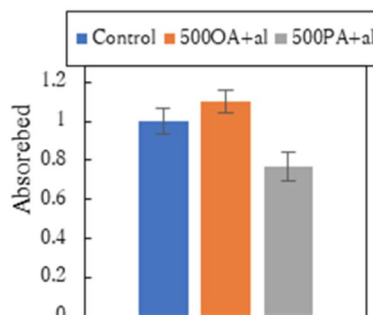


図5 コラーゲン量の計測結果。

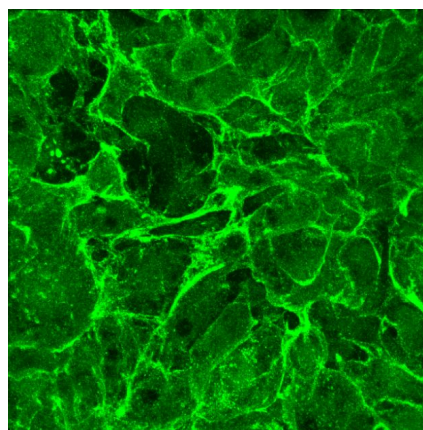


図6 高濃度オレイン酸環境下におけるコラーゲン分布。

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 渡辺駿也, 武居昌宏, 秋田新介, 菅原路子
2. 発表標題 オレイン酸が脂肪細胞の脂肪蓄積およびコラーゲン分泌に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千馬明沙, 伊藤涉, 菅原路子
2. 発表標題 培養基の弾性率が脂肪細胞の脂肪滴の大きさに及ぼす影響
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原路子
2. 発表標題 細胞外力学環境と細胞機能に関する研究
3. 学会等名 医工若手研究者交流会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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