

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591639

研究課題名（和文） 低出力衝撃波照射によるリンパ管再生の誘導とリンパ浮腫治療への応用

研究課題名（英文） Amelioration of lymphedema by extracorporeal low-energy shock wave therapy through promotion of lymphangiogenesis

研究代表者

白澤 文吾 (SHIRASAWA BUNGO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80444719

研究成果の概要（和文）：リンパ浮腫は外科的手術等のリンパ管の機械的な切断が原因として起こる後遺症であるが、根本的な治療法がないのが現状である。本研究では、リンパ管再生の誘導を治療戦略として、低出力衝撃波照射によるリンパ浮腫治療法の開発を目指した。研究成果として、リンパ浮腫に対する衝撃波照射によってリンパ管再生因子が誘導され、リンパ管が形成されることで、浮腫症状が軽減されることが分かった。以上より、本治療法の有用性と安全性が示された。

研究成果の概要（英文）：Lymphedema is a common complication after surgical and radiation therapy for cancer, and therapeutic options for lymphedema are currently limited and largely ineffective. The purpose of this study was to develop the method of reducing lymphedema by extracorporeal low-energy shock wave, based on the induction of lymphangiogenesis. This study shows that extracorporeal low-energy shock wave therapy ameliorates lymphedema by enhancing the expression of VEGF-C and increasing the formation of lymphatic vessels, suggesting that extracorporeal shock wave therapy may be an effective and safe method for lymphedema.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：リンパ浮腫、リンパ管新生、衝撃波、VEGF-C、VEGFR3、リンパ管、再生医療

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫（二次性リンパ浮腫）は乳癌、子宮癌、前立腺癌等の外科治療、放射線療法の後遺症として高頻度（5%～30%）に発症する。その原因は手術時のリンパ節郭清などで切断されたリンパ管が再生されないことに

よって、組織液が皮下組織に貯留するためと考えられる。治療法としては、バンデージや弾性ストッキングの着用、外部からのリンパ排液のマッサージ（リンパドレナージ）などの対症治療しかなく、有効な根治的治療法は確立されていない。

我々はこれまでに血管再生に関する研究を行ってきた経緯から、リンパ管再生がリンパ浮腫の新たな治療戦略となり得ると考えた。近年のリンパ管研究の進歩によって、リンパ管の発生や再生の分子機序が解明されつつある。発生学的には、静脈内皮細胞からの発芽形成を契機としてリンパ管が形成され、それ以降は血管新生と同様な過程（吻合・拡大・伸長）でリンパ管が発達することが知られている (*Nature* 2005; 438: 946)。また、分子生物学的にはリンパ管再生因子 (vascular endothelial growth factor-C; VEGF-C、angiopoietin-2、hepatocyte growth factor; HGF) がリンパ管内皮細胞に作用すると既存のリンパ管の増殖、遊走、管腔形成が促され、リンパ管再生が誘導されることが分かっていた (*Cardiovasc Res* 2005; 65: 550)。さらに、VEGF-C や HGF をリンパ浮腫モデルに投与するとリンパ管再生を誘導し、症状を軽減できることが証明されている (*J Clin Invest* 2003; 111: 717, *Circulation* 2006; 114: 1177)。こうした点から、リンパ管は血管と同様に再生可能であり、リンパ管再生を誘導できればリンパ浮腫治療法の開発も実現可能と考えられる。

最近、虚血心筋に対する低出力衝撃波治療が血管内皮細胞からの血管再生因子 VEGF-A の産生を促進し、虚血組織血流の改善効果を示すことが報告された (*Circulation* 2004; 110: 3055)。さらに、虚血性疾患患者に対する臨床試験でも低出力衝撃波治療による血管再生治療の有用性と安全性が示されている (*Coron Artery Dis* 2006; 17: 63)。リンパ管再生と血管新生のプロセスが類似する点を考えると、衝撃波の出力条件（照射強度）を変えることでリンパ管再生因子の産生を促進し、リンパ管再生を誘導することが可能と思われる。さらに、低出力衝撃波照射によるリンパ管再生がリンパ浮腫治療法の開発に応用できる可能性も十分にあると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ウサギの耳リンパ浮腫モデルを用いて、低出力衝撃波の照射（低出力衝撃波治療）によって、リンパ管再生が誘導され、リンパ浮腫の症状が改善されるか否かについて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウサギ耳リンパ浮腫モデルの作製

ウサギ（日本白色種）を用いて、耳リンパ浮腫モデルを作製した。耳の先端に 0.2 ml の 1% Evans blue を皮下注射した。Evans blue で標識したリンパ管を顕微鏡下で耳の根部より結紮することで、モデルを作製した。

(2) 体外衝撃波治療

リンパ浮腫モデルに対して低出力衝撃波照射を行った。モデル作製 2 週間後から 4 週間、耳の根部を中心に衝撃波照射 (0.09 mJ/mm²、200 発、週 3 回) を行い、治療群とした。なお、衝撃波照射を行わない非治療群を対照群とした。

(3) 耳の厚さの測定

治療効果を評価するために、衝撃波照射後から毎週、耳の厚さをノギスにて測定した。

(4) 耳組織の採取

治療 4 週間にウサギを犠牲死させ、組織学および生化学的解析を行うために、耳組織を採取した。

(5) 組織学的評価

耳組織標本を用いて、HE 染色を行い、組織学的評価を行った。また、リンパ管の形成を評価するために、リンパ管内皮細胞のマーカーである vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) 抗体を用いた免疫染色を行った。

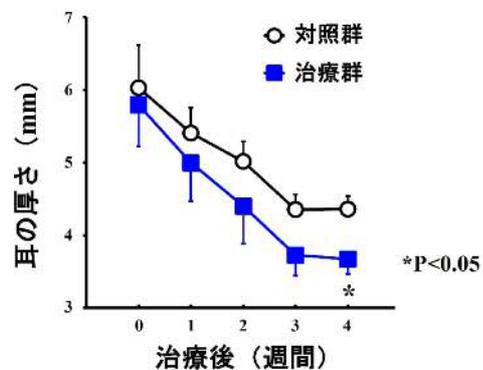
(6) 生化学的評価

耳組織のホモジネイトを作製後、リンパ管産生因子 VEGF-C、およびリンパ管マーカー VEGFR3 の発現について、Western blot 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) 衝撃波照射によるリンパ浮腫に対する治療効果

対照群と比較して、衝撃波照射を行った治療群では、耳の厚さがより薄くなっていくことが分かった。また、治療 4 週目には治療群の耳の厚さは対照群よりも有意に薄くなっていた (3.8 ± 0.3 mm vs. 4.5 ± 0.2 mm, $P < 0.05$, 下図)。



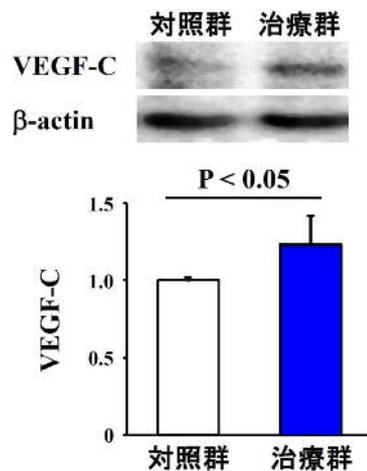
HE 染色によって組織学的解析を行った結

果、対照群と比較して治療群では表皮の肥厚が抑制され、真皮層への炎症性細胞の浸潤も減少していた。

以上の結果から、衝撃波照射によって浮腫症状が改善されることが示された。また、その一方で衝撃波照射に伴う副作用は認められなかった。

(2) 衝撃波照射が VEGF-C の発現に及ぼす影響

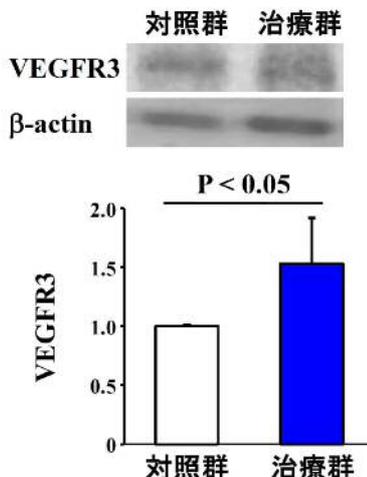
Western blot 法にて生化学的解析を行った結果、リンパ管再生因子 VEGF-C のタンパク質の発現量が治療群で、対照群よりも有意に上昇していることが分かった ($P < 0.05$, 下図)。



以上の結果から、衝撃波照射によってリンパ管再生因子が誘導されることが示された。

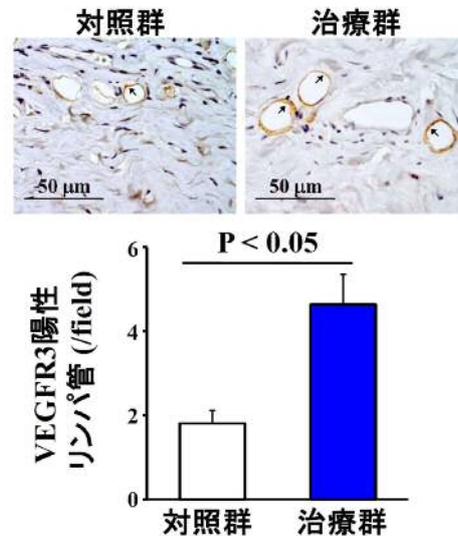
(3) 衝撃波照射によるリンパ管の形成

リンパ管内皮細胞マーカーである VEGFR3 の Western blot を行った結果、対照群よりも治療群にてタンパク量発現が有意に上昇していた ($P < 0.05$, 下図)。



VEGFR3 免疫染色を行った結果、治療群では VEGFR3 陽性リンパ管数が対照群と比較

して有意に増加することが分かった ($4.6 \pm 0.7/\text{field}$ vs. $1.8 \pm 0.3/\text{field}$, $P < 0.05$, 下図)。



以上の結果から、衝撃波照射によってリンパ管形成が促進されることが示唆された。

(4) 結語

本研究によって、リンパ浮腫に対する低出力衝撃波治療の有効性および安全性が示された。衝撃波照射によってリンパ管再生因子 VEGF-C の産生が上昇し、リンパ管形成が促進されることで、浮腫症状の改善に寄与しているものと推察される。

低出力衝撃波治療は低侵襲で繰り返し実施できる利点があり、外来での治療も可能である。また、虚血性心疾患患者に対する血管再生治療として既に臨床試験がなされ、有効性と安全性が証明されている。従って、リンパ浮腫に対する衝撃波照射は今後の臨床応用が期待できる治療法であり、本研究の臨床的な意義は非常に高いと思われる。さらに、リンパ浮腫に対する低出力衝撃波治療が確立できれば、根治的治療を待ち望んでいるリンパ浮腫患者に希望をもたらす画期的治療法となることが期待される。

本研究では大動物を用いてリンパ浮腫に対する衝撃波治療の有用性を実証したが、より最適な衝撃波の照射条件 (照射強度、照射回数、照射期間・間隔など) についてさらなる検証が必要と考えられる。その後の臨床試験への移行が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kubo M, Li TS, Kamota T, Ohshima M,

Shirasawa B, Hamano K.

Extracorporeal shock wave therapy ameliorates secondary lymphedema by promoting lymphangiogenesis.

J Vasc Surg. 2010; 52(2): 429-434.

(査読有)

〔学会発表〕(計1件)

- ①久保正幸, 李 桃生, 鴨田隆弘, 大島真子,
白澤文吾, 濱野公一
低出力衝撃波照射によるリンパ管再生に
基づいたリンパ浮腫治療法の開発
第10回日本再生医療学会総会
2011.3.2 東京・京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白澤 文吾 (SHIRASAWA BUNGO)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80444719

(2) 研究分担者

濱野 公一 (HAMANO KIMIKAZU)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60263787

久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60420519