

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16924

研究課題名（和文）リンパ管壁のペリサイトに着目した重度リンパ浮腫発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of severe lymphedema focusing on pericytes in lymphatic vessel walls

研究代表者

林田 健志（Hayashida, Kenji）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：50599933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ浮腫モデルマウスにおいて、マクロファージや骨髄由来細胞もリンパ浮腫部への集積を確認した。さらに、顔面の主に眼瞼部周囲に生じる慢性的な浮腫は、やはりリンパ浮腫が関連している疾患の可能性についても邦文報告を行った。研究期間に行ったペリサイトの観察では、やはりリンパ浮腫に関連すると思われたが、筋線維芽細胞等への分化は明らかでなく、ペリサイト消失モデルマウスの作成も成功しなかった。そのため、今後はペリサイト消失モデルマウスの作成に関する詳細な検討を含め、更なる情報収集と、脳血管ペリサイトや網膜周囲ペリサイトの研究を行っている専門家との意見交換が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療後にリンパ浮腫を発症する患者は、本邦を含む全世界で増加傾向にある。しかしながら、その発症機序は未解明な部分が多く、線維化の著しい重度リンパ浮腫患者への根治的治療法は確立されていない。近年、皮膚・皮下組織の線維化には、筋線維芽細胞に分化するペリサイトの関与が推察されている。本研究ではリンパ管壁に局在するペリサイトが、リンパ浮腫状態で生じる活性化・分化の機序を、脂肪由来幹細胞を使ったサイトカイン産生プロファイルの観点から徹底解明した。ペリサイトが筋線維芽細胞へと分化する際のバランス制御をターゲットとした、重度リンパ浮腫に対する新たな選択的予防法・治療法の研究基盤の一部を確立した。

研究成果の概要（英文）：In lymphedema model mice, macrophages and bone marrow-derived cells were also confirmed to accumulate in lymphedema. Furthermore, we reported that chronic edema occurring on the face, mainly around the eyelids, may also be a disease related to lymphedema. Observations of pericytes during the study period suggested that they were related to lymphedema, but differentiation into myofibroblasts and other cells was not clear, and creation of a pericyte-free model mouse was unsuccessful. Therefore, further information gathering, including detailed consideration of the creation of a pericyte-free model mouse, and exchange of opinions with experts studying cerebrovascular pericytes and retinal pericytes are considered necessary in the future.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：創傷治癒 リンパ浮腫 ペリサイト モデルマウス 脂肪由来幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床では、リンパ浮腫に対する手術法や、圧迫療法を主体とした保存的治療法が次々と開発され、従来の治療で効果不十分であった患者に応用されている。しかしながら、皮膚・皮下組織の高度な線維化を伴う重度リンパ浮腫に対しては、その悪化機序は解明されておらず、効果的な治療法もない。申請者らは脂肪由来幹細胞 (Adipose-Derived Stem Cells: ADSCs) を用いたリンパ浮腫の治療法を報告したが、その抗線維化機序は明らかとならなかった。

リンパ浮腫の「線維化制御」という新しい基礎研究分野に参加し、抗線維化療法が確立できれば、重度リンパ浮腫を治療する新たな選択枝となることが期待される。組織常在性の血管周囲細胞 (ペリサイト) は、局所の圧力や体液の変化を物理刺激として感知し、活性化され、形質転換してコラーゲンを産生する筋線維芽細胞へと分化して、線維化を起こす。ペリサイトは臓器特異的な性質を持っているため、リンパ管壁に局在するペリサイトの機能解析ができれば、リンパ管内圧の上昇によっておこる組織の線維化機序を解明できると考えた。

2. 研究の目的

リンパ浮腫モデルマウスを用いて、リンパ浮腫の進行期における、ペリサイトの関与を徹底的に検証する。具体的には、ペリサイトを介した線維化の進行過程において、TGF- β 、MMP、IL-6 などの炎症性サイトカインの変化を観察し、膠原線維の増減を定量化して、リンパ浮腫の重症化機序を解明する。さらに ADSCs の投与によってペリサイトの脱活性化が可能かどうかを検証し、臨床におけるリンパ浮腫の線維化予防・治療策につなげることが目的である。

3. 研究の方法

リンパ浮腫状態における線維化の機序解析は、これまで野生型マウスやマウスの尾を利用したモデル動物が用いられてきた (Tammela T, et al. Nat Med, 2007., Onishi T, et al. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2014)。しかし、これらのモデルでは成熟したリンパ管網がすでに形成されており、ヒトのガン手術後のリンパ浮腫病態を反映していない。本研究では、野生型マウスやヌードマウスを用いず、われわれが手術により作成・開発した下肢リンパ浮腫モデルマウス (Yoshida S, et al. Regen Med, 2015., Hayashida K, et al. Plast Reconstr Surg, 2017) を用いる。これによって、ヒトのガン手術後の病態に、より近づいた実験が行える。本研究では、リンパ浮腫状態がペリサイトに影響を与えるサイトカインの変化と、ADSCs の投与によるリンパ浮腫部位の抗線維化機序について検討する。そのために、

Step 1: ペリサイト消失モデルマウスの作成

Step 2: ペリサイト消失リンパ浮腫モデルマウスとリンパ浮腫モデルマウスとの比較

Step 3: ADSCs 投与によるペリサイトの機能変化 (脱活性化ができるか) 検討

の3つの Step を主軸として研究を進める。

申請者らが過去に報告した方法で、リンパ管・リンパ節の除去焼却を行い、下肢リンパ浮腫状態を作成する。ペリサイト消失群と対照群において、浮腫を作成してから2週後、4週後、8週後にプレチスモメーターを用いた浮腫の定量化と組織採取を行い、癒痕形成に関与するサイトカイン (TGF- β 、MMP、IL-6、bFGF など) の比較と変化をリアルタイム RT-PCR や ELISA、フローサイトメトリーを用いて検証する。同時に、組織学的変化をマクロファージ、 α -SMA + 筋線維芽細胞、膠原線維の免疫染色とともに行う。また、高精細 3D 画像解析ソフトウェアにより、コラーゲン量を定量化し、グループ別に比較検討する。培養した ADSCs を下肢リンパ浮腫モデルマウスの浮腫部の皮下に注入し、ペリサイトの脱活性化の有無を確認する。

4. 研究成果

電子顕微鏡によるリンパ管内腔の観察を行い、リンパ浮腫モデルマウスにおいて、Spherical cells がリンパ管壁に付着しているのを確認した (Hayashida K, et al. Lymphatics, 2023)。この観察の中でも、従来から言われていたスプルーティングによるリンパ管新生は認められず、以前報告した、嵌入式のリンパ管新生が発生していた。その関与に、ペリサイトが重要な役割を果たしていることが推察された。

また、臨床面において、顔面の眼瞼周囲浮腫もリンパ浮腫が関連していることを報告した (須田翔太他、形成外科、2023)。この症例群においては、慢性化したリンパ浮腫状態が、線維化を引き起こし、可逆性と不可逆性の2パターンのリンパ浮腫状態となることで、治療可能な浮腫と不可能な浮腫の2郡に分けられることを病理結果を用いて報告した。

また、2022年に Ogino R, Hayashida K (Corresponding Author), et al. Emerging anti-inflammatory pharmacotherapy and cell-based therapy for lymphedema. Int J Mol

Sci.9;23(14):7614, 2022.を報告し、その中で、リンパ浮腫の病態に関連する、薬剤や、細胞移植治療で、現在行われている治療法をまとめた。その論文は、Top viewed article IJMS 2022 に選出された。

リンパ浮腫が進行した場合に生じる線維化に関連する、ファイibroプラストの間葉系幹細胞への機能について調べたところ、下記のように様々なグロースファクターやカスケードが報告されており、複雑な病態解明についてさらに研究の続行が必要だと思われる。

Experiment situation	Biological signals	Effects
Human bone marrow-derived MSC-CM in wound healing in DM	EGF, bFGF	Increase proliferation, cell viability and migration of fibroblast
EGF transferred umbilical cord blood derived MSC	β -catenin, N-cadherin, cofilin, ezrin, phospho-MAPK/CDK substrate, phospho-Arg-(Ser)-X-Tyr/Phe-X-pSer motif	Increase cell adhesion, dynamic effects, migration, and proliferation of fibroblast
Adipose derived MSC in wound healing	TGF- β	Increase collagen production and inhibit fibroblast proliferation to avoid excessive fibrogenesis.
Human ES cell-derived endothelial precursor cells in cutaneous excisional wound models	EGF, bFGF	Increase proliferation and migration of fibroblast.
Human amniotic mesenchymal stem cells	LOXL2	LOXL2 significantly enhanced in vitro keratinocyte migration and differentiation.
Human umbilical cord Wharton's jelly derived MSC in DM	cytokeratin, involucrin, filaggrin, ICAM-1, TIMP-1, and VEGF-A	Increase the number of invaded cells, cell viability, total collagen, elastin, and fibronectin levels.

Tanaka K, et a. Biomedicines, 2022 より引用

二次性リンパ浮腫は、がん治療におけるリンパ節郭清または放射線療法 (RT) の一般的な合併症である。圧迫スリーブ療法、完全除痛理学療法、手術療法などの従来の治療法は浮腫を減少させるが、リンパ浮腫の病態生理を調節できないため、根治的ではない。最近の進歩により、CD4+ T 細胞の活性化と蓄積がリンパ浮腫の発症における鍵であることが明らかになった。この病態生理学に基づき、リンパ浮腫に対する薬物療法 (タクロリムス、抗 IL-4/IL-13 抗体、フィンゴリモード) および細胞療法の有効性が動物モデルやパイロット試験で証明されている。また、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem/stromal cell : MSC) は、パイロット試験において重篤な副作用がなく、長期的に症状を改善し浮腫量を減少させることから、細胞を用いたリンパ浮腫治療の候補として注目されている。線維芽細胞による創傷治癒の促進や適切なコラーゲン産生は、リンパ浮腫の線維化を防ぐために非常に重要なプロセスである。MSC は、倫理的な問題が少ないこと、生体からの採取が比較的容易であること、自己由来の MSC を用いた場合の免疫拒絶反応のリスクが小さいこと、人工多能性幹細胞や ES 細胞に比べて腫瘍形成のリスクが小さいことなどから、古くから再生医療に用いられてきた。MSC と線維芽細胞は密接に関連しているため、これらのメカニズムの根本的解明は、特に形成外科や皮膚科における再生医療に大きく貢献すると考えられる。しかし、MSC が皮膚の線維芽細胞に作用するのか、あるいは創傷治癒に影響するのかについては、懐疑的な報告もある。慢性創傷の治癒に幹細胞を用いることの意義が議論され、そのメカニズムや病態生理についての理解が重要である。

今後、リンパ浮腫の治療は、リンパ管の再生と、線維化や炎症細胞の浸潤の抑制、CD4+細胞バランスの調整など、浮腫部位の微小環境の改善に焦点を当てるべきである。抗炎症薬物療法と細胞ベース療法は、微小環境と免疫応答を改善するリンパ浮腫の新しい根本的治療戦略の開発に光を当てるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tanaka Kotaro, Ogino Ryohei, Yamakawa Sho, Suda Shota, Hayashida Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Role and Function of Mesenchymal Stem Cells on Fibroblast in Cutaneous Wound Healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10061391	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 Ogino Ryohei, Yokooji Tomoharu, Hayashida Maiko, Suda Shota, Yamakawa Sho, Hayashida Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Emerging Anti-Inflammatory Pharmacotherapy and Cell-Based Therapy for Lymphedema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7614 ~ 7614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147614	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 Hayashida Kenji, Suda Shota, Yamakawa Sho	4. 巻 3
2. 論文標題 Surgical Management for Foul-Smelling Wounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Surgical Wound Care	6. 最初と最後の頁 149 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.36748/ijswc.3.4_149	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 Yamakawa Sho, Hayashida Kenji	4. 巻 1
2. 論文標題 Scrotal Reconstruction Using a Free Ulnar Forearm Flap: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 26 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.53045/jprs.2021-0011	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 Yamakawa Sho, Hayashida Kenji	4. 巻 21
2. 論文標題 Safety and efficacy of secondary mandibular reconstruction using a free osteo-cutaneous fibula flap after segmental mandibular resection: a retrospective case?control study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Surgery	6. 最初と最後の頁 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12893-021-01194-3	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 Matsuda Yuhei, Okui Tatsuo, Karino Masaaki, Aoi Noriaki, Okuma Satoe, Hayashida Kenji, Sakamoto Tatsunori, Kanno Takahiro	4. 巻 121
2. 論文標題 Postoperative oral dysfunction following oral cancer resection and reconstruction: A preliminary cross-sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 105468 ~ 105468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2021.105468	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 Matsuda Yuhei, Kumakura Isami, Okui Tatsuo, Karino Masaaki, Aoi Noriaki, Okuma Satoe, Takeda Mayu, Hayashida Kenji, Sakamoto Tatsunori, Kanno Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a Subjective Symptom Rating Scale for Postoperative Oral Dysfunction in Patients with Oral Cancer: Reliability and Validity of the Postoperative Oral Dysfunction Scale-10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2061 ~ 2061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11112061	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 Yamakawa S, Fujioka M, Fukui K, Matsuo H, Noguchi M, Kugiyama T, Sugimi S, Fukuda H, Hayashida K	4. 巻 33
2. 論文標題 Fournier's gangrene with subcutaneous emphysema of the thigh caused by air inflow associated with a rectovaginal fistula: a case report of pseudo-gas gangrene.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 WOUNDS	6. 最初と最後の頁 10 ~ 13
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashida Kenji, Yamakawa Sho	4. 巻 9
2. 論文標題 Topical odour management in burn patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Burns & Trauma	6. 最初と最後の頁 tkab025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/burnst/tkab025	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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hayashida K
2. 発表標題 Advances in growth factors for wound healing.
3. 学会等名 23rd Annual Conference of Indian Society of Wound Management (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashida K
2. 発表標題 Topical odor management of infected wounds.
3. 学会等名 23rd Annual Conference of Indian Society of Wound Management (招待講演) (国際学会)
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

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