

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25年5月29日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22591992

研究課題名（和文） リンパ管内皮細胞の分子生物学的解析～プロスタノイドレセプターを巡って～

研究課題名（英文） Analysis of prostanoid receptors on lymphatic vessels

研究代表者

野村 正 (Nomura Tadashi)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：30529566

研究成果の概要（和文）：

リンパ管-静脈吻合術中に切除されたリンパ管断端を対象とした。通常、血管の収縮・拡張機能に関与しているとされるプロスタノイドレセプター5種類（TP, IP, EP2, EP4, DP1）に対する抗体を用いてこれらの発現を組織学的に検討した。いずれのプロスタノイドレセプターもリンパ管における発現が認められた。発現様式は動脈と相同であった。プロスタノイドレセプターはこれまでに9種類が同定されており、そのうち今回検討を行った5種類は正常血管の収縮・拡張に関与しているとされている。リンパ管でも同様にこれらの発現が認められた。また動脈と同様の発現形態をしめした事より、プロスタノイドはリンパ管運動に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the expression of 5 kinds of prostanoid receptors on lymphatic vessel, TP, IP, EP2, EP4, DP1, which are related to the contraction and extension of vasoactivity. All of these receptors were expressed on lymphatic vessel and patterns of expression were compatible to arteries. Our result suggest that prostanoid may relate to the activity of lymphatic vessels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：マイクロサージェリー学、リンパ管

1. 研究開始当初の背景

外科技術の発展に伴い、積極的ながん治療が行われるようになったが、同時にがん切除後のリンパ浮腫は近年増加しており、また、患者に著しいQOLの低下を強いる。われわれ再建外科はスーパーマイクロサージェリーの技術を応用し、リンパ管-静脈吻合術やリン

パ管移植術などを外科的治療として行っている。しかしながら、効果には個人差が大きく、ほとんど効果が見られない場合も少なくない。

リンパ管の流れを作り出すものとして、現在も様々な議論の余地はあるが、①自発的なリンパ管の収縮・拡張、②間質と静脈との間

の圧較差、③筋の運動や動脈の拍動によるポンプ作用、などが挙げられ、これらの複合によって成り立っていると考えられている。リンパ浮腫治療として、現在、特に②に対応するために弾性ストッキングなどで加圧する保存的治療が行われており、近年ではそれに加えて外科的治療として、スーパーマイクロサージャリーの技術の応用としてリンパ管-静脈吻合術が行われるようになってきた。これは上記の①-③のいずれに対応するものではなく、新しく流路を作り出すものである。リンパ管壁はその性質上、間質との間に水分のみならずタンパク質などの交通があり、②により作り出された圧較差如何によっては漏出することがある。これに対して血管壁は非常に強固な組織となっており、漏出はリンパ管に比して極めて少なく、このことを配慮するとリンパ液を静脈に流出させることは合理的といえる。

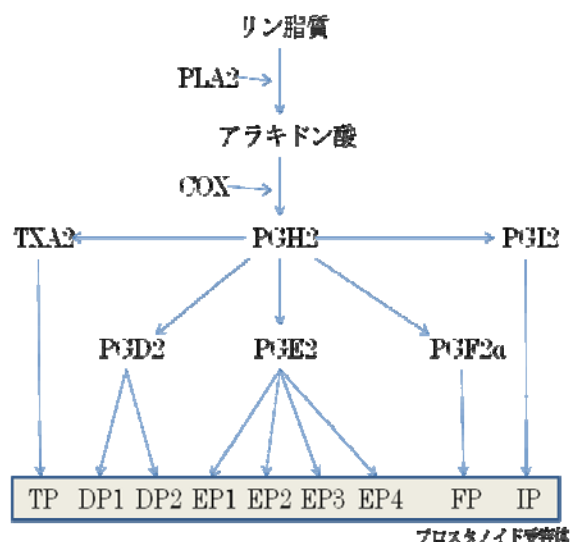
リンパ浮腫に対する積極的な内科的治療は現在のところ、選択肢として挙げられていない。投薬による治療を考える上で最も標的とする現象は上記の①となる。すなわちリンパ管の自発的な蠕動を促し、リンパ流を中心の静脈へと誘導することで浮腫の改善が行われると考える。Mizuno, Kollerらはリンパ管とプロスタノイド (PGH₂ と PGE₂)、NO との関係を示した。すなわち、PGH₂ はリンパ管の収縮作用に関与し、PGH₂ 阻害薬であるインドメタシンはその作用を減弱する。また、PGE₂ と NO は血管と同様に拡張作用に影響することが明らかとなった。これまでの研究では生理学的な現象が捉えられており、プロスタグランディン製剤によるリンパ流のコントロールも可能のように一見、考えられる。ところが一連の研究は生理学者によって行われており、臨床を視野に入れた研究ではいため、実際にはその作用機序に関しての知見は皆無に等しく、リンパ管に発現しているプロスタノイド受容体の同定すらなされていなかった。

2. 研究の目的

プロスタグランディン・トロンボキサンなどプロスタノイドに対する受容体は、生体内の様々な平滑筋に発現していることが示されている。また、プロスタノイド受容体は現在までに9種類が同定され、そのカスケードおよびその組織での生理的作用が明らかとなってきている。

リンパ浮腫に対する生理学的側面からの薬理的治療を考慮するにあたり、これらプロスタノイド受容体の発現パターンを理解することは極めて重要となる。

また、プロスタグランディンの中でも PGE₁ および PGE₂ は血管新生に関与していることが明らかとなった。PGE₂ からのシグナルはそ



の受容体を介して VEGF と共同し血管新生を行う。PGE₂ に対する受容体は EP₁、EP₂、EP₃、EP₄ の4つが同定されているが、このうち EP₃ が最も関与すると考えられている。リンパ管は形態学的にも発生学的にも血管に酷似しており、lymphangiogenesis には VEGF-D および VEGFR-3 が関与していることが明らかとなった。Lymphangiogenesis でも血管新生と同様に PGE₂-ER3 を介したシグナル伝達系が VEGF とリンクし、lymphangiogenesis を行っている可能性がある。われわれは本課題研究により、リンパ管平滑筋細胞においてプロスタノイド受容体の発現を確認したい。また、発現されている受容体の種類を特定することにより、プロスタノイドの生化学的カスケードからその生理的機能を考察し、薬理学的作用を検討したい。さらにはその薬理学的生理的作用よりリンパ浮腫に対する新しい保存的治療の開発を目指した。

3. 研究の方法

① ヒトリンパ管におけるプロスタノイド受容体の発現解析

①-1 リンパ浮腫に対するリンパ管-静脈吻合術 (以下 LVA) を行った際、患者の同意のもと、切除されるべきリンパ管を検体として採取した。またコントロールに使用するため、他の手術時において切除破棄される動脈も採取した。

①-2 検体をホルマリンで固定した後、10% スクロース PB および 20% スクロース PB に浸漬した。その後、1:2 OCT コンパウンド/20% スクロース PB に置換したのち、凍結包埋をおこなった。クライオスタットを用いて薄切し、スライドガラスに貼付した。

①-3 プロスタノイドレセプター 5 種類

(TP, IP, EP₂, EP₄, DP₁) に対する一次抗体を反応させたのち、二次抗体を反応させ、ABC法により発色させた。

- ② ラット脈管におけるワイヤーミオグラフィシステムを用いた生理機能解析
- ②-1 深麻酔下のWistarラットより腹部大動脈を採取した。これを実験を行うまでの間、リンゲル液に保存した。
- ②-2 リンゲル液をウォーターバスにより37℃に保った。1mm幅に輪切りにした動脈をワイヤーにフッキングし、牽引により1gの負荷をかけた。
- ②-3 5 μ g/ml のノルアドレナリンを添加し、収縮がほぼプラトーに達した所で、5 μ g/mlのアセチルコリンを添加した。

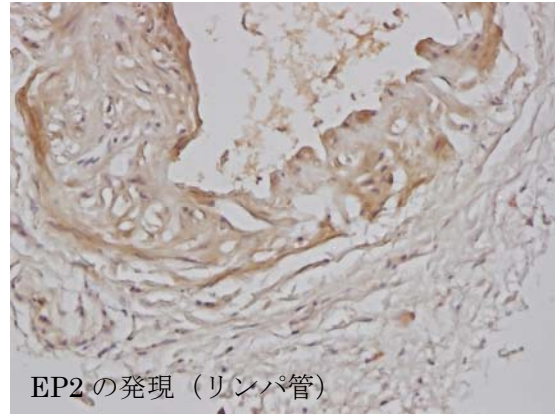
4. 研究成果

① ヒトリンパ管におけるプロスタノイド受容体の発現解析

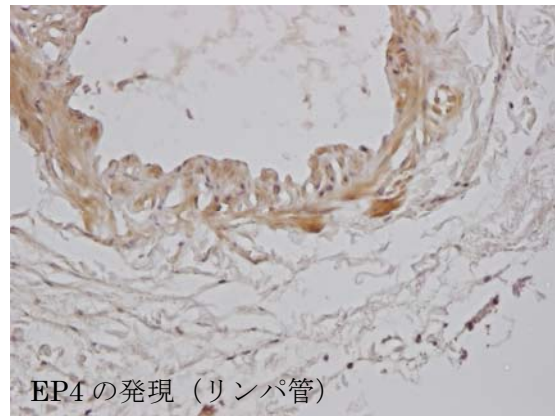
当初、検体より total RNA を採取し、それぞれの受容体に対する PCR を行い、発現の同定を試みたが、検体量が極めて少なく、total RNA の回収を行う事が出来なかったため、免疫染色のみでこれら受容体の発現解析を行う事とした。

リンパ管では、TP, IP, EP2, EP4, DP1 のいずれも平滑筋層に発現を認めた。免疫染色であるため、定量的解析は行えなかった。

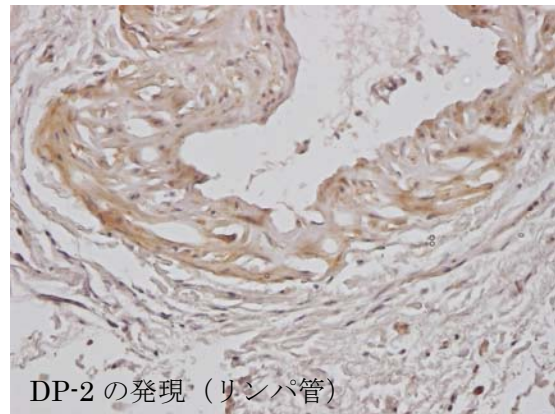
コントロールとした動脈では、同様にいずれも平滑筋層（中膜）にその発現を認めた。



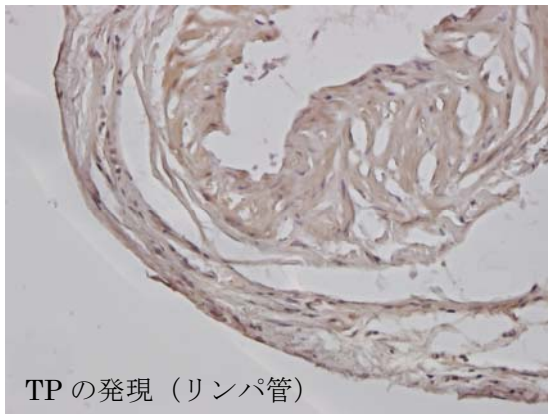
EP2 の発現 (リンパ管)



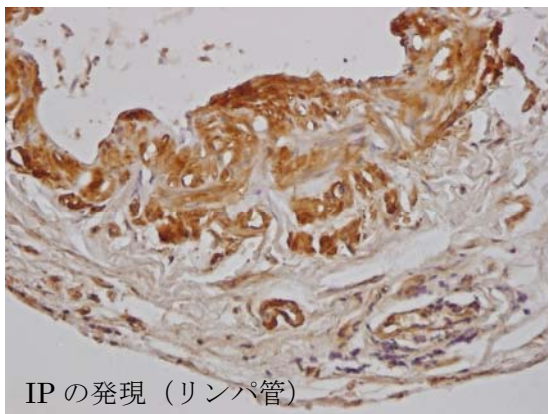
EP4 の発現 (リンパ管)



DP-2 の発現 (リンパ管)



TP の発現 (リンパ管)



IP の発現 (リンパ管)

レセプター	血管平滑筋への作用	リンパ管	動脈
TP	収縮	○ (平滑筋)	○ (平滑筋)
IP	弛緩	○ (平滑筋)	○ (平滑筋)
EP ₂	弛緩	○ (平滑筋)	○ (平滑筋)
EP ₄	弛緩	○ (平滑筋)	○ (平滑筋)
DP1	弛緩	○ (平滑筋)	○ (平滑筋)

プロスタノイドレセプターはこれまでに9種類が同定されており、そのうち今回検討を

行った5種類は正常血管の収縮・拡張に関与しているとされている。本研究により、リンパ管でも同様にこれらの発現が認められた。プロスタノイド製剤がリンパ管運動に関与することでリンパ浮腫治療への一助となる事が期待される。

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0件)

[学会発表] (計7件)

①乳び胸水に対するリポドールリンパ管造影法による治療法の検討

野村 正, 大崎 健夫, 石椋 寛芳, 寺師 浩人

第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2012.12-7-6 北九州

②リンパ浮腫の治療 簡易に良結果を得る方法 リンパ管静脈吻合手技を容易にするためのアイデアと工夫

橋川和信、野村正、寺師浩人

第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2012.12-7-6 北九州

③オルプリノン塩酸塩水和物の血管弛緩効果の検討

榊原 俊介, 橋川 和信, 寺師 浩人, 田原 真也

第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2012.12-7-6 北九州

④リンパ管におけるプロスタノイドレセプターの発現

榊原 俊介, 橋川 和信, 寺師 浩人, 田原 真也

第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2012.12-7-6 北九州

⑤マイクロサージャリーにおける抗攣縮薬の効果について

小川 晴生, 榊原 俊介, 橋川 和信, 寺師 浩人, 田原 真也

第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2012.12-7-6 北九州

⑥当院でのリンパ管奇形に対する治療効果の検討

後村 大祐、野村 正、石椋 寛芳、大崎 健夫

第55回日本形成外科学会学術総会総会 2012.4.11-13 東京

⑦リンパ浮腫患者のリンパ管組織構造の一考察

榊原 俊介, 橋川 和信, 奥村興, 寺師 浩人, 田原 真也

第38回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2011.11.10-11 新潟

⑧リンパ浮腫を伴う絞扼輪症候群における術後リンパ流の検討

後村大祐、榊原 俊介、小川 晴生、橋川 和信、寺師 浩人、田原 真也

第98回日本形成外科学会関西支部学術集会 2011.7.31 大阪

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 正 (TADASHI NOMURA)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：30529566

(2) 研究分担者

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90403237

平島 正則 (HIRASHIMA MASANORI)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40383757

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80217421

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：50444592