

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24日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659323

研究課題名（和文）リンパ管の可視化を用いたリンパ浮腫画像診断法の開発

研究課題名（英文）Development of Imaging Diagnosis for Lymphedema

研究代表者

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70126241

研究成果の概要（和文）：本研究は、リンパ管内皮を標的とした分子標的リポソーム技術を用いリポソーム内の蛍光指示薬によるリンパ管の特異的可視化を行い、これをリンパ浮腫の診断に役立てようとするものである。リンパ内皮細胞への結合、リンパ管の蛍光造影に成功したが、ラットリンパ浮腫モデルでの測定法の確立までは至らなかった。関連技術として、光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察に用いられる金コロイド内包リポソームが作製できた。

研究成果の概要（英文）：Current research aimed to establish a new active targeting liposome system for diagnosis of lymphedema, by targeting it to the lymphatic endothelial cell markers. Specific binding of the molecular targeting liposome to cultured lymphatic endothelial cells *in vitro* and visualization of lymphatic vessels in normal mice were demonstrated. However, we could not establish the measuring system in rat lymphedema model. As for its related technique, we could develop a new liposome encapsulated with colloidal gold which enables both light- and electron- microscopic analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

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：リンパ管、リンパ浮腫、リポソーム、生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

循環系の中でも血管系は、造影剤を確実に注入することが可能なため血管造影が可能となっているが、毛細リンパ管は内皮細胞と断続的基底膜から構成され、その特異性に乏しくリンパ管を可視化することは容易ではな

かった。リンパ管の可視化の方法としては：

- 1) インドシアニンググリーン (ICG), FITC-dextran などの非特異的蛍光指示薬
- 2) ヒアルロン酸結合 NIR-783 色素：リンパ管内皮細胞にヒアルロン酸レセプターが

存在することによる特異性を利用したもの。

我々は平成 18 年度より、アクティブターゲット用糖鎖修飾リポソーム、ペプチド修飾リポソームをつくり、分子標的リポソームのフィージビリティを確立しつつある。特に、糖鎖修飾リポソームは白血球に擬態（ミミック）させて炎症部位に集積することを報告している(Hirai et al., 2007)。本課題ではそれらの分子ターゲットリポソーム作製の技術をリンパ管蛍光イメージングに応用させるものである。

2. 研究の目的

リンパ浮腫は、リンパ管損傷あるいは先天的リンパ管形成不全により生じる慢性疾患であり、その病態はほとんど解明されていない。罹患患者は全世界で 3 億人ともいわれており、特に乳がんや子宮がん切除後の四肢リンパ浮腫が大きな問題となっている。リンパ浮腫の確定診断にはリンパ管造影やリンパ管シンチグラフィが行われるが、感染や肺塞栓などの合併症をきたす可能性があり、より低侵襲の検査が求められている。しかし手術適応の判断基準となるリンパ管の客観的機能診断法は確立されていない。

本研究の目的は、我々が開発してきた分子標的リポソーム技術により、リンパ管内皮をターゲットとしたリンパ管の特異的可視化であり、これをリンパ浮腫の診断に役立てようとするものである。

3. 研究の方法

(1) LYVE-1 抗体修飾蛍光リポソームの作製:

①抗 LYVE-1 モノクローナルあるいはポリクローナル抗体を用いて、リポソームの標識を行う。リポソームに内包させる蛍光物質としては、Cy5.5 を使用する。

②作製したリポソームと LYVE-1 抗原との結

合性を確認する。

(2) LYVE-1 抗体修飾蛍光リポソームを用いたリンパ管造影:正常マウス尾あるいは足の末梢に皮下注射し、リンパ管の流れを *in vivo* レーザ走査型顕微鏡を用いてモニターする。

(3) リンパ浮腫モデルでのリンパ管造影:マウスリンパ浮腫モデルを作成する。これを用いて、尾の末梢に抗 LYVE-1 抗体標識蛍光リポソームを皮下注射して、蛍光モニターし蛍光強度変化、持続性などを健常コントロールと比較する。

4. 研究成果

(1). LYVE-1抗体修飾蛍光リポソームの作製

蛍光色素(Alexa488)を内包した抗LYVE1モノクローナル抗体のリポソームを作製した。比較対照用には未修飾リポソーム、isotype matched IgG修飾リポソームを同時に作製した。サイズ、表面ラベル量、内包蛍光量の同等の標品が作製された。なお、抗体は市販品から *in vivo* 用には anti-mouse LYVE1 (MAB2125, R&D社)、*in vitro* 用には anti-human LYVE1 (MAB20891, R&D社) を使用した。

(2). LYVE-1抗体修飾蛍光リポソームを用いたリンパ管造影

まず、抗ヒトLYVE-1抗体リポソームが対照リポソームと比べて特異的にヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞(HMVEC-dLy)に結合することを培養細胞実験により確認した。続いて、抗マウスLYVE-1抗体リポソームと対照リポソームをマウス足裏の末梢に皮下注射し(30uL)、リンパ管の流れ方を経時的に落射蛍光実体顕微鏡(OLYMPUS SZX12)で観察した。既存のリンパ管造影剤としてはFITCラベル

dextran (MW=2000K) を使用した。リポソーム 3 者の中で、抗ヒトLYVE-1抗体リポソームのみ

が中枢側の大腿部リンパ管を造影することができた。またそのintensityはFITCラベルdextranよりも優れていた。しかしながら、このマクロの観察において、in vivoレーザ走査型顕微鏡IV100(OLYMPUS)を用いて光強度の一定時間内の変化をモニターすることはできなかった。リンパ管の拍動性・強度がモニターできるか検証点が残った。

(3). リンパ浮腫モデルの作製を次のように行った。

① ラット単径部を切開し、色素で染まったリンパ管およびリンパ節を手術用顕微鏡下に完全に切除する。

② 同部に放射線照射を行う。

前年度と同様の方法で、抗ヒトLYVE-1抗体リポソームが対照リポソームを作製し、続いて抗マウスLYVE-1抗体リポソームと対照リポソームをラット足裏の末梢に皮下注射し(30uL)、リンパ管の流れ方を経時的に落射蛍光実体顕微鏡(OLYMPUS SZX12)で観察した。既存のリンパ管造影剤としてはFITCラベルdextran(MW=2000K)を使用した。しかしながら、このマクロの観察において、リンパ浮腫モデルにおいては、既存FITCラベルdextranとの統計学的有意差は認められなかった。我々の有する落射蛍光実体顕微鏡では、in vivoレーザ走査型顕微鏡IV100(OLYMPUS)を用いて光強度の一定時間内の変化をモニターすることはできなかった。in vivoレーザ走査型顕微鏡IV100(OLYMPUS)などによるリンパ管の拍動性・強度をモニターして比較する必要性が、このリポソーム技術の優位性を示すための将来の課題である。

4. 関連技術の開発として、電顕レベルでの観察用に、金コロイドを内包するリポソームを開発し論文化した。昨年度開発できた金コロイド内包化リポソームを用いて、電顕レベルでin vivoの組織中リポソーム局在を観察

できた。また、パラフィン切片において、銀増感することにより金コロイドシグナルを光学顕微鏡レベルで観察する手法を確立した。この検出技術を、我々がすでに確立しているレクチンと糖鎖間の特異的な相互認識能を利用した炎症標的指向性リポソームに使用し、そのフィージビリティを確認した。

抗コラーゲン抗体(CAIA)惹起関節炎モデルマウスに高密度金コロイド内包SLXリポソーム(K1)あるいは対照の表面未修飾リポソーム(K0)を尾静脈より投与した。直後(5分)、6時間後、24時間後に膝の炎症部組織を摘出し、パラフィン切片を作成した。過型電子顕微鏡(日立H-7650)観察と銀増感後の光学顕微鏡観察等を行った。

銀増感後の光学顕微鏡観察により、6時間後の炎症部位でK1のほうがK0に比べ有意な数のシグナルを認めた。また、銀増感シグナルは免疫染色でE-セレクトイン陽性の血管周囲に多く認められた。透過型電子顕微鏡による観察で、金コロイドはマクロファージあるいは滑膜表層細胞様の細胞に取り込まれている様子が観察された。

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 6件)

① Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M, Kusachi S, Ninomiya Y, Oohashi T. Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brain stem and cerebellum. J Comp Neurol. 査読有 2011 doi: 10.1002/cne.23009.

② Minematsu H, Otani T, Oohashi T, Hirai M, Oie K, Igarashi K, Ohtsuka A. Development of an active targeting

liposome encapsulated with high-density colloidal gold for transmission electron microscopy. J Electron Microsc (Tokyo). 査読有 2011;60(1):95-99.

③ Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N, Naomoto Y, Ninomiya Y. Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. Matrix Biol. 査読有 2011 30(1):3-8.

④ 大橋俊孝、西田圭一郎 関節軟骨のバイオイメージング Clinical Calcium 査読無、2011, 21(6), 100-106

⑤ Bekku Y, Vargová L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M, Ohtsuka A, Fässler R, Ninomiya Y, Syková E, Oohashi T. Bral1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. J Neurosci. 査読有 2010 Feb 24;30(8):3113-23.

⑥ 大橋俊孝 軟骨組織のバイオイメージング 臨床整形外科 査読無 2010, 45(5), 454-457

[学会発表] (計 4 件)

- ① 前原亜美ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎症部位への集積、第25回日本軟骨代謝学会、2012年3月9日-10日、名古屋
- ② 古谷満寿美ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎症部位への集積、第43回日本結合組織学会、第58回マトリックス研究会、2011年6月10日-11日、大分

③ 大橋俊孝ら、炎症標的化リポソームのリウマチ関節炎症部位への集積、病理学会カンファレンス—電子顕微鏡観察—、2010年8月6日-7日、岡山

④ 松本衣未ら、シアリルルイスX糖鎖結合リポソームのリウマチ関節炎症部位への集積についての電子顕微鏡的検討、第51回日本生化学会 中国・四国支部例会、2010年5月14日-15日、山口

[その他]

ホームページ等
<http://mbb-okayama.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70126241

(2) 研究分担者

大橋 俊孝 (OOHASHI TOSHITAKA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：50194262

(3) 連携研究者