

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16986

研究課題名（和文）低酸素応答システムを利用したリンパ節移植～新たなリンパ流誘導による浮腫治療

研究課題名（英文）Lymph node transplantation combining Hypoxia-inducible factors-new treatment of lymphedema by inducing of lymphatic flow

研究代表者

草島 英梨香（Kusajima, Erika）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：30813547

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）：膝窩及び鼠径リンパ節を摘出し、リンパ流を破綻させたマウスへリンパ節移植を行った。移植部位、移植時血管柄の有無、HIF-1 の投与有無を問わず移植リンパ節へのリンパ流の誘導を認めなかった。リンパ鬱滞パターンの変化有無の検討で、移植リンパ節へのリンパ流誘導を認める個体がでてきた。リンパ節を移植しなくてもリンパ流が再疎通し、正常リンパ節が存在した部位で蛍光造影剤が鬱滞していた。該部位で、色素法を用いて直視下で再疎通を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異所性リンパ節移植は解剖学的に通常リンパ節が存在しない部位へ血管柄付き遊離組織として移植することで、間質液を静脈系へ戻す生理的な治療方法である。異所へのリンパ節へのリンパ流の開通を安定して誘導することは困難であったが、一部の症例で異所性リンパ節へのリンパ流の再疎通を確認することが出来た。また、リンパ節摘出後の部位で、蛍光造影剤の鬱滞を呈している症例で、色素法による直視下でのリンパ流の再疎通を確認することが出来た。異所性、遊離リンパ節へ安定してリンパ流を誘導する条件に対するさらなる研究が必要とされる。

研究成果の概要（英文）：Lymph node transplantation was performed in mice with disrupted normal lymph flow. No induction of lymph flow to the transplanted lymph node was observed regardless of the site of transplantation, the presence or absence of a vascular pattern at the time of transplantation or the administration of HIF-1. Induction of lymph flow to the transplanted lymph node was observed with or without changes in the lymphatic congestion pattern. Recanalisation of lymphatic flow was observed without transplantation of lymph nodes.

研究分野：リンパ流

キーワード：リンパ浮腫 低酸素応答因子 HIF-1 リンパ管新生 リンパ節移植術

1．研究開始当初の背景

続発性リンパ浮腫は癌や感染症などによりリンパ組織が破綻された患者に生じる病態であり、破綻された領域周辺及び遠位の循環、免疫機能に変化を及ぼす。循環機能の観点から、リンパ液の貯留により四肢は浮腫に至り整容・機能ともに低下し患者のQoLも低下する。免疫機能の観点から、監視機能がなくなることにより軟部組織感染や癌の発症や転移も起こりやすくなる。

リンパ浮腫の非生理的な外科的治療は、Debulking Surgeryがあり、生理的な外科的治療としてリンパ管静脈吻合や異所性リンパ節移植術などがある。異所性リンパ節移植は、通常はリンパ節が存在しない場所へリンパ節を移植することで間質液を静脈系へ戻す治療であり、異所性に移植されたリンパ節によるリンパ流の再建の観点では考察されていない。

リンフォソームはリンパ節が担当するリンパ液がドレナージされる領域であり、破綻されたリンフォソームのリンパ流をリンフォソームが正常な領域へリンパ節を移植することにより誘導することができたらリンパ浮腫の治療へ応用できる可能性があると考えた。

2．研究の目的

上記の背景をもとに、本研究ではマウスの膝窩・鼠径リンパ節を摘出しドレナージリンパ節が破綻されたモデルへリンパ節を移植することで、移植されたリンパ節を介して正常リンフォソームまでリンパ流を誘導することを目的とする。

3．研究の方法

手技開始直前にリンパ節及びリンパ管同定のため5 μ Lのパテントブルーを皮下注入した。膝窩リンパ節の同定のために足底へ、鼠径リンパ節の同定の為に陰茎基部に皮下注入した。手技終了2～3週後、5 μ Lのインドシアニンググリーン(ICG)を足底に皮下注入し赤外線観察カメラで観察した。

(1)遊離リンパ節移植と移植部位の検討

膝窩リンパ節摘出モデルでのリンパ節移植の検証

20～25gの雄C57BL/6Nマウスの両側膝窩リンパ節を摘出、摘出した膝窩リンパ節を鼠径、下腹部へ移植した。

膝窩・鼠径リンパ節摘出モデルでのリンパ節移植の検証

20～25gの雄C57BL/6Nマウスの両側膝窩・鼠径リンパ節を摘出、摘出したリンパ節無作為に選択し下腹部、鼠径、腹部正中、後肢へ移植した。

(2)血管柄付きリンパ節移植と移植部位の検討

20～25gの雄C57BL/6Nマウスの両側膝窩リンパ節を摘出し、Ishikawaらの報告(Ishikawa, et al, *Microsurgery*, 2019)を参考に鼠径リンパ節を血管柄を付けて挙上、マウスの後肢、腹部に移植した。

(3)リンパ管結紮モデルでのリンパ流変化の検討

20～25gの雄C57BL/6Nマウスの膝窩・鼠径リンパ節の輸入・輸出リンパ管を11-0ナイロンで結紮した。

(4)HIF-1 投与による移植リンパ節へのリンパ流再構築有無の検討

(1) -、(2)で使った手技を用いてマウスモデルを作成した。Hoshinoらの報告(Hoshino, et al, *Lymphat Res Biol*, 2023)を参考にRoxadustat 25mg/kgを腹腔内投与した。投与は術当日を含めて2日に1回、2週間投与とした。

(5)リンパ節移植によるリンパ鬱滞パターンの変化の検討

20～25gの雄C57BL/6Nマウスの左膝窩・鼠径リンパ節を摘出、膝窩リンパ節-鼠径リンパ節をつなげた仮想の線の間腹部腹側へ、摘出したリンパ節を移植した。移植群と非移植群を作成し、Narushimaらの報告(Narushima, et al, *J Reconstr Microsurg*, 2016)を参考にリンパの鬱滞パターンを解析した。

4．研究の成果

(1)遊離リンパ節移植と移植部位の検討

膝窩リンパ節摘出モデルでのリンパ節移植の検証

既報と同様に鼠径リンパ節へのリンパ流が活性化されたが、移植したリンパ節へのリンパ流の誘導は認めなかった。(図1)

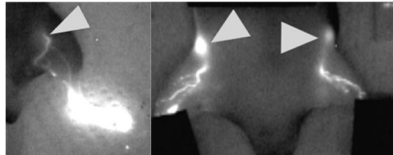


図 1-a	図 1-b

図 1-a 鼠径へ移植後 14 日目 (arrowhead: 鼠径リンパ節)

図 1-b 下腹部へ移植後 19 日目 (arrowhead: 鼠径リンパ節)

膝窩・鼠径リンパ節摘出モデルでのリンパ節移植の検証

鼠径への ICG のプーリングや後肢のリンパ流の鬱滞パターンを確認できたが、移植リンパ節へのリンパ流の誘導は認めなかった。(図2)

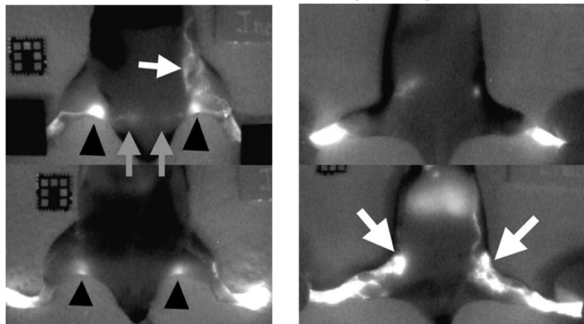


図 2-a 上	図 2-a 上
図 2-b 下	図 2-b 下

図 2-a 下腹部へ移植後 25 日目 上: 背側、下: 腹側 (White arrow: Splash pattern のリンパ鬱滞、Gray arrow: 仙骨リンパ節、Black Arrowhead: 膝窩プーリング)

図 2-b 左後肢へ移植後 13 日目 上: 背側、下: 腹側 (White arrow: Splash pattern のリンパ鬱滞)

(2)血管柄付きリンパ節移植と移植部位の検討

鼠径への ICG のプーリング、後肢のリンパ流の鬱滞パターンを確認できたが、移植リンパ節へのリンパ流の誘導は認めなかった。(図3)

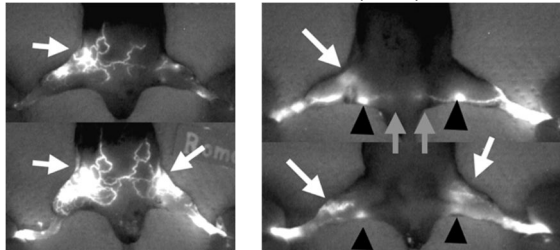


図 3-a 上	図 3-b 上
図 3-a 下	図 3-b 下

図 3-a 後肢に移植後 22 日目 上: 背側、下: 腹側 (White arrow: Splash pattern のリンパ鬱滞)

図 3-b 鼠径及び下腹部へ移植後 22 日目 上: 背側、下: 腹側 (White arrow: Diffuse pattern のリンパ鬱滞、Gray arrow: 仙骨リンパ節、Black Arrowhead: 膝窩プーリング)

(3)リンパ管結紮モデルでのリンパ流変化の検討

リンパ流の鬱滞を確認できた。リンパ管を結紮したにもかかわらず、膝窩リンパ節へのリンパ流が観察された。(図4)

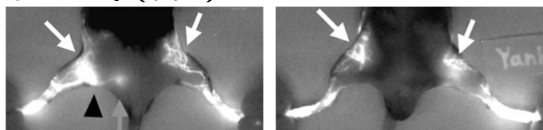


図 4-a	図 4-b

図4 リンパ管結紮後 22 日目 上：背側、下：腹側 (White arrow: Splash pattern のリンパ鬱滞、Gray arrow: 仙骨リンパ節、Black Arrowhead: 膝窩プーリング)

(4) HIF-1 投与による移植リンパ節へのリンパ流再構築有無の検討

後肢のリンパ流の鬱滞パターンを確認できたが、移植リンパ節へのリンパ流の誘導は認めなかった。

(図5)

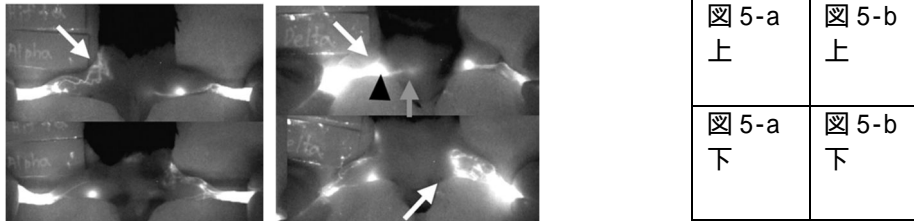


図 5-a 鼠径下腹部へ遊離移植後・HIF-1 2 週間投与、23 日目 上：背側、下：腹側 (White arrow: Splash pattern のリンパ鬱滞)

図 5-b 左後肢へ血管柄付きリンパ節移植後 23 日目 上：背側、下：腹側 (White arrow: Splash pattern のリンパ鬱滞、Gray arrow: 仙骨リンパ節、Black Arrowhead: 膝窩プーリング)

(5) リンパ節移植によるリンパ鬱滞パターンの変化の検討

摘出群では 37.5%で膝窩へプーリング、62.5%で鼠径へプーリングした。リンパ節移植群では 50%で膝窩へプーリング、25%で鼠径で Linear pattern で鬱滞、25%で移植リンパ節への造影を認めた。(図6)

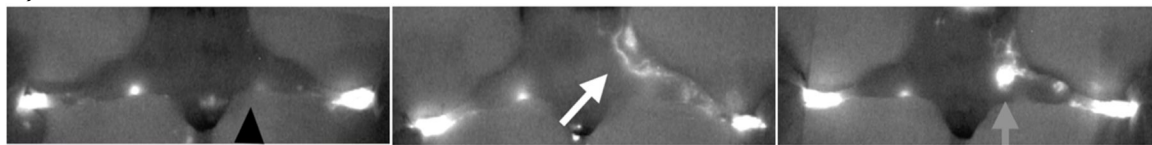


図6 リンパ節移植群の術後 21 日目の代表例、背側

左：膝窩プーリング群 (Black Arrowhead: 膝窩プーリング)

中：鼠径でのリンパ鬱滞群 (White arrow: Linear pattern のリンパ鬱滞)

右：移植リンパ節へ造影群 (Gray arrow: 移植リンパ節)

5. 考察

移植リンパ節は再生医療の観点から、リンパ管新生に関わる成長因子を発生し、細胞を提供し、Scaffold 構造としての役割を果たすと考えられた。実際、我々の選考研究で、もともとリンパ節が存在していた場所へ移植した場合、色素や ICG で造影され機能していることが確認された (Maeda, et al, *Lymphat Res Biol*, 2018)。実験(1)~(4)に際し、遊離、有茎、HIF-1 の投与有無などにかかわらず移植リンパ節へのリンパ流の誘導は認めなかった。遊離リンパ節移植の場合、移植先への生着有無がリンパ節の機能の確立に際し重要と考え、観察後無作為に遊離リンパ節移植後の個体を選択し移植リンパ節を観察した。観察した全ての移植リンパ節で肉眼的に血流が再開して生着している所見が得られた。(図7) PDE カメラで体表からの造影が確認できなかった個体でも、実際移植リンパ節を摘出して観察すると造影効果が確認でき、HE 染色でもリンパ節としての構造が保たれていることが確認できた (図8)。

実験(5)では一部ではあるが、遊離移植したリンパ節へのリンパ流誘導効果を認めた。リンパ流の誘導を認めたリンパ節のドナーは鼠径リンパ節であった。鼠径リンパ節が膝窩リンパ節より直径が大きい場合が多数の個体で観察された。鼠径リンパ節と膝窩リンパ節の機能上の強度が異なり、鼠径リンパ節がリンパ管再疎通における再生能力が高いことが示唆される。

膝窩リンパ節は直径 2~3mm でありリンパ節摘出後、その分の間隔が生じるが、軟部組織の柔軟性により輸入・輸出リンパ管同士の Imbibition が発生する可能性がある。多くの個体で膝窩リンパ節摘出後であるにもかかわらず、膝窩への ICG のプーリング、また仙骨リンパ節までのリンパ管造影を認めた。観察終了後の個体の足底にパテントブルーを皮下注射し観察した (図9)。

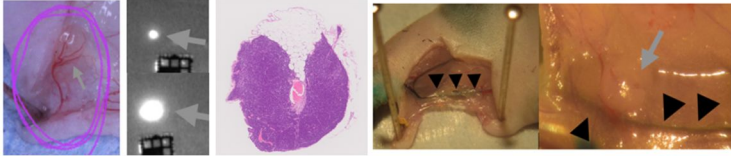


図 7	図 8-a	図 8-c	図 9-a	図 9-c
	図 8-b			

図 7 遊離移植後のリンパ節、リンパ節周囲の血管が観察できる。(Gray arrow : 移植リンパ節と再開した栄養血管)

図 8 a : 遊離リンパ節移植後 b : 有茎リンパ節移植後 c : 左の HE 染色

図 9 a : 膝窩リンパ節摘出後リンパ管の再疎通 b : 近接部位に移植リンパ節が存在するにもかかわらずリンパ管のみの再疎通を認める (Gray arrow : 遊離移植リンパ節、Black Arrowhead : パテントブルーで色素造影されたリンパ管)

条件が揃えば、移植されたリンパ節へのリンパ流の誘導も可能であることが示唆された。

6. 参考文献

- 1 Ishikawa, K. *et al.* Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: A preliminary study. *Microsurgery* **39**, 247-54, (2019).
- 2 Hoshino, Y. *et al.* Therapeutic potential of the prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat in a mouse hindlimb lymphedema model. *Lymphat Res Biol*, (2023).
- 3 Narushima, M. *et al.* Indocyanine Green Lymphography Findings in Limb Lymphedema. *J Reconstr Microsurg* **32**, 72-9, (2016).
- 4 Maeda, T. *et al.* Lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow by nonvascularized lymph node transplantation: real-time fluorescence imaging using indocyanine green and fluorescein isothiocyanate-dextran. *Lymphat Res Biol* **16**, 165-73, (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徐東経、草島英梨香
2. 発表標題 異所性リンパ節移植によるリンパ流誘導への試み
3. 学会等名 第46回北大形成外科アカデミー
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
---------	---------