

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号	24303
研究種目	若手研究 (B)
研究期間	2011~2012
課題番号	23791286
研究課題名 (和文)	自己末梢血由来培養マクロファージ移植による術後リンパ浮腫治療に関する基礎研究
研究課題名 (英文)	Basic study of autologous transplantation of ex vivo expanding macrophages to secondary lymphedema
研究代表者	
	浅井 純 (ASAI JUN)
	京都市立医科大学 医学研究科 助教
	研究者番号 : 50438222

研究成果の概要 (和文) : マウスを用いた術後リンパ浮腫モデルの確立を目標の一つとしていたが、期間内の確立は困難であった。その理由として、①ヒトと異なりパテントブルーなどの色素によるリンパ管の肉眼的描出が難しいこと、②ヒトと異なりマウスは4足歩行のため足趾一本あたりの加重が少ないこと、③マウスは個体が非常に小さいためにリンパ節の同定自体が難しいこと、などが考えられた。そこでリンパ管機能障害の他のモデルとして確立されている糖尿病性皮膚潰瘍モデルマウスを用いてマクロファージによるリンパ管新生促進について検討したところ、スタチン投与により、マクロファージを介したリンパ管新生が促進されることが確認された。

研究成果の概要 (英文) : We tried to establish postoperative lymphedema mouse model but it was failed within the period. The possible reasons are ①difficulty of visualizing lymphatics by blue dye. ②edema was not significantly observed because of quaruped walking. ③difficulty of the detection of lymph nodes. We next used diabetic wound model which is one of the established model of impaired lymphatic function. We focused on statin which can be possible stimulator of macrophages. Statin application significantly improve lymphangiogenesis in diabetic wound model via promoting macrophage function.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード : 皮膚病態学、マクロファージ、リンパ管、血管、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

術後リンパ浮腫は主に乳癌や皮膚がんに対する所属リンパ節廓清により引き起こされる。リンパ管新生を刺激する増殖因子は FGF, HGF, VEGF-C などいくつも報告があり、その

臨床応用が期待されるが、そのほとんどがリンパ管だけでなくがん細胞にとっても増殖促進に働く可能性があるため、実際の臨床応用は難しい。そのため、新規のリンパ管新生を促進させる治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

我々は、単球・マクロファージ系の細胞がリンパ管内皮細胞へと分化することを過去に発見したが、これら単球・マクロファージ系細胞を用いることで新しい術後リンパ浮腫の治療が可能となるのではないかと考えた。そこで本研究の目的は、術後リンパ浮腫治療の基礎研究として、a. マウス術後リンパ浮腫モデルを作成すること、b. 自己末梢血由来のマクロファージを *ex vivo* で刺激し、リンパ管内皮細胞への分化を誘導すること、そして c. 作成したリンパ浮腫モデルを用いて培養マクロファージ移植を行いその治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

①マウス術後リンパ浮腫モデルの作成

Balb/c マウスに対して、ペントバルビタールによる麻酔を施した後、後肢足底にエバンスブルーを皮内注射し、リンパ管を青染させる。皮膚に切開を加え、青染したリンパ管、リンパ節を切除した後、皮膚を再度縫合した。摘出するリンパ節としては膝窩リンパ節のみ、鼠径リンパ節のみ、膝窩リンパ節と鼠径リンパ節の両方の3群とする。

また、上記リンパ浮腫モデルの作成が困難であった場合、リンパ管新生作用を検討する代替法として、db/db マウス背部皮膚全層欠損創を作成し使用する。

②マクロファージの脈管形成能の検討

Balb/c マウス腹腔内より採取したマクロファージをマトリジェル上で培養し、脈管形成能について種々の刺激を加えて検討する。また、培養したマクロファージに刺激を加え、リンパ管形成に必要な因子の一つである VEGF-R 3 の発現を real time PCR にて検討する。

③培養マクロファージ移植

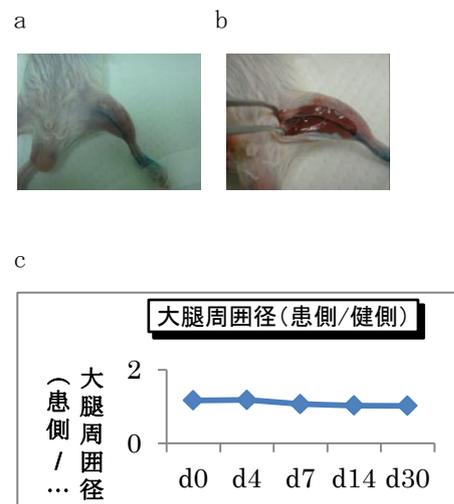
b で得られた結果を元に、リンパ管内皮細胞への分化を促進する刺激を培養マクロファージに与え、a で作成した動物モデルに移植し、その有効性を評価する。

4. 研究成果

①Balb/c マウス後肢足底皮内に 0.25%エバンスブルー溶液を注射したところ、速やかに大腿部まで青色線状が描出された。(図1 a) 皮膚切開を加えて観察したところ、青色に染まった束状物は血管であった。(図1 b) (*エバンスブルー以外に、墨汁やパテントブルーといった色素を用いて同様の実験を行ったが、リンパ管のみを染色することはできなかった。)

そこで青染はしなかったが鼠径のリンパ節を含む結合組織を一回に摘除(鼠径リンパ節郭清術)し、その後の大腿の周囲径を経時的に測定し、健側(皮切のみ加えた群)における大腿周囲径との比を計測したところ、郭清群と皮切のみの群との間に統計学的な有意差は得られなかった。(図1 c)

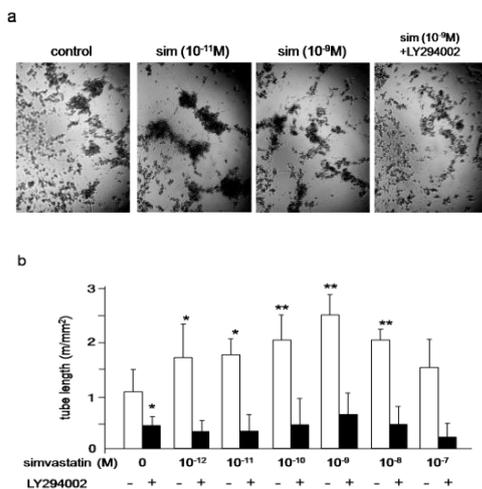
図1



②培養マクロファージにおける脈管形成能を促進させる可能性のある因子として、まずスタチン製剤(シンバスタチン)について検討した。

脈管形成能試験 (図 2 ab) : マトリジェル上で培養したマウス腹腔内由来マクロファージにシンバスタチンによる刺激を加えたところ、シンバスタチン刺激によりマクロファージの脈管形成が有意に促進された。また、その作用は PI3 キナーゼ阻害薬である LY294002 により阻害され、PI3 キナーゼを介した経路であることが示唆された。

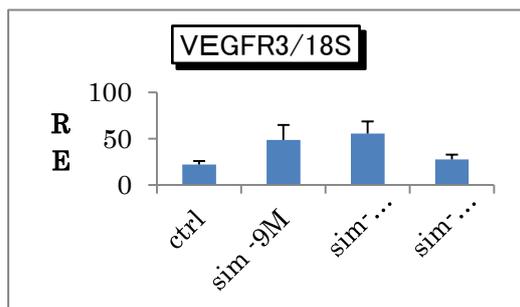
図 2



リアルタイム PCR: 次に、リンパ管形成に不可欠な VEGF-C の受容体である VEGFR3 の発現について検討した。シンバスタチン刺激により、培養マクロファージにおける VEGFR3 の発現は有意に促進した。(図 3)

図 3

③術後リンパ浮腫モデル作成が難航したため、糖尿病マウス皮膚全層欠損創モデルを用いて培養マクロファージ移植によるリンパ管新生について検討した。simvastatin 刺激により前処理を施したマクロファージ群では、PBS 群、無刺激マクロファージ群に対し

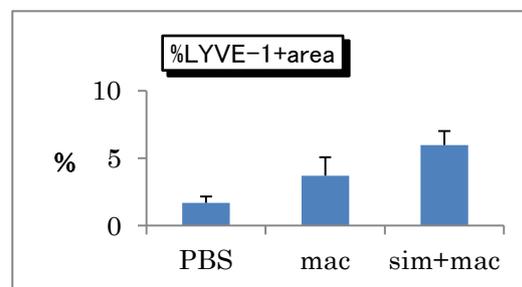


て有意に創傷治癒促進効果を認めた。(図 4 a) また、創部肉芽組織中のリンパ管新生を LYVE-1 免疫染色にて検討したところ、simvastatin 前処理マクロファージ群で有意に LYVE-1 陽性リンパ管が増加していた。(図 4 b)

図 4 a



b



考案

マウスを用いた術後リンパ浮腫モデルの確立を目標の一つとしていたが、期間内の確立は困難であった。その理由として、①ヒトと異なりパテントブルーなどの色素によるリンパ管の肉眼的描出が難しいこと、②ヒトと異なりマウスは4足歩行のため足趾一本あたりの加重が少ないこと、③マウスは個体が非常に小さいためにリンパ節の同定自体が難しいこと、などが考えられた。現在、モデルをマウスからラットに変更し、同様にリンパ節郭清術による術後リンパ浮腫モデルの作成に取りかかっている。まだ統計学的処理、長期の経時的変化、組織学的検討は行えていないが、患肢の浮腫を認める個体を確認している。今後、引き続き検討を重ねていく予定である。

本研究ではリンパ管新生の程度を検討す

るための代替案として、すでに確立されたモデルである糖尿病マウス皮膚全層欠損創を用いてその後の検討を行った。simvastatinにマクロファージのリンパ管への分化促進作用があることを *in vitro* で検証した後、simvastatin 刺激マクロファージの創部への移植を行ったところ、創部肉芽組織内のリンパ管の新生が確認された。これらの結果は、未だに難治な術後リンパ浮腫に対して新しい治療の可能性を示唆する結果である。また本研究は、自己末梢血由来細胞をもちいる点、simvastatin という現在臨床で使用されている薬剤をもちいる点などより、有効性だけでなく、高い安全性も期待される。今後も臨床応用に向けて基礎実験を積み重ねていく予定である。

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6件)

1. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinoshita S, Tokura Y, and Katoh N. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2012 Dec;181(6):2217-24 (査読有)
2. Asai J, Takenaka H, Ii M, Asahi M, Kishimoto S, Katoh N, Losordo DW. Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice. *Int Wound J*. 2012 Jun 28. (査読有)
3. Kotani H, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Nomiyama T, Soga F, Nin M, Asai J, Kishimoto S, Katoh N. Increased plasma

LIGHT levels in patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 2012 Jun;168(3):318-24. (査読有)

4. Nishimura Y, Ii M, Qin G, Hamada H, Asai J, Takenaka H, Sekiguchi H, Renault MA, Jujo K, Katoh N, Kishimoto S, Ito A, Kamide C, Kenny J, Millay M, Misener S, Thorne T, Losordo DW. CXCR4 Antagonist AMD3100 Accelerates Impaired Wound Healing in Diabetic Mice. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar. in press (査読有)
5. Wada M, Asai J, Asai A, Nakai D, Kishimoto S, Katoh N. Giant cell arteritis with polymyalgia rheumatica associated with influenza vaccination. *J Dermatol*. 2011 Nov;38(11):1099-101. (査読有)
6. Nakamura N, Asai J, Daito J, Takenaka H, Katoh N. Interstitial granulomatous dermatitis? An unusual presentation in the mucosa and periungual skin. *J Dermatol*. 2011 Apr;38(4):382-5. (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Katoh N. Regulation of Keratinocyte proliferation by podoplanin during cutaneous wound healing in mice. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec7-9, 2012 Naha, Okinawa, Japan
2. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Katoh N. Regulation of Keratinocyte migration by podoplanin during cutaneous wound healing in mice. (ESDR 2012, V

enice, Italy) *J Invest Dermatol* 2012; 132:
Supple 9 (049)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕
該当無し

〔その他〕
京都府立医科大学皮膚科学教室ホームページ
<http://kpum-dermatology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 純 (ASAI JUN)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50438222