

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462791

研究課題名(和文) マウスリンパ浮腫モデルに対する培養リンパ管内皮細胞移植の有用性に関する研究

研究課題名(英文) Research for culture lymphatic endothelial cell transplantation to mouse lymphedema model

研究代表者

木股 敬裕 (Kimata, Yoshihiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50392345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫治療の基礎研究として、培養リンパ管内皮細胞移植によるリンパ管再生を目指した。マウス後肢基部で軟部組織を切断し膝窩リンパ節を郭清することでリンパ浮腫モデルを作成した。2週間程度浮腫は持続したが、4週間後にはほとんど消退した。マウス胸管からリンパ管内皮細胞の初代培養を行った。免疫染色により、リンパ管内皮細胞であることを確認したが、数継代で増殖しなくなった。ゲル上でリンパ管内皮細胞を培養し管腔形成能を評価したが、VEGF-Cによる管腔形成促進効果は認めなかった。コラーゲンスポンジで3次元培養したリンパ管内皮細胞をマウス皮下に移植し、組織学的に評価したが、リンパ管の管腔様構造は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：As basic research of lymphedema treatment, we conducted a study aimed at lymphatic regeneration by cultured lymphatic endothelial cell transplantation. We have created a lymphedema model by dissecting the popliteal lymph nodes and amputating the soft tissue in the mouse hind limb base. Edema lasted for two weeks, but almost disappeared after 4 weeks. We harvested mouse thoracic duct and primary culture of lymphatic endothelial cells were acquired by explant method. Immunocytochemistry has been confirmed to be lymphatic endothelial cells. But the cells did not proliferate over several passages. Lymphatic endothelial cells cultured on the gel were evaluated for tube formation ability. But tube formation promoting effect of VEGF-C was not observed. A three-dimensional cultured lymphatic endothelial cells in a collagen sponge were implanted subcutaneously into mice, and they were evaluated histologically. But tubule-like structure of the lymphatic vessels were not observed.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ輸送系 リンパ浮腫 培養リンパ管内皮細胞 リンパ管再生

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫とは先天的なリンパ管形成不全や、子宮がん、乳がんなどの悪性腫瘍切除手術により四肢から中枢へのリンパ還流が阻害され、浮腫をきたす状態であり、我が国だけでも 10 万人以上がこの疾患に苦しんでいると推定されている。治療としては弾性ストッキングなどによる圧迫療法や専門家によるマッサージ療法などの保存的治療が行われることが多いが、根治は困難である。これらの保存的治療で改善が見られない症例に対しては、リンパ管と細静脈との吻合術が一部の施設により行われている。しかし、この手術には直径 0.5mm 以下の血管を吻合する高度な血管吻合の技術が必要であり、実施できる施設が限られているうえ、我々の行った調査によると術後の改善効果もあまり高くないことが示唆されている。これらに代わる新たな治療法として再生医療の応用が考えられるが、血管など他の組織に比べリンパ管の再生医療に関する研究報告は非常に少ないのが現状である。そこで、将来のリンパ浮腫患者へのリンパ管再生医療の応用に向けた基礎的研究として、マウスの後肢リンパ浮腫モデルを確立し、そこにマウスリンパ管内皮細胞を移植することで臨床的、組織学的にどのような変化が認められるかを詳細に解析する必要があると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は 3 次元培養したマウスリンパ管内皮細胞をマウスリンパ浮腫モデルに移植し、リンパ管再生および浮腫改善の効果を

検証することである。

- (1) マウスリンパ浮腫モデル作成
- (2) マウスリンパ管内皮細胞採取・培養
- (3) マウスリンパ管内皮細胞 3 次元培養
- (4) リンパ浮腫モデルへの 3 次元培養リンパ管内皮細胞移植とリンパ管再生の評価

## 3. 研究の方法

(1) 近交系マウス (BALB/c) の大腿基部にて大腿動静脈と骨以外の組織 (皮膚、皮下組織、筋肉、リンパ管) を全周性に切断し、皮膚を縫合する。浮腫の持続を経時的に観察する。

(2) マウスを開胸し、顕微鏡下に胸管を採取する。採取した胸管を切り開き、コラーゲンコーティングした培養皿に貼り付け、explant 法によりリンパ管内皮細胞の初代培養を行う。

(3) リンパ管内皮細胞をゲルに混ぜたり、挟んだりして 3 次元培養し、管腔形成を評価する。また、コラーゲンスポンジにリンパ管内皮細胞の懸濁液を播いて培養し、管腔形成を評価する。

(4) 3 次元培養したリンパ管内皮細胞を、マウスリンパ浮腫モデルに移植し、リンパ管再生や浮腫軽減効果を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 膝窩リンパ節郭清モデル (大腿基部での皮膚全周切開と膝窩リンパ節郭清) と切断肢・膝窩リンパ節郭清モデル (大腿基部での動静脈と骨以外の切断および膝窩リンパ節郭清) の 2 つのモデルを作成し、浮腫の経過を

観察した。どちらのモデルも 5~7 日で浮腫のピークに達し、2 週間程度は浮腫が持続したが、4 週間でほぼ浮腫は消退した（図 1~3）。慢性リンパ浮腫モデルの作成には至らなかった。



図 1 膝窩リンパ節郭清モデル(左上)術後 7 日目(右上)術後 14 日目(左下)術後 28 日目

リンパ管染色用の色素の残留を認める。



図 2 切断肢・膝窩郭清モデル(左上)術後 7 日目(右上)術後 14 日目(左下)術後 28 日目



図 3 コントロール

(2) マウスを麻酔下に開胸し、下大静脈および食道を切離し、椎体前面を露出した。椎体前面で、下大動脈右側を走行する胸管を同定し剥離して採取した(図 4)。採取した胸管は切り開き、分割して、コラーゲンコーティ

ングしたシャーレに貼り付け、EGM 培地を用い低酸素条件(37 5%O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub>)下で培養した。1 週間程度で、貼り付けた胸管片から遊走するリンパ管内皮細胞を認めた(図 5)。この培養リンパ管内皮細胞をリンパ管内皮細胞の特異マーカーである Prox1 と Podoplanin による蛍光免疫染色し、リンパ管内皮細胞であることを確認した(図 6、7)。しかし、この培養リンパ管内皮細胞は 3~5 継代で増殖しなくなり、3 次元培養などの実験には適さなかった。

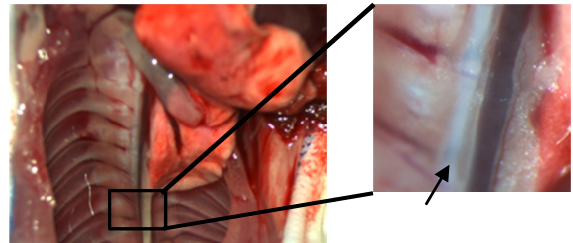


図 4 胸管の採取(左)開胸し胸管を同定したところ(右)椎体前面を走行する胸管(矢印)の拡大写真

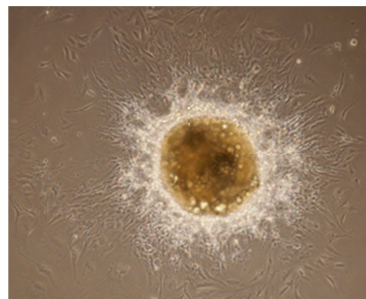


図 5 胸管から遊走したリンパ管内皮細胞(位相差顕微鏡画像)

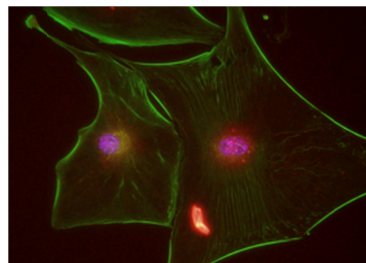


図 6 培養リンパ管内皮細胞蛍光免疫染色  
赤: Prox1  
緑: Actin  
青: 核

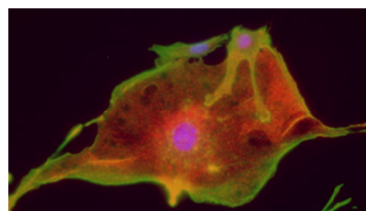


図 7 培養リンパ管内皮細胞蛍光免疫染色  
赤: Podoplanin  
緑: Actin  
青: 核

(3) 前述の通り、マウス胸管から採取したリンパ管内皮細胞は長期継代が不可能であり、実験の継続が困難であった。そこで、CellBiologics より C57BL/6 のリンパ節より採取されたリンパ管内皮細胞の初代培養を購入し、実験を継続した。まず、3次元培養における最適な管腔形成の条件を検討するため、マトリゲル下でリンパ管内皮細胞を培養し、リンパ管内皮細胞増殖因子である VEGF-C による管腔形成促進効果を検証した。リンパ管内皮細胞を播種した上にマトリゲルと EBM 培地を半々で混合し 0.2%DMSO を添加し固めたゲルを重層し 37℃、5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> で 48 時間培養した。VEGF-C は終濃度 200ng/ml を添加した。Calcein AM で染色し蛍光顕微鏡で撮影した画像を管腔形成能解析の画像解析ソフト Angiotool を用いて解析した(図 8)。Total Number of Junctions と Total Vessel Length とも VEGF-C の方がかえって値が低い傾向だったが有意差は認めず、VEGF-C の管腔形成促進効果は認められなかった(図 9)。

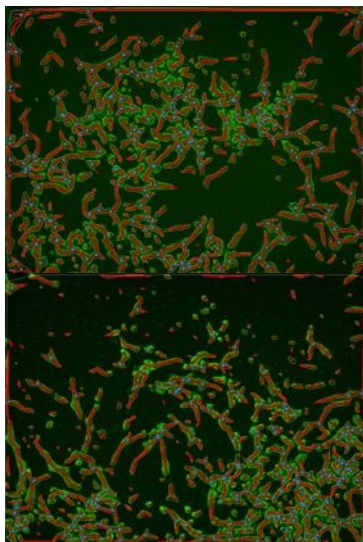


図 8 蛍光顕微鏡画像を Angiotool で解析した画像。(上)コントロール(下) VEGF-C

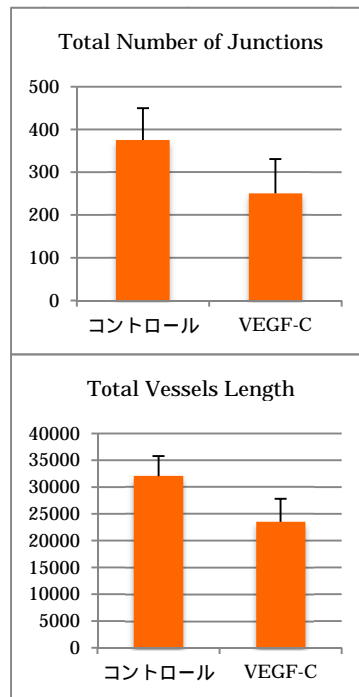


図 9 Angiotool 解析結果 (平均+標準誤差)

次にコラーゲンスポンジにリンパ管内皮細胞を播種し、3次元培養を行った。凍結切片を作成し、DAPI と Phalloidine で染色し蛍光顕微鏡で観察した。コラーゲンスポンジ上で増殖し、一部で管腔用構造を形成していた(図 10)。

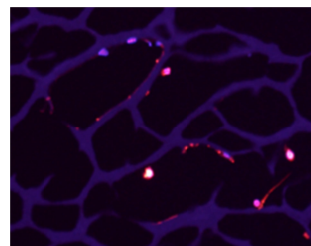


図 10 リンパ管内皮細胞コラーゲンスポンジ培養  
赤: Actin  
青: 核

(4) リンパ管内皮細胞をコラーゲンスポンジに播種し培養したものを、マウスの鼠径部皮下に移植し、2週間後にこれを摘出した。摘出したコラーゲンスポンジをパラフィンに包埋し、切片を作成し、H-E 染色および Podoplanin による免疫染色(酵素抗体法)を行った。当初は蛍光抗体法で染色を試みたが、コラーゲンスポンジの自家蛍光が強いため酵

素抗体法に変更した。コラーゲンスポンジ内部には多数の線維芽細胞が入り込んでいた(図 11)。免疫染色でリンパ管内皮細胞を認めたが、管腔様構造は認めなかった(図 12)。

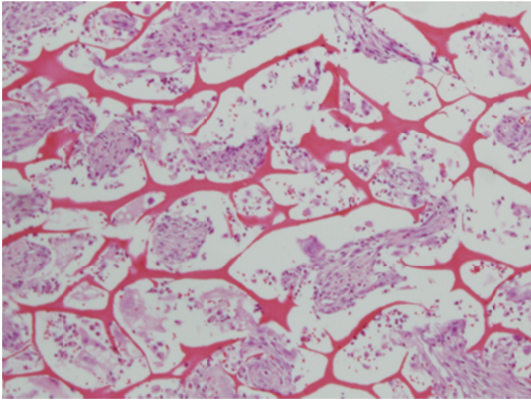


図 11 コラーゲンスポンジ培養リンパ管内皮細胞移植組織 (H-E 染色)

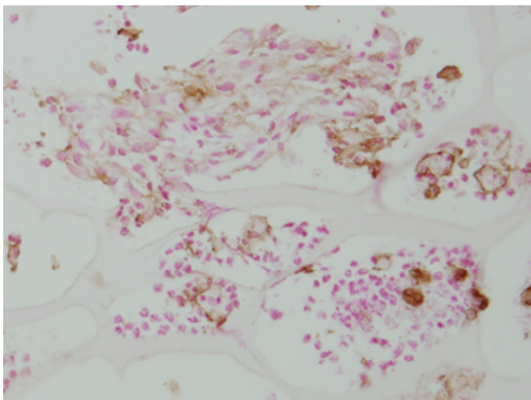


図 12 コラーゲンスポンジ培養リンパ管内皮細胞移植組織 (免疫染色)

茶：Podoplanin

ピンク：核

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木股 敬裕 (KIMATA Yoshihiro)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 形成再建外科 教授

研究者番号：50392345

### (2) 研究分担者

小坂 淳 (KOSAKA Jun)

国際医療福祉大学・保健医療学部 基礎医学研究センター 教授

研究者番号：40243216

徳山 英二郎 (TOKUYAMA Eijiro)

岡山大学病院 形成外科 助教

研究者番号：90379785