

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462793

研究課題名(和文)Hepatocyte growth factorによるリンパ浮腫軽減作用の研究

研究課題名(英文)Effect of hepatocyte growth factor for lymphatic edema

研究代表者

橋本 一郎 (HASHIMOTO, Ichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：70314870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：家兎耳介に透明窓を装着して血流やリンパ流が顕微鏡下に見られる可能性があるため、今までに発表されていない家兎耳介にリンパ浮腫モデルの作成を行った。しかし、耳介の基部は複雑な構造をしているため、耳介の浮腫をコントロールすることは困難であった。浮腫が適度なものに対してHGFプラスミドを耳介基部に試験的に投与したが個体差が大きく、明らかな浮腫改善は見られなかった。今後の課題として、HGFプラスミドの投与時期や投与部位、また浮腫モデルの改善が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to make a lymphatic edema model on rabbit ears in this study, which has not published yet, because blood vessels and lymph vessels can be observed in a transparent window installed on the rabbit ear under vital microscope. However, control of the lymphatic edema was difficult. The reason was thought as complex structure of the ear base of rabbits. Hepatocyte growth factor (HGF) plasmid was injected to ear base of selected models with the moderate intensity of edema. The effect for the lymphatic edema was not clear and obvious. Next steps for this study need improvement of timing and portion of injection of the HGF plasmid and the edema model.

研究分野：形成外科学

キーワード：リンパ浮腫 HGFプラスミド

1. 研究開始当初の背景

上肢や下肢に高度のリンパ浮腫を発症すると関節可動域に制限が生じて日常生活に支障がでたり、服装に制限が生じたり、蜂窩織炎などの感染症に悩まされることになる。リンパ浮腫は「原発性リンパ浮腫」と「続発性リンパ浮腫」に分類される。原発性リンパ浮腫はリンパ管自体に異常があるために引き起こされるリンパ浮腫である。一方、続発性リンパ浮腫はリンパ管の組織の外で生じた異常により引き起こされるリンパ浮腫であり、乳癌患者や子宮がん患者のリンパ節郭清後に見られる浮腫が典型的である。

保存的治療方法として用手的リンパドレナージ、弾力包帯や弾性ストッキングによる圧迫療法が行われている。また、外科的にはリンパ管・細静脈吻合が行われている。いずれの治療方法でも一定の効果は見られるが、完全な治癒の状態に戻すことは現在のところ難しい。

HGF(Hepatocyte growth factor:肝細胞増殖因子)は肝細胞を増殖する因子として 1984 年にたんぱく質が発見され、1989 年に cDNA がクローニングされた。この増殖因子は肝細胞だけではなく、さまざまな種類の細胞に対して増殖活性や形態形成活性を有することが知られており、血管新生¹やリンパ管新生²にも重要な役割を果たしていることが明らかにされている。Saito らは rat tail lymphedema model を用いてヒト HGF 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を投与することでリンパ浮腫が改善することを報告した³。

今回の研究では、HGF がリンパ管新生を促しリンパ浮腫を改善するかどうかを

indocyanine green(ICG)の撮影が可能なカメラと rabbit ear chamber(REC)を用いて検討する。ICG を皮膚に局所注射してリンパの流れを撮影することで定量的な観察が可能である。また REC では顕微鏡下でのリンパの流れを観察することが可能となる。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、ヒト HGF 遺伝子投与によりリンパ浮腫が改善するかどうかを、まず家兎耳介リンパ浮腫モデル 4 を用いて検討する。改善する場合には、ICG を耳介に投与することによりリンパ流改善部位を特定して、組織学的な検討をさらに加えることでリンパ管の増生についての機序や詳細を明らかにする。また、REC を用いて投与前後で実際にリンパ流がどのように変化するかを検討する。

ヒト HGF 遺伝子投与によりリンパ浮腫が改善するかどうかを、まず家兎耳介リンパ浮腫モデル 4 を用いて検討する。改善する場合には、ICG を耳介に投与することによりリンパ流改善部位を特定して、組織学的な検討をさらに加えることでリンパ管の増生についての機序や詳細を明らかにする。また、REC を用いて投与前後で実際にリンパ流がどのように変化するかを検討する。

リンパ浮腫の治療方法には確立されたものではなく、弾力包帯や弾性ストッキングによる圧迫療法をほぼ永久に続けなければならない。HGF や VEGF が因子としてリンパ管新生に関与しているとの報告はあり、ヒト HGF 遺伝子投与により rat では浮腫軽減効果の可能性が示されたが、より大きな動物での効果は未確認である。またそのリンパ管新

生については組織学的には未だに示されていない。

ヒト HGF 遺伝子投与によりリンパ管が新生し、リンパ浮腫が改善するのであれば保存療法は不要となる可能性がある。さらに、REC によるリンパ流の検討が可能であればヒト HGF 遺伝子の効果だけではなく、他にもリンパ浮腫を改善する可能性のある VEGF-C 遺伝子投与やリンパ管細静脈吻合などの治療法の評価に使用できる可能性がある。

1) Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992; 119: 629-641.

2) Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J.* 2005 Aug 17;24(16):2885-2895.

3) Saito Y, Nakagami H, Morishita R, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. *Circulation.* 2006; 114: 1177-1184.

4) Yoon YS, Murayama T, Gravereaux E, Tkebuchava T, Silver M, Curry C, Wecker A, Kirchmair R, Hu CS, Kearney M,

Ashare A, Jackson DG, Kubo H, Isner JM, Losordo DW. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *J Clin Invest.* 2003; 111: 717-725.

3 . 研究の方法

< 概要 >

家兎耳介リンパ浮腫モデルを作成して、HGF 遺伝子を耳介基部の筋肉内へ注射することでリンパ浮腫が改善するか検討する。組織学的にリンパ管の増生を検討し、HGF レセプターや HGF DNA の存在、HGF たんぱく質の発現についても検証する。さらに近赤外線カメラや rabbit ear chamber を追加することでリンパ流をマクロとミクロで観察する。

平成 2 5 年度計画

家兎耳介リンパ浮腫モデル 4 を作成し、コントロール群として耳介の質量と厚さを計測する。最低 3 ヶ月間は浮腫が持続して、最終的に組織の線維化が生じるモデルを作成することを目標とする。

ヒト HGF 遺伝子はプラスミド DNA ベクターである pVAX1 を基本骨格としてヒト HGF 遺伝子 (cDNA) を組み込んだプラスミド DNA の形 (pVAX1HGF/MGBI) で、アンジェス MG 株式会社から無償で提供を受ける。pVAX1HGF/MGBI は導入された細胞内で HGF 遺伝子を発現して HGF たんぱく質が産生される。pVAX1HGF/MGBI の投与は筋肉内へ行われ、筋肉内で産生された HGF たんぱく質は周囲組織へ拡散することが確認されている。したがって、今回の家兎耳介リンパ浮腫モデルでは耳介基部の筋肉内に投与を行う。予備実験では、アンジェス

MG 株式会社の資料を参考にしながら、リンパ浮腫の改善が見られる投与濃度と投与間隔を決定する。

ヒト HGF 遺伝子投与によりリンパ浮腫の改善が見られない場合には、耳介基部の組織の HGF 濃度を ELISA 法により測定して至適濃度になるように投与方法を再検討する。

平成 26 年度以降の計画

家兔耳介リンパ浮腫モデルの耳介先端に ICG を皮下注射してリンパ流を観察する。リンパ流の再開部位を同定して、組織学的な検査を行えばリンパ管が再生しているかどうか、どういう形態で再生しているかが判明する可能性がある。リンパ管の再生状態は、組織をリンパ管内皮のマーカーである LYVE-1 と Prox1 や血管内皮のマーカーである PECAM-1 で染色することで検討する。さらに、HGF レセプターである c-Met を用いて組織を染色することで再生した組織に HGF レセプターが存在するかどうかを判明する。

さらに REC 法でリンパの流れを直視下に観察する。リンパ流の速度を測定することでリンパ流が改善しているかどうかを定量的に観察可能か検討する。

研究体制

上記のようにヒト HGF 遺伝子 (cDNA) を組み込んだプラスミド DNA は、アンジェス MG 株式会社から無償で提供を受ける。アンジェス MG 株式会社からの情報提供も受けながら、家兔への投与至適濃度や投与間隔の検討を進める。このプラスミド DNA は大阪大学臨床遺伝子治療学の森下竜一教授が開発したものであり、必要があれば森下竜一教授とも相

談の上研究を進める。また、rat へのヒト HGF 遺伝子投与を行っている旭川医科大学第 1 外科の齊藤幸裕助教とはリンパ浮腫診断治療指針の作成などで懇意なため、実験に関しても相談する。

徳島大学形成外科学教室においては代表研究者である橋本一郎のほか、研究分担者の安倍吉郎がリンパ浮腫モデルの作成等を行い、組織の染色等は森本篤志が担当する。

4. 研究成果

25 年度の研究では家兔耳介リンパ浮腫モデルの作成を行った。日本白色家兔を使用し、右耳をコントロールとし、左耳にリンパ浮腫モデルを作成した。モデル作成後、1 週間・2 週間・4 週間で耳介の厚みを測定し、組織採取を行った。耳介の厚さの測定は、決められた 3 部位で耳介全層の厚みを測定した。組織学的検討として、同 3 部位から耳介組織を採取し、HE 染色を行った。耳介遠位の 2 か所にインジゴカルミン (4mg/ml, 0.2cc) を皮内注射し耳介基部中央にある集合リンパ管を同定した。表在リンパ管を切除するために耳介基部の皮膚を 3 cm 幅で切除し、耳介基部の集合リンパ管と血管束を温存した。血管束・リンパ管の乾燥予防に軟骨膜で被覆し保護し、皮膚欠損部は創傷被覆材で保護した。

本研究では術後 7 日目・14 日目・28 日目で浮腫は増強しており耳介遠位の壊死を来したモデルも認めたことから、浮腫の程度はやや強いと考えられた。組織学的所見では、術後 4 週の耳介遠位組織では、表皮の肥厚・膠原線維の増生・膠原線維束間の間隙形成・リンパ管の拡張といった浮腫の特徴を認めた。今回の作成方法でリンパ浮腫の作成には

成功したが、今回の観察期間では耳介の近位・中間での上記の浮腫の特徴が一致せず、さらなる観察期間が必要と思われた。

26年度にはYoonらの報告に基づき1、ウサギ耳介基部の皮膚皮下組織を1.5cm幅以外の全周で切除する方法でリンパ浮腫モデルを作成した。手技の改良を加えつつ21例に手術を行った。浮腫の評価として術後12週間厚さと体積を計測した。浮腫は1週間でピークとなり緩やかに浮腫が改善していく経過をたどり、Yoonらの報告と一致していた。しかし、中には重度の浮腫のため壊死を生じる例や、逆に早期に治癒してしまう例も存在しており個体差が問題となった。このモデルに対して3例にHGFプラスミドを投与したが、1例は対照と変わらず、1例で重度の浮腫を認め、1例で壊死を生じた。このモデルでは厚さ、体積の変化に差が大きく二群間の浮腫の程度を比較することは困難であると考えられた。

27年度には昨年と同様の家兎耳介モデルを用いて、浮腫の評価として術後4、8、12週で厚さと体積を計測した。1週間で浮腫はピークとなり穏やかに改善して行く傾向は昨年と同様であった。HGFプラスミドを術直後に耳介基部に投与したが、今回の実験ではその効果は明確ではなかったためHGFプラスミドの投与時期の検討が必要であると考えられた。さらにラット尾部浮腫モデルでの評価2やリンパ管切断後の再開通実験3なども検討すべきであろう。

1.Yoon, Y.-S. S. et al. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. J. Clin.

Invest. 111, 717-725 (2003).

2.Slavin SA. Et al. Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. Ann Surg. 229:421-427 (1999).

3.IKOMI, F. et al. Recanalization of the Collecting Lymphatics in Rabbit Hind Leg. Microcirculation 13, 365-376 (2006).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Ichiro Hashimoto, Keiichi Goishi, Yoshiro Abe, Mitsuru Takaku, Takuya Seike, Hiroshi Harada, Hideki Nakanishi, The internal pudendal artery perforator thigh flap: a new free style pedicle flap for the ischial region, Plastic and Reconstructive Surgery Global Open, 2 : e142-148, 2014 (査読あり)

2. Hirotaka Sugino, Ichiro Hashimoto, Tanaka, Soshi Ishida, Yoshiro Abe, Hideki Nakanishi, Relation between the serum albumin level and nutrition supply in patients with pressure ulcers: retrospective study in an acute care setting, The Journal of Medical Investigation 61(1.2) : 15-21, 2014 (査読あり)

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 一郎 (HASHIMOTO, Ichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号 : 70314870

(2)研究分担者

安倍 吉郎 (ABE, Yoshiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：40467808

福永 豊 (FUKUNAGA, Yutaka)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：50748069

高久 暢 (TAKAKU, Mitsuru)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：40598893

森本 篤志 (MORIMOTO, Atsushi)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：70596296