

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860583

研究課題名(和文)リンパ浮腫の発症病態メカニズムの解明と新規の標的薬物治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of Pathological Changes of Lymphedema

研究代表者

元木 英(緒方英)(MOTOKI, FUSA)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70648253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫は悪性腫瘍治療によるリンパ節郭清や放射線治療などの後に四肢が肥大し、生活の質を著しく低下する慢性の進行性疾患であるが、術後にどのような機序によってリンパ浮腫に至るのか、その発症機序はまったく不明である。リンパ浮腫の発症機構の解析を行った。リンパ浮腫患者のリンパ管では他の炎症性血管疾患同様にリンパ管平滑筋細胞が形質変換し増殖しリンパ管壁を肥厚していることがわかった。さらに私が確立したマウスモデルでは、透過性の亢進した新生リンパ管とリンパ球と単球・マクロファージを主体とした免疫細胞の集積を認めた。炎症プロセスが、リンパ管新生をもたらしている可能性が高いことが示唆された。

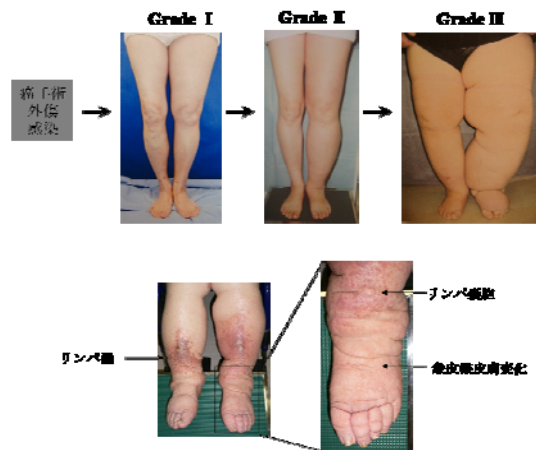
研究成果の概要(英文)：Lymphedema is a debilitating progressive condition that severely restricts quality of life and is frequently observed following cancer surgery. The mechanism underlying lymphedema development remains poorly understood, and no effective pharmacological means to prevent or alleviate the ailment is currently available. Using of human lymphatic vessels of lymphedema patients, I elucidated that the lymphatic tunica media and tunica intima consist mainly of phenotypical modulated smooth muscle cells (SMCs) and SMCs play pivotal roles in the development of lymphedema, as with the pathogenesis of various vascular disease. Furthermore, I made a mouse model of lymphedema and found that excessive generation of immature lymphatic vessels is essential for initial edema development and that this early process is also important for later development of lymphedema pathology. I found that CD4(+) T cells interact with macrophages to promote lymphangiogenesis.

研究分野：リンパ学

キーワード：リンパ浮腫 リンパ管平滑筋細胞 マウスモデル リンパ管新生 CD4陽性T細胞

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫はリンパ液が滞留することによって四肢の著明な浮腫・拡大、蜂窩織炎やリンパ漏を繰り返し、患者の日常生活を著しく障害する重篤な疾患であり、いったん発症すると完治は望めず、慢性期には改善も難しく、一生付き合う必要がある。



また、慢性リンパ浮腫の約 0.45%に血管肉腫 (Stewart-Treves 症候群) を併発し、発症後の生存期間が数ヶ月から 1 年と極めて予後不良である。

現在のところリンパ浮腫の有効な治療法は存在せず、マッサージと弾性ストッキングによって、一時的に浮腫を軽減する治療のみが行われているのが現状である。このような深刻な疾患であるにもかかわらず、明確な診断基準がなく、さらに医療従事者においても重篤な疾患である認識が低く、他の慢性疾患のような早期発見、早期治療の概念が薄い。

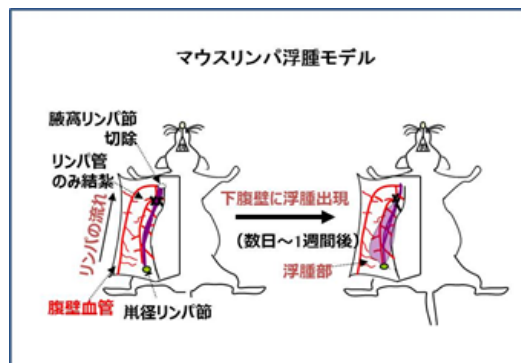
わが国では、外科・婦人科手術の際のリンパ節郭清後に発症する続発性が圧倒的に多く、乳癌手術後の 20-30%、子宮癌手術後の 20-40%に発症すると報告されており、国内で上肢リンパ浮腫が 3-5 万人、下肢リンパ浮腫が 5-7 万人存在すると推定され、年間 1 万人前後がリンパ浮腫に罹患すると推定されている。リンパ浮腫は、単純に外科手術に伴うリンパ管閉塞・除去によって生じるものではなく、術後 3-5 年の経過を経て慢性化する。同一肢であっても、部位によって組織病変の進行度が異なる。術後にどのような機序によってリンパ浮腫に至るのか、その発症メカニズムは全く分かっていない。したがって、リンパ浮腫の病態解明ならびにそれに基づく発症予防や疾患の根治が可能な治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

リンパ浮腫の予防・治療法開発の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、リンパ浮腫患者からの組織サンプルと研究者が確立したマウスリンパ浮腫モデルからの組織サンプルの解析を行った。



ヒトサンプルでは免疫組織学解析を中心に行った。マウスモデルでは過剰なリンパ管新生が機能的なリンパ管の確立を阻害しリンパ液の貯留と浮腫をもたらすことが示唆された。このメカニズムを明確にするために、VEGF-C によるリンパ管新生の誘導、可溶性 VEGFR-3 によるリンパ管新生抑制等のリンパ管新生への介入を検討する。VEGF-C は Pluronic gel ないしは osmotic minipump にてマウスに投与し、リンパ管新生を促進する。可溶性 VEGFR-3 については、発現アデノウイルスを投与し、局所ないしは肝臓からの産生によってリンパ管新生の阻害を得る。これらリンパ管新生への介入が、リンパ浮腫、リンパ管透過性にどのように影響するかを検討し、過剰なリンパ管新生とリンパ管の成熟障害がリンパ浮腫の病態基盤であることを明確にする。同時に、炎症プロセスへの影響を検討する。リンパ管成熟障害に伴う透過性の亢進や過剰なリンパ管新生が、リンパ液やサイトカインによって、さらに炎症プロセスを惹起し、炎症とリンパ浮腫を拡大する可能性がある。このモデルで検討を行う。

さらに炎症プロセスの誘導機構とリンパ管新生、リンパ管成熟障害への寄与の解析に関して、リンパ管結紮後に発現誘導されるサイトカイン・ケモカインを同定し、それらを発現する細胞群を免疫組織染色で検討する。

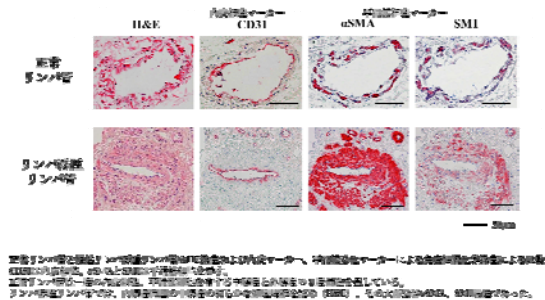
免疫細胞誘導のリクルートに寄与すると考えられるサイトカインが同定された場合には、それらに対する中和抗体やノックアウトマウスを用いて、免疫細胞集積への影響を検討する。また、免疫細胞の集積については、リンパ液の寄与の可能性を検討する。リンパ浮腫モデルで集積する免疫細胞について、フローサイトメトリーでその詳細な細胞種の解析を行うとともに、細胞をソーティングして遺伝子発現プロファイリングから機能解析を

始める。重要な細胞については、抗体による除去、あるいはノックアウトマウスを用いて、リンパ浮腫への寄与を検討する。例えば、マクロファージについては、**CD11b-DTR** マウスや **clodronateliposome** を用いた除去を行う。

リンパ球については、**CD8a** ノックアウトマウスや **Rag2** ノックアウトマウスを用いた解析を行う。また、リンパ球については **TCR** レポートリーの解析を行い、特有の抗原が存在する可能性を検討する。この点に関して、特にリンパ管の成熟障害への炎症の寄与を検討する。病態の比較的後期に発現が増加するサイトカインを同定し、それらの作用について、マウスモデルで検討する。サイトカインの投与および中和抗体を用いた解析を *in vivo* で行う。同時に培養リンパ管内皮細胞を用い、透過性への作用を検討する。同時に、細胞接着に関しては、免疫組織染色等によって詳細な解析を行い、リンパ管内皮細胞の接着制御のシグナル経路の解析を行う。

4. 研究成果

ヒトサンプルではリンパ管そのものが動脈硬化などの炎症性血管疾患と同様に硬化しており、リンパ管壁のリンパ管平滑筋細胞が形質変換を起こし増殖しリンパ管壁の肥厚、収縮不全を引き起こしていることが明らかになった。



確立したモデルではリンパ管閉塞後数日すると腹部皮下に炎症細胞が集積し、約1週間後には透過性の亢進した新生リンパ管が既存リンパ管から発達し、皮下に組織液が貯留し、浮腫が著明になる。浮腫部に集積した炎症細胞の大部分はリンパ球であり、**CD4** 陽性 **T** 細胞であった。興味深いことに、リンパ球を持たない **Rag2** ノックアウトマウスではリンパ管新生が抑えられており、浮腫の程度が軽度であった。さらに **Rag2** ノックアウトマウスに野生型リンパ浮腫マウスの浮腫部から回収した **CD4** 陽性 **T** 細胞を養子移植したマウスでは浮腫が亢進した。リンパ浮腫は慢性炎症性疾患であり、早期において **CD4** 陽性 **T** 細胞が重要な役割

を果たしており、炎症プロセスが、リンパ管新生をもたらしている可能性が高いことが示唆された。リンパ浮腫早期においてリンパ管新生を抑制すると浮腫が抑えられた。このことから、リンパ浮腫は異常なリンパ管新生によって惹起されることが強く示唆された。さらに **CD4** 陽性 **T** 細胞、マクロファージ、リンパ管内皮細胞を用いた共培養実験により、**CD4** 陽性 **T** 細胞はマクロファージと協調して、リンパ管新生を促すことが考えられた。本研究により、リンパ浮腫における炎症プロセスと、リンパ管の過剰新生と成熟異常の重要性が明らかとなった。

〈引用文献〉

1. Nakamura, K. and S.G. Rockson, Molecular targets for therapeutic lymphangiogenesis in lymphatic dysfunction and disease. *Lymphat Res Biol*, 2008. 6(3-4): p. 181-9.
2. Szuba, A. and S.G. Rockson, Lymphedema: classification, diagnosis and therapy. *Vasc Med*, 1998. 3(2): p. 145-56.
3. Tervala, T., E. Suominen, and A. Saaristo, Targeted treatment for lymphedema and lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1131: p. 215-24.
4. Stewart, F.W. and N. Treves, Lymphangiosarcoma in postmastectomy lymphedema; a report of six cases in elephantiasis chirurgica. *Cancer*, 1948. 1(1): p. 64-81.
5. Woodward, A.H., J.C. Ivins, and E.H. Soule, Lymphangiosarcoma arising in chronic lymphedematous extremities. *Cancer*, 1972. 30(2): p. 562-72.
6. M. Foldi, E.F., S. Kubik, TEXTBOOK of LYMPHOLOGY for Physicians and Lymphedema Therapists. 2003: URBAN & FISHER.
7. Rockson, S.G., Lymphedema. *Am J Med*, 2001. 110(4): p. 288-95.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. **Fusa Ogata**, Katsuhito Fujiu, Sahohime Matsumoto, Yukiteru Nakayama, Munehiko Shibata, Yuichi Oike, Isao Koshima, Tetsuro Watabe, Ryoza Nagai, Ichiro Manabe
Excess lymphangiogenesis co-operatively induced by macrophages and CD4+ T cells drives the pathogenesis of lymphedema. *J Invest Dermatol*. 2016

Mar;136(3):706-14

2. **Ogata F.**, Fujiu K, Koshim I, Nagai R, Manabe I. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in lymphedema.

Br J Dermatol. 2015

May;172(5):1286-93.

〔学会発表〕(計4件)

①リンパ浮腫の病態発症にはCD4陽性細胞が重要である。日本リンパ学会。平成27年5月

②リンパ浮腫の病態機序について。日本リンパ学会。平成26年5月。

③リンパ浮腫の病態変化について。リンパ管平均細胞の形質変化。日本リンパ学会。平成25年5月。

④Pathological Changes in Lymphedema. Gordon Conference Meeting. 平成25年3月

6. 研究組織

(1)研究代表者

元木 英 (MOTOKI Fusa)

(緒方 英 OGATA Fusa)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70648253