

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293310

研究課題名(和文) 二次性リンパ浮腫動物モデルの作製と治療法の開発

研究課題名(英文) Creation of a novel animal model of secondary lymphedema and development of the therapy

研究代表者

海野 直樹 (Naoki, Unno)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20291958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、詳細なリンパ路の解析とそれを網羅的に遮断することにより、ヒトの二次性リンパ浮腫に病的に酷似した経過をたどる動物モデルの作製に成功した。このモデルを用いて、リンパ浮腫の線維化のメカニズムを探求したところ、TGF- β 1による線維芽細胞から筋線維芽細胞への変異と活発なコラーゲンの産生が線維化の病態であることを突き止めた。一方、 ω 3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)の投与により、線維化が抑制されることを証明した。このことは、二次性リンパ浮腫のステージ3の患者から皮膚生検で得られた線維芽細胞でも同様に証明され、EPAの治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of secondary lymphedema remains unclear. Lack of an animal model has hindered investigations on the pathophysiology of the disease. We developed a novel animal model of secondary lymphedema using the rat hindlimb. Then, we identified that transforming growth factor (TGF)- β 1 was produced by macrophages in the acute phase and by fibroblasts in the late phase of the disease. Further, TGF- β 1 was observed to differentiate fibroblasts to myofibroblasts, accelerating collagen synthesis to result in fibrosis. Eicosapentaenoic acid (EPA) inhibited myofibroblasts producing TGF- β 1 in skin samples harvested from the hindlimbs of our animal models, as well as from the legs of patients with secondary lymphedema. Moreover, daily administration of EPA effectively inhibited fibrosis in our rat model via suppression of TGF- β 1. We showed EPA inhibits fibrosis in secondary lymphedema via suppression of myofibroblasts producing TGF- β 1.

研究分野：血管外科学

キーワード：リンパ浮腫 動物モデル TGF- β 1 線維化 筋線維芽細胞 治療 Eicosapentaenoic acid

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は、癌等の外科的治療の後遺障あるいは開発途上国ではフィラリア感染の後遺症としてよく起こり、患者数は、世界では5千万人、日本においても20万人以上いるといわれている。さらに、日本における二次性リンパ浮腫の患者数は、癌、特に乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌等を治療する場合に、リンパ節郭清や術後放射線照射のために比較的高頻度で起こることから、毎年数万人規模で増えていくことが推測されている。また、むくみが起こってから、すなわち、視覚に現れてからの治療となるため手遅れになることも少なくなく、早期診断による早期治療及び予防が望まれているが、有効な画像診断法は確立されていない。また有効な治療法も少なく、根治的な治療法の開発が求められている。

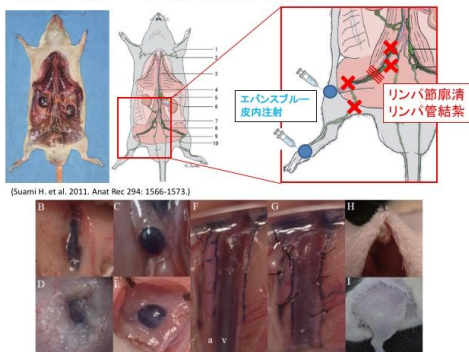
2. 研究の目的

本研究ではヒトの二次性リンパ浮腫に病的に酷似した経過をたどる動物モデルの開発とその検証。線維化の進展のメカニズムの探索。動物モデルを用いて3脂肪酸投与による治療効果。二次性リンパ浮腫患者の組織から採取した培養系を用いてと同様に3脂肪酸の効果以上の4つを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトの二次性リンパ浮腫に病的に酷似した経過をたどる動物モデルの開発とその検証: インドシアニングリーン蛍光リンパ管造影法により下肢並びに骨盤内のリンパ路をすべて同定し郭清すること、鼠径部皮膚を短冊状に全周に切除して側副路の発達を防止恒常的にリンパが鬱滞する様に工夫を行った。

新しいリンパ浮腫モデル作成



線維化の進展のメカニズムの探索

慢性期に線維化が進展する際のメカニズムとして線維芽細胞並びに、筋線維芽細胞に着目し、これらの細胞のコラーゲン産生量と、その key mediator である TGF- に着目し、動物モデルの組織並びに線維化を来した二次性リンパ浮腫患者の腫脹した患肢の皮膚組織を採取し、検討を行った。

動物モデルを用いて3脂肪酸投与による治療効果の検討: メタボリック症候群の成人において、動脈硬化の進展を防ぐと報告されてい

る3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)を新たに作成したラットリンパ浮腫モデルに経口投与し、リンパ浮腫の進展を抑制しうるかを判定した。

二次性リンパ浮腫患者の組織を用いて3脂肪酸投与による治療効果の検討: 線維化を来した二次性リンパ浮腫患者から倫理委員会の承認、十分なインフォームドコンセントを得て、患肢より生検を行って組織を採取。動物実験と同様に筋線維芽細胞の培養を行い、この培養系にEPAを投与して効果を検討した。

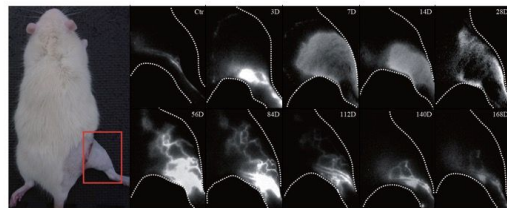
臨床ステージ3の進行リンパ浮腫患者リスト

| Case | sex | age | Primary disease | Disease duration (year) | ISL stage |
|---------|-----|------------|-------------------|-------------------------|-----------|
| 1 | F | 78 | uterine carcinoma | 50 | II b |
| 2 | F | 78 | uterine carcinoma | 14 | II b |
| 3 | M | 71 | bladder carcinoma | 8 | II b |
| 4 | F | 83 | uterine carcinoma | 34 | II b |
| 5 | F | 64 | uterine sarcoma | 6 | II b |
| Average | - | 74.8 ± 3.0 | - | 22.4 ± 7.6 | - |

4. 研究成果

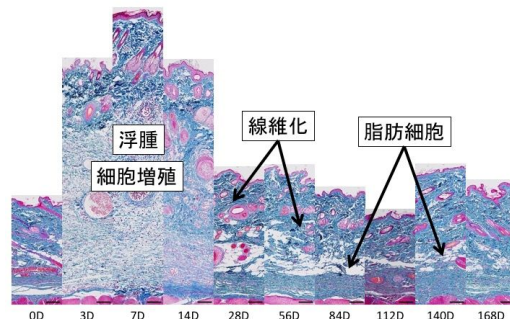
ヒトの二次性リンパ浮腫に病的に酷似した経過をたどる動物モデルの開発とその検証: ラットの下肢のリンパ流解剖をインドシアニングリーン蛍光造影とエバンスブルー色素を用いて網羅的に調べ、リンパ節切除とともにリンパを丹念に遮断することにより、リンパ浮腫を発症させた。

ICG 蛍光リンパ管造影



術後6ヶ月まで、皮下組織にリンパ液の貯留を認める。

組織学的評価 (Azan染色)



本モデルは作成直後から術後6ヶ月までリンパが貯留することが判明し、また病理学的検討で

も、ヒトの二次性リンパ浮腫と同様に、脂肪組織の増生と線維化の進展が慢性期で認められた。本モデルは作製後の経過日数により、ヒトのリンパ浮腫の臨床ステージ1からステージ3へと進展していくことが判明した。

小括 (1)

| 術後日数 | Stage I | | | Stage II (Late) | | | Stage III | | | |
|--------|---------|---|---|-----------------|----|----|-----------|-----|-----|-----|
| | 0 | 3 | 7 | 14 | 28 | 56 | 84 | 112 | 140 | 168 |
| 細胞増殖 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| リンパ液貯留 | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 線維化 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 脂肪細胞 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |



- 新しいリンパ浮腫モデルは、ヒトと同様に経過する。
- 病期の進行に伴い皮膚組織は徐々に硬化する。

線維化の進展のメカニズムの探索
動物モデルのリンパ浮腫患肢組織からは正常では認められない筋線維芽細胞が認められた。筋線維芽細胞は活発にコラーゲン産生を行なっていることが判明した。またこの筋線維芽細胞は通常の線維芽細胞に TGF- β を投与すると筋線維芽細胞に変異することが判明した。このことから TGF- β が線維化の key molecule であることが判明した。

リンパ浮腫と筋線維芽細胞

皮膚生検し、線維芽細胞を初代培養

P4HB (線維芽細胞) α -SMA DAPI

24週齢 Control

TGF- β 1

線維芽細胞はTGF- β 1により筋線維芽細胞へ分化する。

24週齢 リンパ浮腫 (術後3ヶ月)

リンパ浮腫の皮膚には、筋線維芽細胞が存在する。

動物モデルを用いて 3脂肪酸投与による治療効果の検討

EPA 投与により線維化の進行が抑制され、組織中のリンパ管数、リンパ管面積共に有意に増加させることが認められた。効治療効果を細胞レベルでも確認するため、動物モデルから組織を採取し、そこから線維芽細胞並びに、筋線維芽細胞を培養。この培養系にエイコサペンタエン酸を投与して、コラーゲン産生を抑制しうるかを検討した。その結果、EPA は筋線維芽細胞におけるコラーゲンの産生を抑制しうるということが判明した。

二次性リンパ浮腫患者の組織から採取した培養系でのEPAの効果を検討:生検を行って採取した組織からは健康肢では認められない筋線維芽細胞が同定された。この初代培養筋線維芽

ラット筋線維芽細胞へのEPA投与(2)

24週齢 リンパ浮腫 (術後3ヶ月)

P4HB (線維芽細胞) α -SMA DAPI

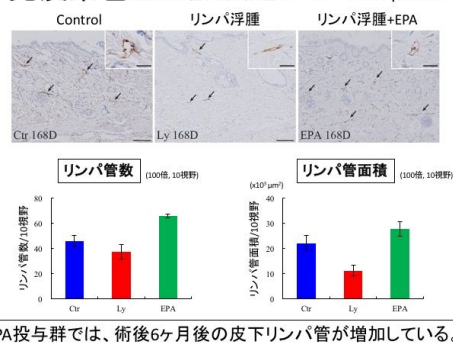
リンパ浮腫の皮膚には、筋線維芽細胞が存在する。

EPA

EPA 1.0 μ M EPA 3.0 μ M EPA 10.0 μ M

EPA投与しても、ラット筋線維芽細胞の形態は変化しない。(線維芽細胞には戻らない。)

免疫染色 (リンパ管内皮細胞マーカー: Podoplanin)



細胞にEPAを投与したところ、Type I・コラーゲンの mRNA 発現量が減少し、線維化を抑制する効果があることが示唆された。

ヒト筋線維芽細胞へのEPA投与(1)

ヒトリンパ浮腫症例

患側

ヒトリンパ浮腫の皮膚には筋線維芽細胞が存在する。

EPA

TGF- β 1

Type III collagen (α 1)

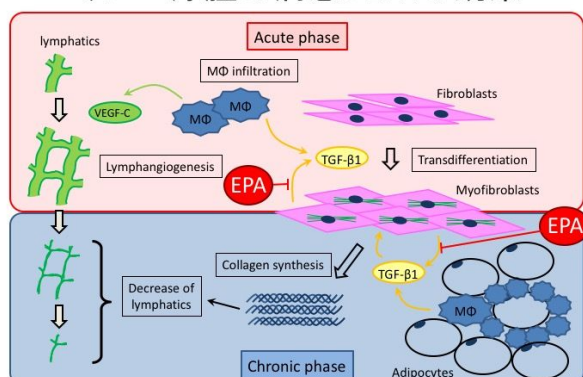
Type I collagen (α 1)

EPA投与でヒト筋線維芽細胞の TGF- β 1、Type I・IIIコラーゲンの mRNA 発現量が減少する。

研究成果のまとめ

の結果から二次性リンパ浮腫の慢性期線維化のメカニズムとして、線維芽細胞の筋線維芽細胞への変異とそれに関わる key mediator として、TGF- β が重要な役割を果たしていることが判明した。またこの筋線維芽細胞による線維化はEPAの投与により抑制され、EPAが二次性リンパ浮腫の線維化抑制の治療薬として有望である可能性が示唆された。二次性リンパ浮腫のメカニズムとEPAの効果について以下の図において概略を示す。

リンパ浮腫の病態とEPAの効果



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 10 件)

1 Sakata M, Takehara Y, Katahashi K, Sano M, Inuzuka K, Yamamoto N, Sugiyama M, Sakahara H, Wakayama T, Alley MT, Konno H, Unno N (Corresponding author) Analysis of endoleaks after endovascular abdominal aortic aneurysm repair by using four-dimensional flow-sensitive magnetic resonance imaging. *Circ. J* 80:1715-20. 2016

2 Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Sano M, Yamamoto N, Saito T, Inuzuka K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Sugiura Y, Sato K, Kuga H, Moriyama T, Konno H, Setou M, Unno N (Corresponding author) Hypoperfusion of the adventitial vasa vasorum develops an abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 10(8): e0134386, 2015

3 Sugisawa R, Unno N (Corresponding author), Saito T, Yamamoto N, Inuzuka K, Tanaka M, Katahashi K, Uranaka H, Marumo T, Konno H: Effects of compression stockings on elevation of leg lymph pumping pressure and improvement of quality of life in healthy female volunteers: a randomized controlled trial. *Lymphat. Res. Biol.* 14:95-103, 2016

4 Kamiya K, Unno N (Corresponding author), Miyazaki S, Sano M, Kikuchi H, Hiramatsu Y, Ohta M, Yamatodani T, Mineta H, Konno H: Quantitative assessment of the free jejunal graft perfusion. *J. Surg. Res.* 194(2): 394-9, 2015

5 Kugo H, Zaima N, Tanaka H, Mouri Y, Yanagimoto K, Hayamizu K, Hashimoto K, Sasaki T, Sano M, Yata T, Urano T, Setou M, Unno N, Moriyama T. Adipocyte in vascular wall can induce the rupture of abdominal aortic

aneurysm. *Sci Rep.* 2016 Aug 8;6:31268. doi: 10.1038/srep31268

6 Sano M, Unno N (Corresponding author), Sasaki T, Baba S, Sugisawa R, Tanaka H, Inuzuka K, Yamamoto N, Sato K, Konno H. Topologic distributions of vasa vasorum and lymphatic vasa vasorum in the aortic adventitia - implications for the prevalence of aortic diseases. *Atherosclerosis*, 2016 247: 127-134

7 Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Inuzuka K, Sano M, Saito T, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Sato K, Kuga H, Moriyama T, Konno H, Setou M*, Unno N (Corresponding author). Imaging mass spectrometry reveals a unique distribution of triglycerides in abdominal aortic aneurysmal wall. *J Vasc Res* 52(2): 127-135, 2015

8 Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Inuzuka K, Sano M, Konno H, Urano T, Setou M, Unno N (Corresponding author). Characteristic Distribution Pattern of Lysophosphatidylcholine in Fibromuscular Dysplasia-Associated Visceral Artery Aneurysms Compared with Atherosclerotic Visceral Artery Aneurysms. *J Atheroscler Thromb* 2016 23(6):673-80

9 Kugo H, Zaima N, Tanaka H, Hashimoto K, Miyamoto C, Sawaragi A, Urano T, Unno N, Moriyama T. Pathological analysis of the Ruptured Vascular Wall of Hypoperfusion-induced Abdominal Aortic Aneurysm Animal Model. *J Oleo Sci.* 2017 May1;66(5):499-506

10 Ishii H, Iwatsuki K, Tatebe M, Hirata H, Kikumori T, Tsunoda N, Hyodo I, Ogawa T, Unno N. Multi-center rater-blinded study of early intervention with the Hand Incubator for breast cancer-related lymphedema (the BEAT-EDEMA trial): Proposal of a research protocol. *Nagoya J Med Sci.* 2017 Feb;79(2):221-227

[学会発表](計 20 件)

山本、海野等 悪性腫瘍治療中に有症状静脈血栓塞栓症を合併した症例の予後. 第54回日本癌治療学会総会, 2016/10/6, 横浜

山本、海野等, 腹部骨盤外科手術後に発症した有症状VTE症例の検討, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016/4/16 大阪

山本、海野等, 静脈血栓塞栓症に対するカテーテル血栓溶解療法と下大静脈フィルターの当科での適応と施行頻度. 第

44 回日本血管外科学会学術総会
2016/5/26 お台場,東京
佐野、海野等 CLI 症例の全身状態評価
と生命予後について第 44 回日本血管外
科学会学術総会, 2016/5/26 お台場,東京
杉澤、海野等 リンパ浮腫患者のケアに
おける患肢挙上の効果の検討-ICG 蛍光造
影法を用いたリンパ駆出圧の測定- 第44
回日本血管外科学会学術総会 .
2016/5/26 お台場,東京
嘉山、海野等 下肢神経症状をきたした
遺残坐骨動脈瘤の 1 例.第 44 回日本血管
外科学会学術総会 2016/5/26 お台場,東京
片橋、海野等. 4D-Flow MRI によって EL
の type 分類ができた馬蹄腎を伴う EVAR
の 1 例 第 44 回日本血管外科学会学術総
会 2016/5/26 お台場,東京
山本、海野等. 静脈血栓塞栓症を発症し
た悪性腫瘍患者における FDP-DD の意義
第 38 回日本血栓止血学会学術集会
2016/6/16 奈良
山本、海野等. 悪性腫瘍を合併した
静脈血栓塞栓症患者における予後と血栓
症因子の関連 第 36 回日本静脈学会総
会 2016/6/23 弘前
杉澤、海野等 利き肢と非利き肢におけ
るリンパ駆出圧の比較第 36 回日本静脈
学会総会. 2016/6/23 弘前
佐野、海野等. リンパ浮腫皮膚由来線維
芽細胞を用いたエイコサペント酸エチル
の二次性リンパ浮腫に対する治療効果の
検討. 第 36 回日本静脈学会総会 .
2016/6/23 弘前
嘉山、海野等. 透析用内シャント穿刺部
感染の 2 例 第 36 回日本静脈学会総会
2016/6/23 弘前
犬塚、海野等. 前腕の尺側皮静脈転位に
よる透析用ブラッドアクセスの早期成績
第 36 回日本静脈学会総会. 2016/6/23 弘
前
Sano M, Unno N, et al. Involvement of
myofibroblasts in the pathophysiology
of secondary lymphedema. 27th World
congress of the international union of
angiology 2016/7/8 London, UK
Katahashi K, Unno N, et al. 27th World
congress of the international union of
angiology. 2016/10/5 Lyon. France
Saito T, Unno N, et al. Involvement of
myofibroblasts in the pathophysiology
of secondary lymphedema. World
Congress of the International Union of
Angiology 2016/10/5 Lyon. France
Inuzuka K, Unno N, et al. Hemodynamic
analysis of endoleak with multiple
types after endovascular abdominal
aortic aneurysm repair by using
four-dimensional flow-sensitive

magnetic resonance imaging. World
Congress of the International Union of
Angiology 2016/10/5 Lyon. France
片橋、海野等 EVAR 術後 type II endoleak
の遷延、瘤径増大に影響を及ぼす
endoleak 分枝について-4D-flow MRI に
よる血行動態学的危険因子の検討- 第 57
回日本脈管学会総会 2017/10/13 奈良
佐野、海野等 EVAR 術後 type II endoleak
の遷延、瘤径増大に影響を及ぼす
endoleak 分枝について-4D-flow MRI に
よる血行動態学的危険因子の検討- 第 57
回日本脈管学会総会 2017/10/13 奈良
山本、海野等 ヒト大動脈の外膜血管・リ
ンパ管の分布と大動脈疾患による変化第
78 回日本臨床外科学会総会 2017/10/13
奈良

〔図書〕(計 2 件)

Lymphatic Pumping Pressure in the Legs and
Its Association with Aging, Edema, and
Quality of Life Unno N - ICG Fluorescence
Imaging and Navigation Surgery, 2016 -
Springer

今野弘之, 海野直樹 消化器外科医のための
ちょっと先行く画像診断 メディカルビュー社
2015, 240 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 下肢リンパ圧改善用具及び下肢リンパ
圧改善方法
発明者: 海野直樹, 杉澤良太, 丸茂智彦, 浦
中宏典
権利者: 浜松医科大学 東レ オペロンテ
ックス株式会社
種類:
番号: 特願 2015-083140
出願年月日: 平成 26 年 4 月 15 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: 蛍光検知装置
発明者: 海野直樹, 服部貴應, 三輪光春
権利者: 浜松医科大学, 株式会社エヌエス
ティー, 浜松ホトニクス株式会社
種類:
番号:
取得年月日: 平成 29 年 2 月 24 日
国内外 s d の別: 特許協力条約に基づく国際
出願 PCT/JP2013/053862

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

海野直樹 (UNNO NAOKI)

浜松医科大学医学部准教授

研究者番号：20291958

(2)研究分担者

山本尚人 (YAMAMOTO NAOTO)

浜松医科大学医学部附属病院・助教

研究者番号：80402262

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()