

吉田周平 論文内容の要旨

主 論 文

Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model.

(マウス下肢続発性リンパ浮腫モデルにおける脂肪由来幹細胞を用いたリンパ管再生療法)

吉田周平、浜田裕一、Rodrigo Hamuy, 吉本浩、平野明喜、秋田定伯

Regenerative Medicine, in press, March 30, 2015

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員： 尾崎 誠 教授)

緒 言

続発性リンパ管浮腫は乳癌、子宮など骨盤臓器治療後に認められると報告されている。諸説はあるものの、リンパ浮腫患者におけるリンパ管は機能低下あるいは再生障害状態にあることが考えられる。脂肪由来幹細胞 (Adipose-Derived Stem Cell: ADSC) は増殖能、多分化能と組織再生に必要な様々な因子の分泌や paracrine 作用を持ちリンパ管再生能を高める可能性を持つ。本研究ではマウス下肢において放射線照射、手術操作によりリンパ浮腫モデルの確立と ADSC を用いた治療効果について検討した。

対象と方法

マウスリンパ浮腫モデル作成にあたり左鼠径部のみに 30Gy の X 線を照射し、1 週間後に鼠径部皮膚を全周性に切開し顕微鏡下に下肢リンパ経路を探索し切断することで、リンパ浮腫モデル確立した。さらに 3 種類の濃度で ADSC 移植実験を行った。

実験 1 として、ADSC を同系統マウスより採取後培養し、1 群で 0 個、2 群で 1×10^6 個、3 群で 1×10^5 個、4 群で 1×10^4 個を全体に少量ずつ均一に局注した。2 週間後にリンパ浮腫周径改善効果観察目的で周径測定を行い、リンパ流の生体内変化は photodynamic eye® (PDE) にて撮影した。リンパ管再生を調べるために、リンパ管特異的な Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1 (LYVE-1) 抗体組織免疫染色を行った。またリンパ管再生に重要な Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C) とその主要受容体である VEGFR3 の免疫組織染色を行い、それぞれ陽性細胞数を調べた。

実験 2 として、ADSC 移植後の ADSC のリンパ管分化能を調べる目的で、緑色蛍光タンパク (enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) 遺伝子導入マウスの ADSC を採取培養し移植に用いた。移植 2 週間後に組織を採取し蛍光陽性細胞数と免疫陽性細胞

の検討を行った。

実験 3 では、実験 2 の補足目的で雄マウスの ADSC を雌マウスのリンパ浮腫モデルマウスに移植し組織内の Y 染色体を FISH 法で観測した。

結 果

実験 1 の結果、下肢周径改善率は二つの細胞移植群で無細胞治療群と比較して統計学的有意に改善していた。PDE リンパ画像状態により、明らかなリンパ浮腫像を認める Grade 1 からリンパ管の再生がある Grade 5 までの 5 段階に分けて評価した結果、ADSC 非移植群は 2 週間かけて Grade 5 から Grade 1 へ悪化し、リンパ浮腫像が完成されていた。一方、低細胞移植群は皮内リンパ管に近似の補助的な経路に連なる Linear pattern を呈し Grade 4 に分類される状態へと改善した。1×10⁶ 個移植群は集合リンパ管の主要な経路から連続する linear pattern を呈する Grade 5 へと明らかに改善した。PDE 像の分類とリンパ浮腫改善率は、有意な正相関を認めた。組織内の LYVE-1 陽性リンパ管数は、ADSC を移植した 3 群では移植しない群と比較して有意に増加した。また移植細胞が多い群の方が少ない群に比較し有意にリンパ管数が多かった。VEGF-C 陽性細胞、VEGFR3 陽性細胞とも、ADSC を移植した 3 群で移植しない群と比較して有意に増加し、移植細胞が多い群の方が少ない群に比較し有意に陽性細胞数が多かった。

実験 2 の結果、EGFP 発現 ADSC 移植の凍結組織における蛍光観察画像では採取組織内に EGFP 陽性細胞は散見されるものの、リンパ管には EGFP 陽性細胞は認められなかった。

実験 3 の FISH 解析の結果、雄→雌移植群に Y 染色体シグナルは認められなかった。

考 察

今回の実験の ADSC のリンパ管再生は、ADSC が直接リンパ管に分化することで起こるのではないものの ADSC 投与群では容量依存的にリンパ管再生と病態改善を認めるため、主に ADSC の paracrine 作用によるものと考えられた。下肢周径改善率、PDE 像は ADSC 数が増えるに従い良好な改善を示し ADSC はリンパ浮腫改善効果を持つことが示唆された。また下肢周径改善率と PDE 結果に有意に正相関が認められることからリンパ浮腫改善効果はリンパ流を改善させて得られていることが推測された。ADSC 数が増えるに従いリンパ流改善目的の再生リンパ管が増えており、VEGF-C、VEGFR3 の組織内発現数も ADSC 投与増加に相関して増加する。

一方 EGFP 発現 ADSC 移植実験や、FISH 解析において ADSC のリンパ管への分化を示す積極的な所見は得られなかった。今後、原発性リンパ浮腫については、遺伝子改変モデルを用いて検討する必要があると考えられた。