

# 林田健志 論文内容の要旨

主 論 文

## Adipose-Derived Stem Cells and Vascularized Lymph Node Transfers Successfully Treat Mouse Hindlimb Secondary Lymphedema by Early Re-connection of the Lymphatic System and Lymphangiogenesis

マウス下肢リンパ浮腫モデルにおける脂肪由来幹細胞と  
血管柄付きリンパ節移植の併用療法の効果

林田健志, 吉田周平, 吉本浩, 藤岡正樹, 西條広人, 右田清志, 熊屋美智, 秋田定伯

Plastic and Reconstructive Surgery, 2016年6月24日 accept, in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員: 右田 清志教授)

### 緒 言

癌の手術や放射線照射で二次性のリンパ浮腫となることがあり, 現行ではリンパ管静脈吻合や血管柄付きリンパ節移植 (Vascularized Lymph Node Transfers: VLNT) を用いた臨床報告例が相次いでいるが, 慢性例などで無効例も存在している. 脂肪由来幹細胞 (Adipose-Derived Stem Cells: ADSCs) は増殖能, 多分化能を有し, 再生に必要な種々のサイトカインの分泌能を持っている. これまでの我々の先行研究では, マウス下肢リンパ浮腫モデルにおける ADSCs を用いた治療は, 移植幹細胞数に依存してリンパ管を新生し, 浮腫を改善することが判明している. 本研究では VLNT と ADSCs を併用することで治療効果を検討した.

### 対象と方法

マウスリンパ浮腫モデル作成を目的として, マウス左鼠径部に X 線を 30Gy 照射後, その 1 週間後にその鼠径部皮膚を全周性に筋膜まで切開し, 顕微鏡下に左下肢のリンパ管・リンパ節を除去焼却して左下肢リンパ浮腫モデルを確立した. 腹部から採取した浅下腹壁動静脈で栄養される血管柄付きリンパ節皮弁を同部位へ移植し (VLNT), さらに同系統マウスより採取後培養した ADSCs を移植リンパ節皮弁の中樞側, 皮弁内, 末梢側のそれぞれ皮下へ計  $1 \times 10^4$  個局所注射し, Group1: VLNT(-)ADSCs(-), Group2: VLNT(+)-ADSCs(-), Group3: VLNT(-)ADSCs(+), Group4: VLNT(+)-ADSCs(+) の 4 群に分

けた。その2週間後に左下肢の水置換測定器による浮腫量の評価、生体内リンパ流動的变化を photodynamic eye® (PDE) によるリンパ管機能評価、その後、移植皮弁部の組織採取によるリンパ管特異的抗 Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1 (LYVE-1) 抗体を用いた免疫染色評価を行った。またリンパ管などの脈管再生に関与する因子である Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C) とその受容体である Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGF-R3) の免疫染色を行い、それらのリンパ管内皮細胞における陽性細胞数を計測した。さらに移植したリンパ節の機能を確認するために、B16 melanoma cells を左足背に移植する検討を行い、癌細胞の転移の有無を抗 Melan-A 抗体を用いた免疫染色で確認した。

## 結 果

移植後2週で、PDE を用いて移植されたリンパ節へとリンパ液の流れを確認できた。再生されたリンパ管から移植リンパ節へとリンパ液の流入が確認でき、リンパ系が再構築できていた。また ADSCs 移植群は、移植皮弁より近位部において線状のリンパ管の再生を確認できた。下肢容量改善率、容量悪化率は Group4 において有意に改善していた。病理組織学的検査には、移植したリンパ節は壊死や虚血の所見はなかった。抗 LYVE-1 陽性新生リンパ管は、ADSCs 移植群において有意に増加していた。VEGF-C と VEGF-R3 陽性細胞は確認できなかった。また B16 melanoma cells を用いて癌細胞の移植リンパ節への転移も確認でき、Group4 は再生されたリンパ管を通してより早い全身転移を認めた。

## 考 察

今回の実験ではマウス下肢リンパ浮腫モデルにおいて、比較的少ない数である  $1 \times 10^4$  個の ADSCs を使用し、VLNT との併用効果を検討した。水置換測定器によって正確な下肢容量計測が可能であり、Group4 は他の Group に比べ移植後2週の時点で有意に下肢容量が改善していた。また ADSCs 移植群では先行研究報告同様に、リンパ管数は増加しており、Group4 では再生されたと思われるリンパ管によって移植したリンパ節へとリンパ液をドレナージしていた。しかしながら悪性腫瘍が残存している状態では、ADSCs の移植はそのリンパ管数増加作用により転移を促進させる危険性があり、注意が必要と思われた。VLNT は ADSCs の存在下ではより効果的にその機能を発揮していることが判明し、VLNT と ADSCs の併用療法はヒト応用へ展開有望と考える。