

氏 名	河合 由紀
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第417号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成27年 3月10日
学位論文題目	Cell transplantation therapy for a rat model of secondary lymphedema. (二次性リンパ浮腫のラットモデルに対する細胞移植治療について)
審査委員	主査 教授 小笠原 一誠 副査 教授 醍醐 弥太郎 副査 教授 永田 啓

## 論文内容要旨

*整理番号	421	(ふりがな) 氏名	かわい ゆき 河合 由紀
学位論文題目	Cell transplantation therapy for a rat model of secondary lymphedema (二次性リンパ浮腫のラットモデルに対する細胞移植治療について)		
<p>【背景と目的】リンパ浮腫は、遺伝性、または炎症・感染症・外科手術・放射線治療等の後天性原因によって引き起こされる難治性の疾患であり、複合的理学療法やリンパ管静脈吻合等の手術手技のみでは治癒困難である。有効な治療法のない後天性（二次性）リンパ浮腫に対して遺伝子治療等も試みられているが、現在のところ確立された治療法の臨床応用には乏しい状況である。その一方で、血管新生の分野では、閉塞性動脈硬化症などの虚血下肢に対する自家細胞移植がすでに臨床応用され成果をあげている。そこで我々は、二次性リンパ浮腫の新たな治療法、リンパ管新生についてリンパ管内皮細胞の細胞移植治療を考案し、基礎的検討を行った。</p> <p>【方法】本研究は研究計画書を当学倫理委員会に提出し、承認されたのちに開始した。</p> <p>1) リンパ管内皮細胞の分離：乳癌で乳房切除術を受ける成人女性にインフォームドコンセントを行い、了解の得られた患者の手術の際合併切除される皮膚から健常部分を採取し、ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Human dermal microvascular endothelial cells, HDMECs) を分離培養した。更にこの中から MACS (magnetic activated cell sorting) で、脈管内皮細胞特異マーカーである CD31 とリンパ管内皮細胞特異マーカーである podoplanin の抗体を用いてヒトリンパ管内皮細胞 (human lymphatic endothelial cells, hLECs) を分離し、初代培養した。精製分離された細胞は、podoplanin の他、リンパ管内皮細胞に特異的な LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1), Prox-1 (prospero homebox 1) を用いて蛍光染色をおこなった。</p> <p>2) 二次性リンパ浮腫動物モデルの作製：ヌードラットの尻尾に外科的処置を加えリンパ浮腫動物モデルを作製した。</p> <p>3) 細胞移植：2) で作製したラットのリンパ浮腫モデルに1) で分離培養したヒトリンパ管内皮細胞 (hLECs) を移植投与し、リンパ浮腫の治療効果を経時的な尻尾周径値および近赤外線カメラシステム PDE (Photodynamic eye) を用いたリンパ管造影によるリンパ流測定で観察した。対照治療群として、HDMECs および phosphate-buffered saline (PBS) を用いた。移植治療は尻尾の外科手術翌日より開始し、術後 14 日目までに計 5 回、創部に直接注入を行った。また術後 18 日目、36 日目に治療後の尻尾組織も採取し組織学的に検討した。</p>			

(続 紙)

【結果】

1) HDMECs から精製分離、培養した細胞群の免疫染色で複数のリンパ管内皮細胞特異マーカーの発現を確認し、ヒトリンパ管内皮細胞と確認した。

2) 外科手術後 4 日目以降、尻尾周径が約 1.5 倍になるヌードラットリンパ浮腫モデルが作製できた。

3) ラットのリンパ浮腫モデルにおいて hLEC 移植治療群は対照の各群(HDMECs, PBS)に比べ、尻尾周径およびリンパ流が有意に改善し、浮腫の改善を認めた。術後 17 日目に行った PDE システムによるリンパ流観察では、尻尾創部を通過する新生リンパ流の通過時間が細胞移植両群 (hLECs, HDMECs) で有意に短かった。

組織学的には、対照の各群 (HDMECs, PBS) に比べ hLEC 移植群において術後 36 日目の表皮肥厚の改善がみられ、免疫組織染色による vessel density の評価でも hLEC 移植群において術後 18 日目、36 日目ともにラット由来のリンパ管数が有意に優っていた。また、術後 18 日目に hLEC 移植群で、ラット由来のリンパ管周囲にヒト由来のリンパ管内皮特異マーカーで染色されるリンパ管様組織を認めたが、術後 36 日目の組織にその分布は認められなかった。

【考察】ヒト皮膚より簡便な方法でリンパ管内皮細胞を分離培養することができ、ラット尻尾の二次性リンパ浮腫モデルに移植することにより有意な浮腫の改善とリンパ流の再構築を認めた。hLEC 移植群においてラット自身のリンパ管の増生を認め、特に細胞移植後早期では移植した hLECs がラットリンパ管新生に何らかの関与を及ぼしている可能性が示唆された。今回我々が行った hLECs の移植によりリンパ管新生が促進され浮腫が改善するメカニズムに関して、移植した hLECs そのものがリンパ管を構築しドレナージを図っている可能性と、また、移植した hLECs から分泌される growth factor (vascular endothelial growth factor (VEGF)-C or -D など) により、直接的あるいは間接的にラットリンパ管新生を刺激し促進している可能性などが考えられる。一方で、今回は短期の治療期間であったため、急性・亜急性の病態を反映しているものの慢性リンパ浮腫への応用は不十分であり、治療期間の再検討などが必要で、いずれも今後の更なる検討が必要と考えられる。

【結論】二次性リンパ浮腫モデルにおける細胞移植療法の有用性が示唆された。このモデルはリンパ浮腫患者に対する、リンパ管内皮細胞を用いた細胞移植治療の有効性を示すものと考えられる。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	421	氏名	河合 由紀
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>リンパ浮腫は臨床的には明確な治療法がない難治性の疾患である。有効な治療法のない二次性リンパ浮腫に対してリンパ管内皮細胞の細胞治療を行った。具体的には、ヒト皮膚から分離した培養細胞をポドプラニン抗体により分離精製した。この細胞をヌードラット二次性リンパ浮腫モデルに投与した。その結果以下の結論を得た。</p> <p>1) ヒト皮膚より簡便な方法で分離することができたリンパ管内皮細胞は、ラット二次性リンパ浮腫モデルにおいて有意な浮腫軽減とリンパ球の再構築を行うことができた。</p> <p>2) リンパ管内皮細胞移植群において、ラット自身のリンパ管の有意な増生と、細胞移植後早期での移植ヒトリンパ管内皮細胞の残存が認められた。</p> <p>本論文は、二次性リンパ浮腫に対するリンパ管内皮細胞移入治療に新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 391 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 27 年 1 月 26 日)</p>			