

リンパ浮腫脂肪組織における免疫細胞の変化

国立がん研究センター中央病院 形成外科

がん専門修練医 田代 絢亮

(共同研究者)

東京大学形成外科 教授 光嶋 勲

はじめに

リンパ浮腫は、その初期においては、リンパ液の貯留により、リンパ管内圧の上昇が起きる。この状況が持続すると、リンパ管の平滑筋細胞の非可逆的な変性が起き、リンパ管の正常な収縮能が徐々に障害を受けていく。貯留したリンパ液は皮膚の毛細リンパ管へと逆流し、ICGリンパ管造影検査などで、皮膚逆流所見 (dermal backflow pattern: DBF) として認知される^(1, 2)。さらに貯留したリンパ液は脂肪組織の増生を引き起こす。増生した脂肪組織はさらにリンパ管にかかる負荷を増加させ、ポンプ作用を阻害する。このようなリンパ液の貯留、リンパ系の負荷と損傷、脂肪組織の増生が繰り返され、浮腫はますます悪化する。そして疾患の進行により、治療の難度も上がる。治療の方法としては、圧迫療法を中心にした保存療法、外科的治療として浮腫組織切除、顕微鏡を用いたリンパ管静脈吻合やリンパ節移植術、脂肪吸引術などが行われている^(3, 4)が、リンパ浮腫のどの段階でどの治療が用いられるべきかなど、まだまだ議論の余地が多い。

脂肪組織自体は、主に脂肪細胞の集合からなり、機械的な強度や整容面、免疫機能や代謝における中心的な役割などを担っている。間質には、脂肪幹細胞 (ADSC) や、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞等が含まれる。肥満やメタボリックシンドロームを引き起こす脂肪組織の研究は進んでいるが、リンパ浮腫の脂肪組織の研究はこれまでほとんどされておらず、まだまだ新しい研究分野と言える。また脂肪組織に常在する免疫細胞の機能の異常が、蜂窩織炎やリンパ管肉腫といったリンパ浮腫により引き起こされる合併症とどのような関係があるのかもはっきりしたことは分かっていない。

我々は、リンパ浮腫の脂肪組織の形態学的組織学的解析を行い、病態生理学的変化を調べた。本研究では、リンパ浮腫の重症度を問診、身体所見、ICGリンパ管造影検査により規定し、リンパ浮腫に対する外科治療時に通常なら廃棄される脂肪検体を用いて、同一患者のリンパ浮腫脂肪組織と正常脂肪組織を比較した⁽⁵⁾。採取された切除検体に対しては、免疫組織染色やWhole-mount染色を行った。脂肪吸引により得られた検体に対しては、コラゲナーゼ処理を行い得られた間質細胞群に対し、フローサイトメトリー解析を行った。

結 果

【リンパ浮腫の評価】

図1のような患者を対象に解析を行った。

図 1

Patients and Methods

リンパ浮腫の評価は、病歴・臨床所見・ICGリンパ管造影にて行った。

Lymphedema	Bilateral	12
Limb (26 cases)	Unilateral	14



片側性のもので健常側も術野の場合は、
健常側からもサンプル採取し、リンパ浮腫側と比較した。

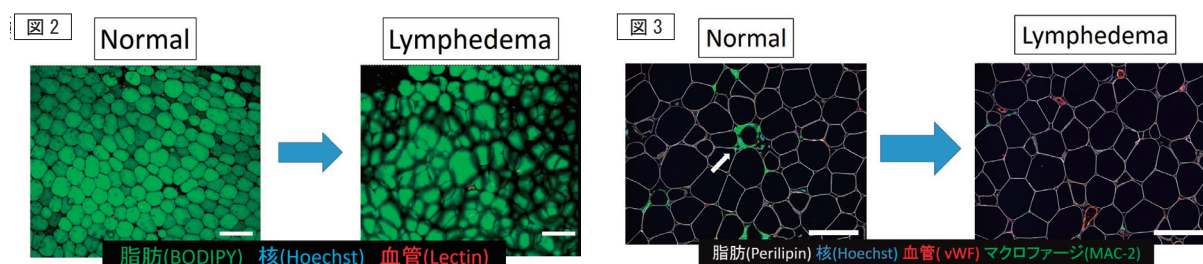
ISL Lymphedema Stage	Stage 0	9
	Stage 1	15
	Stage 2	23
	Stage 3	5

History	Edema(Av)	8.8 年
	Compression(Av)	7.3 年
	Radiation	9 人
	Phlegmone	14 人

【組織学的所見】

脂肪組織を固定化や薄切せずに観察するホールマウント染色においては、脂肪細胞をペリリピン、毛細血管をLectin、核をHoechstにて染色し、3次元構造を比較した。リンパ浮腫で脂肪細胞の配列の乱れがあり、浮腫が重症化すればするほど、過形成の脂肪細胞が目立つようになった。これらのことから、リンパ液の蓄積が慢性炎症を引き起こし、その結果組織の線維化が進んでいる様子が分かった。(図2)

また、間質に存在するマクロファージに関しては、壊死した脂肪細胞をM1マクロファージが取り囲む“Crown-like structures”(王冠様構造)が、リンパ浮腫では減少していた。これは、組織間液の過度な貯留により、マクロファージの遊走能が阻害されたためと考えられた。(図3)



【フローサイトメトリー】

吸引脂肪に対しては、コラゲナーゼ処理を行い、遠心後の間質細胞群(SVF)を回収し、CD31、CD34、CD45、CD14、CD206によるフローサイトメトリー解析を行った。

表面マーカーの違いにより、細胞は以下の4つに分けられた。CD45(+)細胞を血球系細胞とした。CD45(-)CD31(+)CD34(+)の細胞を血管内皮細胞とした。CD45(-)CD31(-)CD34(+)

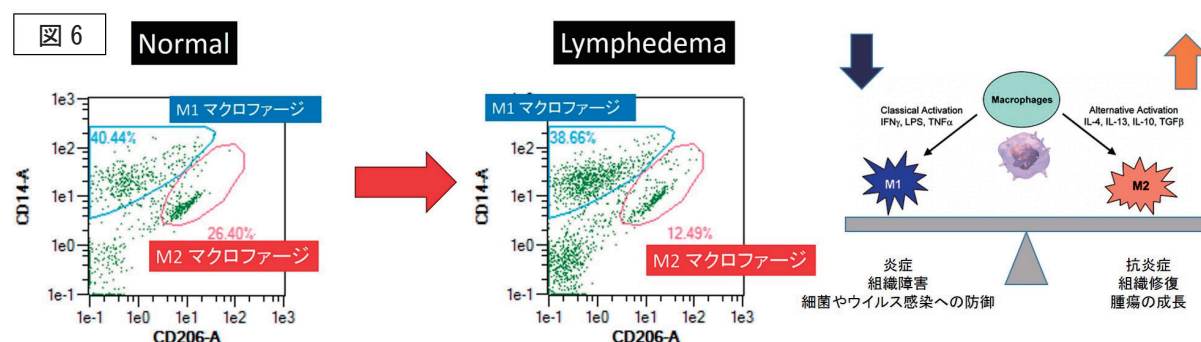
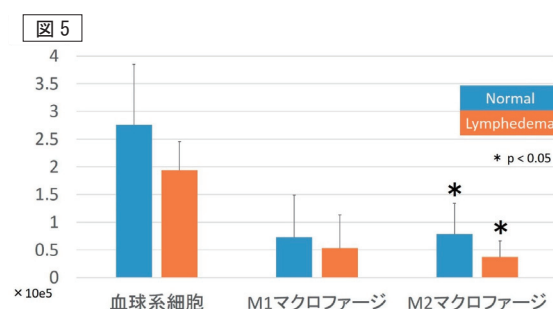
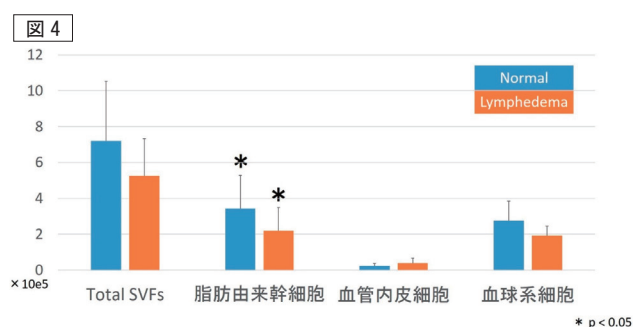
の細胞を脂肪由来幹細胞とした。CD45 (-) CD31 (-) CD34 (-) をその他の間質細胞とした。

リンパ浮腫の脂肪組織1mlから取れたSVFを解析したところ、脂肪由来幹細胞は $2.20 \pm 1.28 \times 10^5$ cells/ml、血球系細胞は $1.94 \pm 0.52 \times 10^5$ cells/ml、血管内皮細胞は $0.40 \pm 0.26 \times 10^5$ cells/mlであった。

それに対して、正常側の脂肪組織1mlから取れたSVFを解析したところ、脂肪由来幹細胞は $3.44 \pm 1.83 \times 10^5$ cells/ml、血球系細胞は $2.76 \pm 1.09 \times 10^5$ cells/ml、血管内皮細胞は $0.24 \pm 0.14 \times 10^5$ cells/mlであった。

リンパ浮腫脂肪組織において、脂肪由来幹細胞が減少しているという結果になった。脂肪由来幹細胞は脂肪細胞のターンオーバーや修復に作用していると考えられる。リンパ浮腫の肢に関しては、しばしば創傷治癒の遅延が起こることが知られているが、その原因の一つとして、脂肪由来幹細胞が減少していることが関係していると考えられる。(図4)

また、CD45 (+) CD 14 (+) CD206 (-) の細胞をM1マクロファージ、CD45 (+) CD14 (+) CD206 (+) の細胞をM2マクロファージとしたところ、リンパ浮腫の脂肪組織にはM2マクロファージが有意に少ないことがわかった。(正常脂肪組織 $7.84 \pm 5.69 \times 10^4$ cells/ml、リンパ浮腫脂肪組織 $3.70 \pm 2.95 \times 10^4$ cells/ml、 $p=0.042$) このようなマクロファージの異常が、リンパ浮腫の免疫機能の異常に関与している可能性がある。(図5)さらにはリンパ浮腫の進行に伴い、マクロファージの浸潤度が減少することが分かった。リンパ浮腫においては、M1/M2マクロファージのバランスがM1優位、M2低位になっているといった病態が考えられた。(図6)



考 察

【脂肪組織と免疫細胞】

脂肪組織は長年、脂質を蓄積するだけの「なにもしない臓器」と考えられてきたが、近年の肥満・メタボリックシンドロームの蔓延により、さまざまな病気を引き起こす「活発な代謝臓器」として、一躍注目を浴びるようになった。脂肪組織は脂肪細胞と間質細胞群（SVF）よりなり、実際にSVFを解析すると、その約1/4が免疫細胞であり、末梢臓器としては免疫細胞を多く含んだ特異な組織であるといえ、活発な免疫・炎症性細胞のクロストークが存在することが示唆される。また、2000年代初めに、脂肪由来幹細胞（Adipose derived stem cell）が報告され、再生医療の供給源としても注目されている。

リンパ浮腫患者の多くは、蜂窩織炎に悩まされている。突然高熱が出て、患肢が赤く腫れ上がり、炎症反応が急激に上昇する。繰り返すことでリンパ浮腫がさらに悪化し、また蜂窩織炎を起こすという悪循環になる。本研究が注目した、リンパ浮腫脂肪組織における免疫細胞の違いの研究をさらに進めることで、蜂窩織炎に対する新たな治療法・予防法の開発が進む可能性がある。また、免疫機能再建という新たな再建外科の分野を築くことができる可能性がある。

【マクロファージに関して】

全身に分布する組織マクロファージ（Tissue Resident Macrophage）は、異物を貪食するとともに、組織の恒常性維持や炎症応答の制御に重要な役割を担う。近年になり、組織マクロファージは臓器によってフェノタイプ、受容体や機能が異なることが分かってきた。組織マクロファージは恒常状態では数が一定に保たれているが、造血幹細胞から供給されているわけではなく、組織内で増殖によって自己新生すると考えられている。マクロファージは、病原体侵入により活性化し、それらを排除するものをM1型、アレルギー応答、脂肪代謝、創傷治癒および癌の転移・浸潤などに関与している細胞集団をM2型としている。マクロファージが脂肪組織に浸潤する脂肪組織の慢性炎症が、メタボリックシンドロームの形成に大きく関わっていることが分かっている⁽⁶⁾。また、最近の研究では、組織常在型のM2マクロファージの一部が脂肪細胞のメンテナンスに関わっていることも明らかになり⁽⁷⁾、本研究においてもリンパ浮腫において脂肪細胞の過形成を認めるとともに、M2マクロファージの減少を認めた。

要 約

二次性リンパ浮腫における脂肪組織の生理的变化を示した。長期に渡るリンパ液の貯留状態は、慢性炎症や進行性の線維化、脂肪組織の恒常性の破綻、再生能の減少、免疫細胞の異常などの変化を引き起こしていた。これらの病理学的変化は進行性で非可逆的であるため、早期の治療介入が重要と考えられる。また、各病期における最適な治療選択を考える上でも、

本研究の視点は役立つと考えられる。リンパ浮腫の脂肪組織に関しては、まだ分かっていないことも多く、さらなる研究の促進がよりよい治療戦略へと結びつくだろう。

文 献

- 1) Tashiro K, Yamashita S et al, Proximal and distal patterns: Different spreading patterns of indocyanine green lymphography in secondary lower extremity lymphedema, J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2016 Mar;69 (3) :368-75.
- 2) Tashiro K, Shibata T et al, Indocyanine Green Lymphographic Signs of Lymphatic Collateral Formation in Lower Extremity Lymphedema After Cancer Resection, Ann Plast Surg. 2016 Aug;77(2) :213-6.
- 3) Tashiro K, Fujiki M et al, Free Flap Salvage after Recurrent Venous Thrombosis by Means of Large-Scale Treatment with Medical Leeches. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2016 Dec 13;4 (12) :e1157.
- 4) Tashiro K, Yamashita S. Superficial Circumflex Iliac Artery Perforator Flap for Dorsalis Pedis Reconstruction. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2017 Apr 20;5 (4) :e1308.
- 5) Tashiro K. Feng J. et al, Pathological changes of adipose tissue in secondary lymphedema, Br J Dermatol in Press
- 6) Weisberg, S.P, McCann D et al, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue., J. Clin. Invest., 112 : 1796-1808, 2003
- 7) Satoh, T. Kidoya H et al, Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages., Nature, 495 : 524, 2013.