HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大網を用いたマウス外科的リンパ系再構築に関する研究
Author(s)	北條, 正洋
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17032号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17032
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100085
Type	doctoral thesis
File Information	HOJO_Masahiro_summary.pdf, 全文の要約

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

大網を用いたマウス外科的リンパ系再構築に関する研究

(Studies on lymphatic regeneration in mice by means of omentum)

２０２６年６月

北　海　道　大　学

北　條　正　洋

Masahiro Hojo

【背景と目的】

末梢リンパ節は平滑筋や弁の働きによりリンパを循環する機能と，リンパ節などのリンパ組織を有し抗原提示による免疫反応という免疫反応に関する機能があるとされている。悪性腫瘍の治療において，リンパ行性転移の治療および予防として，リンパ節郭清術が行われるが，これにより末梢リンパ節の従来の機能が破綻する。リンパの循環系が破綻するとリンパ浮腫を生じ，慢性化すると重度のリンパ浮腫となり，治療に難渋する。また，免疫系が破綻することで局所の免疫不全を生じて脈管肉腫を生じる(Grobmyer et al. 2000)，In-transit 転移を来たす可能性が指摘されている(Oashi et al. 2013)。

リンパ浮腫は重症度によって治療方法が異なり，慢性化すると難治化する。初期のリンパ浮腫に対しては理学療法が選択されるが，重症化すると局所の浮腫のみならずリンパ管が器質化し変性するため，外科的治療が検討され，近年では遊離リンパ組織移植術が注目されている。その中でも 2 次リンパ組織として機能し，milky spot がリンパ節の役割を果たすとされている大網は，豊富なリンパ組織を含んでおり，局所のリンパ系再構築により適した組織であると考えられる。しかしながらその効果についての基礎的な検証をした報告はない。

当教室ではこれまでに，マウスの後肢リンパ浮腫モデルを用いてリンパ系再構築に関する様々な研究を行ってきた。マウスを用いてリンパ節切除後の大網移植動物実験モデルを作成し，効果を検証することおよび大網組織そのもののリンパ管新生に及ぼす作用を，また培養上清を用いて，分子生物学的評価について検証することを目的として本研究を立案した。

【材料と方法】

第一章において，8 から 10 週齢雄の C57BL/6N マウスを用いて，膝窩リンパ節切除後に組織移植を行うモデルを作製した。腹部皮下を通し有茎で大網を移植する有茎大網移植群，大網をブロック状に採取して血流を有さない遊離組織として移植とする遊離大網移植群を作製した。比較対照群としてリンパ節摘出群，近傍の後肢皮下脂肪を血流のない遊離組織として移植する遊離脂肪組織移植群を作製し，術後 4 週の時点で赤外観察カメラシステムならびに 2%パテントブルー溶液を足蹠皮下に局所注射して後肢リンパ流を観察し，再疎通率を比較した。

第二章において，活性化大網の効果について，培養上清を用いて検証した。Polydextran 粒子を投与し活性化した大網（AO）群，PBS を腹腔内投与し反応した大網（PO）native な大網（NO）をそれぞれ採取し，培養上清を作製した。培養上清に含まれる mRNA を抽出し，含まれるサイトカインを検証した。

また，当教室が報告したマウス後肢リンパ浮腫モデル(Iwasaki et al., 2017, Hoshino et al., 2023)の作製法に従いモデルを作製し，作製した後肢リンパ浮腫マウスを，それぞれの培養上清と条件培地（AO, NO, CM）群に無作為に分け，手術日を含み 2 日ごとに局所皮下注射を 14 日間行った。健側に対する患側後肢の周径比を手術後 35 日まで評価した。また，手

術後 6 日目にシリコンスプリントから 6mm 遠位で後肢浮腫部の皮膚，皮下組織を摘出し，Elastica-Masson 染色および Podoplanin，F4/80 に対する免疫組織化学染色で組織学的に評価した。画像閲覧ソフトウェアを用いて Elastica-Masson 染色では表皮ならびに真皮厚を計測，比較した。各群の皮膚の厚さは，表皮から真皮-脂肪接合部まで，無作為に選んだ 5 点で ImageJ ソフトウェアを用いて測定した。F4/80 陽性領域は，ImageJ ソフトウェアを用いて，100 倍の倍率で無作為に選択した視野を中心に定量した。

【結果】

第一章において，リンパ節切除後 4 週間の時点で組織移植を行わない場合，33%が再疎通することが示された。切除後に組織移植を行うと，有茎大網移植群で 83%，遊離大網移植群で 66%と再疎通率が増加した。一方，遊離脂肪組織を移植した場合は再疎通率 0%であり，再疎通が阻害された。

第二章において，活性化大網における mRNA 発現は，注入後 1 日目から 4 日目にかけて指数関数的に増加し，その後減少した。neurophilin-2 (NRP2), angiopoietin-2 (Ang2), and hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α)は 1 日目に増加し，forkhead Box C2 (Foxc2) や prospero homeobox-1 (Prox1)は 1 週間後に増加した。Vascular endothelial growth factor C (*VEGF-C*), Vascular endothelial growth factor D (*VEGF-D*), hepatocyte grown factor (HGF)は経過による増量は認めなかった。後肢リンパ浮腫モデルに活性化大網の培養上清を投与すると，後肢の周径比は全群で術後 4 日にピークに達し，術後 35 日までに徐々に正常値に近づいた。計測時において，周径比は AO 群で NO 群および CM 群より有意に低く，浮腫の軽減を示した。周径比の減少は AO 群でより急速かつ顕著であり，他の群よりも浮腫の消失が良好であることが示唆された。また，リンパ管数は AO 群では CM 群より有意に増加した。一方 NO 群は明らかな有意差はみられないものの CM 群より増加する傾向にあった。

【考察】

第一章において，リンパ節切除後のリンパ系再構築において，大網移植術がリンパ管新生に関連する可能性が示唆された。有茎大網移植術として組織弁の血流を保持した状態で移植すると再疎通率は高く，より効果的な再建方法である可能性が示唆された。しかしながら大網がリンパ管新生にどのような影響を及ぼすかに関する検証が難しく，活性化大網を用いた実験系で検証することとした。

第二章において，大網は VEGF-C や VEGF-D などの血管内皮細胞増殖因子を多く含むが，活性化するとさらに NRP2, Ang2, HIF-1α,Foxc2, Prox1 などのリンパ管新生，血管新生に関わる因子を多量に放出することがわかった。また，活性化大網の培養上清を採取し後肢リンパ浮腫モデルへ投与すると，AO 群は NO 群 PO 群よりリンパ浮腫を早期に改善し，

リンパ管新生を促進する作用を持つことがわかった。

リンパ浮腫に対する外科的治療として，1966 年から大網移植術が行われている。近年ではマイクロサージャリー技術の進歩により，遊離組織弁として移植術が行われるようになったが，基礎的な検証は行われていない。動物モデルでは血管が微小なため，遊離移植の再現は困難であるが，より臨床に近いモデルとして有茎組織弁移植モデルを作製した。有茎組織移植群は遊離組織移植群に比べてよりリンパ管新生を促すことを示し，臨床におけるマイクロサージャリー手術の重要性を裏付けるものであった。さらに大網の持つ組織修復能，免疫能は異物に対する反応として活性化すると増強することが知られており，活性化大網の培養上清を投与することで分子生物学的反応を検証した。活性化大網は VEGF-C などの種々のサイトカインを通じてリンパ管新生を促進することを示した。この結果は臨床的なモデルとは直接的な関連は乏しいものの，皮弁採取に伴うドナーの損傷を最小限とする再生医療領域への応用を検討しうる結果である。

【結論】

第一章において，マウスの大網移植モデルを作製した。有茎大網移植モデルは遊離大網移植モデルに比べて再疎通率は高く，血流を有した組織移植がより効果的である可能性が示唆された。

第二章において，大網は Polydextran 粒子を投与すると活性化し，肥大および血管の拡張を認めた。特に遺伝子発現は 4 日目に最大となり，7 日以降は維持されることを示した。活性化大網培養上清の投与により，マウス後肢リンパ浮腫モデルの後肢周径，リンパ流のうっ滞が改善した。活性化大網の有するサイトカインは経時的に変化し，1 日目に HIF-1α，Ang2，および NRP2 が，7 日目には Foxc2 と Prox1 が増加することを発見した。VRGF-C や VEGF-D，HGF は常に一定以上が含まれており，抽出の時期により効果的な培養上清を作製できる可能性が示唆された。またの培養上清投与は，マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて，浮腫の後肢周径の減少，リンパ流のうっ滞の改善効果を発揮することを示した。これらの結果は，活性化大網培養上清がリンパ浮腫に対する治療に有用である可能性を示唆している。