

「生体内で VEGF-C を吸着・濃縮するゲルを用いたリンパ管再生技術の研究」

甲南大学フロンティアサイエンス学部

長濱 宏治

1 研究の背景と目的

ヒトには体液を輸送する管腔系として血管とリンパ管があり、両方が正常に機能して恒常性が成立しているため、リンパ管の欠損は様々な障害を引き起こし、多様な疾患の発症につながる。特に、リンパ浮腫はガン治療（リンパ節郭清など）を原因として発症することが多く、世界中では 2 億人以上の患者がいる。世界的にリンパ管の基礎・応用研究が進展していないため、現時点でリンパ浮腫に対する有効な根本的治療法は存在しない。近年、応募者は生分解性高分子 PLGA-

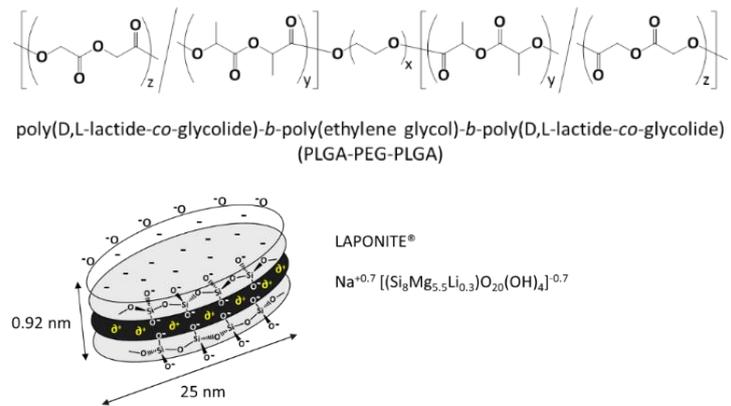


図 1. PLGA-PEG-PLGA と LAPONITE の構造。

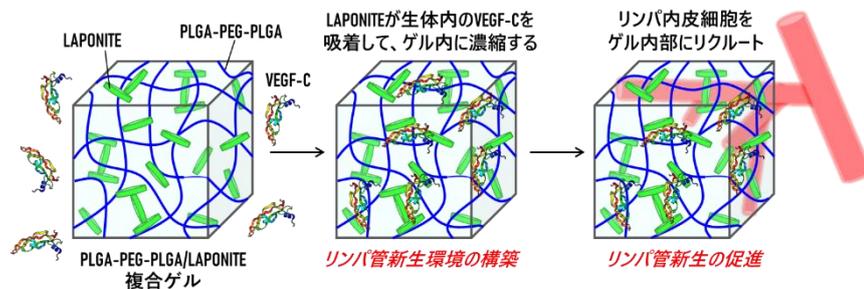


図 2. PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルの VEGF-C 吸着・濃縮特性にもとづく、リンパ管新生の促進。

PEG-PLGA とクレイナノ粒子 LAPONITE をナノスケールで複合した生体適合性ゲルを開発し（図 1）、生医学材料としての基礎・応用研究を展開している。この複合ゲルは室温では液状だが、体温に应答してゲル化する特性を示すため、低侵襲な注射投与により生体に投与できる利点をもつ。近年、マウスに投与したゲルが、LAPONITE の分子吸着特性に基づき、リンパ管新生を促すサイトカイン VEGF-C を生体内で吸着し、ゲル内に濃縮することを見出した。つまり、リンパ管新生に適した環境がゲル内に構築されると示唆された。そこで、複合ゲルをリンパ管欠損モデルマウスに投与すると、リンパ管が新生することを発見した。以上の背景および応募者の知見にもとづき、本研究課題ではこの複合ゲルを用いて画期的なリンパ管再生技術を開発する（図 2）。

2 研究方法・研究内容

(1) 最大のリンパ管再生効果を示す複合ゲル組成の最適化

PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルでは、PLGA-PEG-PLGA 濃度および LAPONITE 濃度を広く変化させてゲルを作製することができる。また、PLGA-PEG-PLGA 濃度および LAPONITE 濃度を変化させると、コラーゲンなど様々な生体物質の吸着・濃縮特性が変化することも分かっている。さらに、限られたいくつかの複合組成のみで試した結果だが、PLGA-PEG-PLGA 濃度および LAPONITE 濃度を変化させると、リンパ管新生促進効果に変化することを見出している。つまり、ゲルの複合組成はリンパ

管再生効果を決める重要な因子であり、複合組成の最適化により、最大の再生効果が得られるものと示唆される。しかし、現時点で、ゲル複合組成の最適化は達成できていない。そこで本研究項目では、複合ゲルの組成について検討し、最大のリンパ管再生効果が得られるゲル複合組成の最適化を目指す。具体的には、PLGA-PEG-PLGA 濃度を 3~10 wt%、LAPONITE 濃度を 0.9%~1.4 wt%まで変化させて作製した各種複合ゲル上にリンパ管内皮細胞を播種し、VEGF-C を含む培地中で培養し、細胞の遊走・増殖・組織化（管状構造形成）について比較検討した。

また、これらの *in vitro* 実験により得られた知見をもとに、いくつかの組成に絞り込み、それらの組成を有する複合ゲルを用いて下肢リンパ管欠損モデルマウスのリンパ管切断部位に投与し、リンパ管再生効果を評価した。麻酔下でマウス

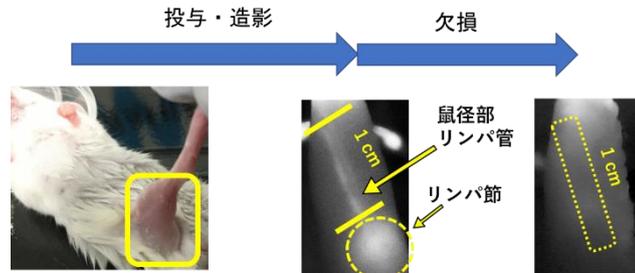


図 3. リンパ管損傷モデルマウス作製の確認、およびインドシアニンググリーンをプローブとして用いた赤外線スコープによる造影画像。

(ICR、5 週齢、雌) 下肢脛部の皮膚および筋層をメスで切開した後、足背部にインドシアニンググリーンとパテントブルーの混合溶液を注射投与し、目視および赤外線スコープで観察し、リンパ管を確認した。リンパ管を 10 mm 切断した後、筋層および皮膚を縫合し、自由飼育した。3 日後、再度足背部にインドシアニンググリーンとパテントブルーの混合溶液を注射投与し、これらの色素液が切断部位から漏れ出てきており、また造影もされないことから、リンパ管損傷モデルマウスの作製を確認した (図 3)。リンパ管損傷モデルマウスの組織切断部位に、異なる組成の PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合水溶液を注射投与し、投与部位でゲル形成させた。経時的に足背部にインドシアニンググリーン溶液を注射投与して造影し、リンパ管の新生・再生およびリンパ液の流れ（機能面）を評価した。リンパ管の新生・再生に変化がない状態が 1 週間継続した後、マウスを安楽死させてゲル投与部を含む周辺組織を丁寧に取り出し、ホルマリンで固定化した。凍結切片作製装置を用いて、固定化した組織を薄切し、リンパ管特異マーカーの抗体を用いた免疫染色により、組織レベルの再生について評価した。これらの結果より、機能面および組織面から最大の再生効果を与える複合ゲル組成を決定した。

(2) 複合ゲルによるリンパ浮腫治療効果の検証

複合ゲルのリンパ管再生作用によるリンパ浮腫治療効果を評価するため、リンパ浮腫モデルマウスを作製した。マウス尻尾の皮膚を 2~3 mm 完全に欠損させることで皮下リンパ

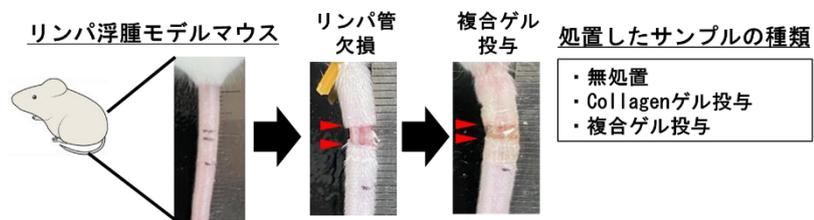


図 4. 尻尾のリンパ浮腫モデルマウスの作製および複合ゲルによる処置方法。

管を欠損させ、さらに欠損部位を焼くことで残存リンパ管を完全に欠損させた。その後 28 日間自然飼育させて尻尾の直径を測定すると、欠損前の 1.7 倍程度に増大したことから、リンパ浮腫モデルを作製できていることを確認した (図 4)。そこで、リンパ管欠損後に複合ゲル (P10L1.1) およびコラーゲンゲル (ポジティブコントロール) を塗布し、傷口

保護のためテガダームを巻き付けた。尻尾直径の経時変化を 28 日間測定し、最終的に尻尾の組織を取り出して切片を作製し、様々な染色を行いリンパ管の再生及びリンパ浮腫改善の評価を行った。

3 研究成果

（1）最大のリンパ管再生効果を示す複合ゲル組成の最適化

これ以降、複合ゲルの名称を PLGA-PEG-PLGA 濃度および LAPONITE 濃度で表す。例えば、PLGA-PEG-PLGA が 10 wt%、LAPONITE が 1.1 wt% で混合して作製した複合ゲルを P10L1.1 と表記する。無処置マウス群および優れた再生医療用材料であるコラーゲンゲル投与群では、切断部位よりも近位側にリンパ管造影が見られず、リンパ管の新生は起こっていないことを確認した（図 5）。これに対して、複合ゲル投与群では、いずれのゲル組成でも、切断部位より近位側に数多くの新生リンパ管が認められ、複合ゲルによるリンパ管新生促進効果が認められた。特に、LAPONITE 濃度が 1.1% のシリーズ（P3L1.1、P5L1.1、P10L1.1 ゲル）では、太くて長いリンパ管の新生を確認した（図 5 中の黄矢印）。特に、P3L1.1 および P10L1.1 投与群では鼠

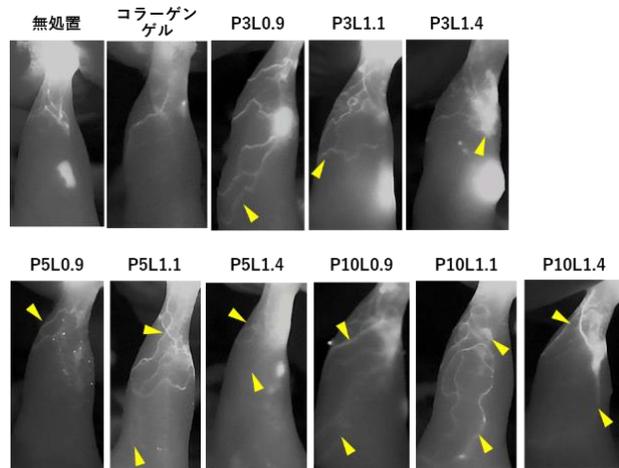


図 5. 各種複合ゲルで 28 日間処置したリンパ管欠損マウスのリンパ管造影画像。

尾リンパ管が造影されたことより、新生リンパ管と鼠尾リンパ節の連結が示された。また、新生リンパ管を含む組織切片の抗 LYVE-1 による免疫染色の結果、P3L1.1 および P10L1.1 投与群で多くの LYVE-1 陽性環状構造が認められ、環状構造体の直径は正常なリンパ管と同等であったことより、リンパ管新生を確認した。

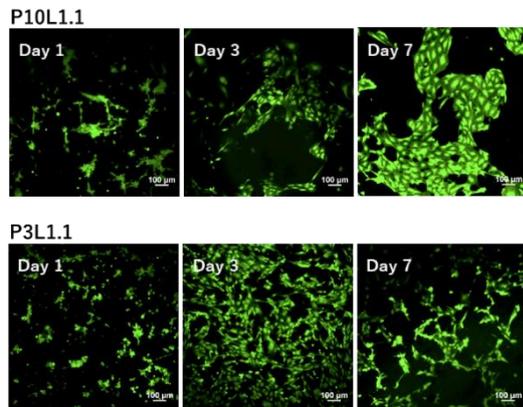


図 6. 複合ゲル上で培養したリンパ内皮細胞の経時的な蛍光顕微鏡画像。

次に、複合ゲルとリンパ内皮細胞との相互作用を解析するため、P3L1.1 および P10L1.1 ゲル上でリンパ内皮細胞を培養し、特有のチューブ様構造の形成を評価した（図 6）。P3L1.1 ゲルと比べ、P10L1.1 ゲルでより多くのチューブ様構造が確認されたことより、P10L1.1 ゲルはリンパ内皮細胞の組織化を促進する足場環境を提示していると示唆された。以上の結果より、最大のリンパ管新生効果が得られるゲル組成は P10L1.1 であると判断した。

（2）複合ゲルによるリンパ浮腫治療効果の検証

尻尾のリンパ浮腫モデルマウスに対して、collagen ゲル投与群では浮腫がまったく改善されず、28 日後でも無処置群と同程度の浮腫を継続した（図 7）。これに対して、複合

ゲル（P10L1.1）投与群では、投与7日後まではリンパ浮腫が続いたが、その後は徐々に尻尾直径が減少し、腫れが治まることを確認した。また、最終的に28日後には、複合ゲル投与群の尻尾直径は正常マウスと同程度にまで近づいた。

そこで、リンパ管内皮細胞のマーカーLYVE-1の免疫染色により、損傷部組織を解析した結果、複合ゲル投与群のみで損傷部位にリンパ管の新生が確認された。また、新生リンパ管の密度や直径は、正常な尻尾のリンパ管と同程度であった。さらに、複合ゲルにより新生したリンパ管はクリアに造影され、組織液を回収する機能をもつことを確認した。以上の結果より、複合ゲルはリンパ管新生作用をもち、これによりリンパ浮腫を改善することが分かった。つまり、PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルは、リンパ管再生にもとづくリンパ浮腫治療に有用な世界初の材料であることを実証した。

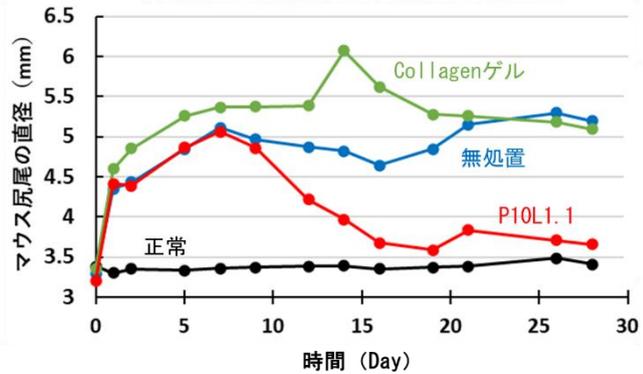
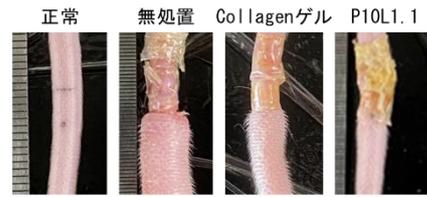


図 7. 複合ゲルおよびコラーゲンゲルで 28 日間処置したリンパ浮腫モデルマウスの尻尾の画像と尻尾直径の経時変化。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究課題の成果物である PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルは世界初のリンパ浮腫治療材料であり、安全な物質のみで構成されることが特長である。さらに、この材料は細胞を使用しない点も優位な特長であるため、医療応用につなげやすいと期待される。この成果を兵庫県内の医療系研究機関の研究者と共有し、共同研究への発展を探ることで、本成果を兵庫県の再生医療研究発展につなげる。