REVIEW ARTICLE

ISSN 2508-190X

CLL 2(1):11-15, 2017

www.kslymph.or.kr

후천성 림프부종 동물모델의 개발과 치료적 적용

성균관대학교 생명공학대학 유전공학과

노강산, 이석찬

Therapeutic Approaches on Acquired Lymphedema using a Newly Developed Mouse Limb Model

Kangsan Roh and Sukchan Lee

Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, Korea

Acquired lymphedema is the serious side-effect caused by lymphatic disorder through aggressive cancer therapy. Although a high incidence of acquired lymphedema after cancer treatment has been reported in various types of cancer, there is no definite cure to reduce lymphedema, prevent infection, and reduce complications due to the lack of understanding in the biology of lymphedema development. A reliable and reproducible animal model is required to understand the molecular mechanisms involved in lymphedema formation and to study new therapeutic approaches for lymphedema. Therefore, we developed the lymphedema mice showing high reliability and reproducibility through damages of the specific combination including lymph nodes and lymphatic vessels. This novel acquired lymphedema animal could provide the standard model system to study lymphedema therapies.

Key Words: Acquired lymphedema · Lymphangiogenesis · Hyaluronic acid · Adipose tissue accumulation · Fibrosis and irradiation

서 론

림프부종은 림프계 손상에 따른 림프계 기능 이상으로 인해 다량의 간질 단백질이 함유된 림프액이 국부적으로 축적되는 일련의 병리학적 상태를 말한다[1,2]. 후천성 림프부종은 수술요법, 화학요법, 방사선 조사법 등 암에 대한 강도 높은 수술적 치료 과정 중 림프절 절제에 의해 발생한다[3]. 후천성 림프부종은 둔통, 피부 이상감각, 무게감과 같은 증상을 유발하고 비정상적인 크기의 부종을 형성시켜 암환자들의 정상적인 사회활동을 불가능하게 하며, 그들의 삶의 질과 재활의지를 크게 감소시킨다[4-6]. 여성암 발생률 1위인 유방암(breast cancer) 환자의 49%에서 발생하는 후천성 림프부종은 악성 흑색종(melanoma) 환자의 16%, 비뇨기암(genitourinary cancer) 환자의 10%, 두경부암(head and neck cancer) 환자의 6%, 전체 암환자의 10% 이상에서 발생하는 심각한 암 치료 부작용이지만, 지금까지 확실한 치료법이 밝혀지지 않았다[7-14]. 림프부종은 병변의 생리학적, 분자생물학적 특징과 발병 메커니즘이 정확하게 밝혀지지 않았기 때문에 종양치료 후 림프부종 유발의 예단과 초기 치료가 어렵다. 아직까지 명확하게 밝혀지지 않은 림프부종 증상에 대한 규명과 림프부종 형성과정에서의 분자생물학적 메커니즘에 대한 이해는 림프부종 완화 또는 완치에 대한 새로운 치료법을 제시하기 위해 필수적이

▸ Received: April 4, 2017, ▸ Accepted: May 6, 2017

Address for correspondence: **Sukchan Lee**
Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, 2066, Seobu-ro, Jangan-gu, Suwon 16419, Korea
Tel: +82-31-290-7866, Fax: +82-31-290-7892
E-mail: cell4u@skku.edu

Copyright © 2017 Korean Society of Lymphedema
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

며, 이러한 연구를 수행하기 위해서는 적합한 림프부종 동물 모델이 필요하다. 따라서 높은 재현성을 보이는 림프부종 동물 모델을 개발하고 이를 이용하여 치료법 연구를 수행한다면, 림프부종 치료법의 안정성 제고하고 다양한 복합병증을 보이는 림프부종 환자들에 대한 맞춤형 치료법을 제시할 수 있을 것이다.

본 론

1. 동물모델 개발

최근 후천성 림프부종 치료법 개발을 위해 대체의학 분야, 완화의학 분야, 성형분야 등의 여러 연구팀들이 일부 소형 동물을 이용하여 림프부종 관련 연구를 수행해왔지만 그 치료연구의 성과는 미비하다. 림프부종 질환 연구 및 치료법 개발에 있어 한계의 원인으로는 적절한 실험동물모델의 부족에 있다. 수술적인 방법으로 설치류 꼬리의 림프관을 제거하거나, 액와 림프절(axillary lymph node)을 제거, 토끼 귀의 림프계를 손상시키는 방법으로 림프부종을 재현해왔지만, 상기 동물모델들은 실제 암환자의 환부에 해당하지 않은 부위에서의 기초적인 연구만이 진행되었을 뿐만 아니라, 유도된 림프부종의 크기가 정상부위와 차이를 보이지 않았으며, 또한 형성된 부종 증상이 만성적으로 유지되지 않은 한계를 보여왔다[15-18]. 또한 소형 동물에 국소적 방사선 조사를 할 수 있는 적절한 방사선 국소 조사기가 개발되지 않아 현재 암 치료에 많이 사용되는 방사선 조사로 인한 영향을 반영하지 못하고 있다.

림프부종 연구를 위한 적절한 동물모델의 개발과 이용은 염증 반응에서 림프관의 기능 및 조직적 변화를 이해하는 데부터 시작하여 다양한 림프관 질환들을 이해하는 데 있어 근본적이고 응용 가능한 방법으로 활용될 수 있기 때문에 그 중요성이 크다고 할 수 있다. 림프부종 동물모델 개발 및 확보는 생명 현상에 대한 보다 근본적인 이해와 치료법을 찾는데 중요하다.

최근 본 연구팀은 기존 동물모델보다 환자의 증상에 더 가깝게 재현할 수 있는 진보된 형태의 후천성 림프부종 동물모델을 개발하였다[19-21]. 이 림프부종 동물 모델은 인두(electro-cautery)를 이용하여 정상 마우스의 오른쪽 서혜부 부근 특정 조합(superficial inguinal lymph node와 deep inguinal lymph node, popliteal lymph node)의 림프절을 절제하고, 오른쪽 하지 대퇴부 부근 림프관(femoral lymphatic vessel)을 2차 조직 손상 없이 차단한 후, 피하 밑 림프관이 제거하는 방법으로 제작할 수 있으며, 종양치료 후 나타나는 부종 유도와 진피층(dermal layer)에서의 지방조직 축적, 경화 현상을 나타낸다. 새롭게 개발된 림프부종 마우스는 후천성 림프부종의 예방 및 치료연구의 동물모델로써의 활용 가능성을 보여주었다. 이 동물모델이 재현하는 후천성 림프부종의 다양한 복합증상들은 각각의 관련 메커니즘 연구의 생체모델(*in vivo* model)로서의 역할 또한 기대된다.

2. 림프부종 모델의 활용

1) 림프부종 모델에서의 lymphangiogenesis 유도

림프계는 다량의 림프구를 포함하는 특수한 망상연결조직의 형태인 림프조직을 포함하는 다수의 조직 및 기관과 함께 림프액을 운반하는 림프관으로 구성된다[22,23]. 이러한 림프절과 림프관의 구조나 기능에 장애가 생기면 만성적인 부종, 통증, 조직의 섬유화, 지방조직 축적, 감염 등을 동반하는 림프부종이 생성된다[24]. 림프관신생(lymphangiogenesis)과 성장은 림프관 특이적 성장인자(VEGF-C, VEGF-D)와 수용체(VEGFR-3)의 작용 메커니즘과 Prox-1과 LYVE-1 (lymphatic-vessel hyaluronan receptor-1) 및 VEGFR-3, podoplanin 등의 발현에 의하여 림프관 내피세포들이 분열, 증식, 분화하여 새로운 림프관을 형성하는 과정을 말한다[25-28]. 림프관신생 유도는 림프부종의 근본적 치료의 대안으로 제시 되어왔다. 이에 VEGF-C 및 VEGF-D 처리 또는 지방줄기세포를 이용한 줄기세포 치료방법이 임상적 연구가 진행되고 있지만, 아직 동물 실험에서의 효과만 있을 뿐 치료제로의 상용화가 이루어지지 못하고 있다[18,29]. 또한 최근 보고된 줄기세포를 이용한 치료법은 암세포의 전이 또는 암세포로의 유도를 촉진시킬 수 있는 한계점이 있어 임상 실험에 많이 활용되지 못하고 있다.

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 선형의 고분자, 비황산화(non-sulfated) 글리코사미글리칸(glycosaminoglycan)으로서 (-)극성을 띄고 있어 물(H_2O)과 강하게 결합하고 조직 손상 시 inflammation response를 증가시키는 특징을 가지고 있다[30]. 이러한 특징과 더불어 림프부종 환자군의 림프부종

부위가 정상인의 같은 부위보다 HA가 8배 이상 높다는 임상 정보를 토대로 HA를 효과적으로 분해할 수 있는 효소를 외과적 시술을 통해 제작한 후천성 림프부종 동물 모델에 투여하여 증상 완화 효과를 관찰하였다[31]. 부종의 물리적 감소뿐만 아니라, 림프관 내피세포 바이오마커 LYVE-1과 VEGFR-3의 발현이 현저하게 증가하였고, 림프관조영술을 통해 외과적 시술에 의해 차단되었던 림프부종 부위의 림프계가 다시 복구가 된 것을 확인하였다[19]. 이러한 실험적인 관찰에 근거하여 HA size 조절에 의한 림프관신생의 촉진은 향후 림프부종 치료에 중요한 전략적 접근이 될 것이다.

2) 림프부종 모델에서의 adipogenesis 억제

지방부종(lipedema)는 림프관에 지방(lipid)이 침적되어 부종이 형성되는 질환으로서 림프부종과 그 생리학적 특징이 매우 유사하다[32]. 또한 비만 환자에게서 만성 림프부종이 형성된다는 관련 임상 보고와 함께 림프액 정체에 의한 지방세포 수 증가와 비대로 인한 지방 침적 보고 등 지방형성 메커니즘과 림프부종과의 상관관계에 대한 관심이 증가하는 추세이다[33-35]. 하지만 아직까지는 림프액 구성 물질 중 특정 요인과 지방세포 분화 간의 구체적 인과관계에 대한 이해는 부족하다. 최근 본 연구팀은 새롭게 개발된 후천성 림프부종 동물모델의 질환 유도 부위의 진피부위에서 지방세포 분화에 따른 지방의 침적이 현저하게 증가한 것을 관찰하였다. 또한 해당 조직의 RNA와 단백질에서 지방세포 분화의 바이오마커인 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)와 CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBP/α), fatty acid binding protein 4 (FABP4), glucose transporter type 4 (GLUT4)와 같은 지방세포화 인자(adipogenic factor)들이 정상 조직보다 발현이 증가한 사실을 확인하였다[36-38]. 이를 바탕으로 기존에 복부 내장지방을 우선적으로 분해하는 메커니즘을 활성화시켜[38], 비만 치료제로서의 가능성이 확인된 히알루로니다제(hyaluronidase)를 림프부종 동물모델 환부에 처리하였을 때 부종의 완화 효과를 확인하였다[19].

3) 림프부종 모델에서의 fibrosis 치료

림프부종의 장기화(림프부종 2기)는 진피층에 두껍게 섬유화(fibrosis)가 진행되어 외모의 변형이 일어나며 치료가 어렵다[39]. 최근 섬유화 억제를 타겟으로 림프부종 치료 전략이 대두되고 있다. 림프부종 환자들에서는 TGF-β+positive 세포와 콜라젠(collagen)의 축적이 관찰된다[40]. 한 임상보고에 따르면, Th2 세포의 분화를 유도하는 사이토카인(cytokine)인 인터류킨-4(IL-4)의 항체 투여가 림프부종 내 섬유화에 치료효과를 보이고 림프부종을 완화한 사실이 확인되었다[41].

최근 림프부종 동물모델을 이용하여 T cell 활성과 T-helper 1 (Th1)-Th2 cell 분화에 관여하는 수용체인 CD44의 기능에 주목하여, CD44의 리간드인 HA의 조절을 통한 림프부종 내 섬유화 억제 연구를 진행하였다[20]. 작은 size의 HA는 IFN-γ와 IL-12 및 다양한 케모카인(chemokine)들의 발현을 증가시켜 Th1 분화를 증진시킨다. 이를 토대로, HA 분해 효소를 피하 투여하였을 때, 림프부종 내 콜라젠 축적과 근섬유아세포(myofibroblast)의 분화가 감소하였고, 항섬유화 유전자들의 발현이 증가하였다. 분해된 HA의 절편은 IFN-γ의 발현과 Th1 cell의 수가 증가하였고, IFN-γ의 antagonist인 IL-4와 IL-6의 레벨이 감소하였다. 림프부종 모델을 이용하여 수행한 실험에서 섬유화를 억제함으로써 만성 림프부종의 치료효과가 향상됨을 보여주었다.

3. 모델의 완성: Local lead shield의 필요성

외과적인 시술만을 통해 만성 림프부종을 유도하는 것은 아직 한계가 있다. 소형 동물의 특성상 자연적인 회복능력이 뛰어나 장기적인 부종의 유도가 제한적이기 때문에 방사선 조사 등 추가적인 과정이 필요하다. 외과적 시술과 방사선 조사를 통해 제작된 림프부종 동물모델 시스템은 장기적 부종 유도가 가능하여 기존의 림프부종에 대한 연구에 분자생물학적인 방법을 도입할 수 있게 한다[42].

최근 본 연구팀은 방사선 조사에 따른 조직의 반응을 핵물리학적 시뮬레이션을 통해 확인하여 실제 환자에게 수행되는 방사선 치료를 동물 모델에 적용시킬 수 있는 소동물용 방사선 국소조사 차폐기를 개발하였다[43]. 방사선 국소조사 차폐기는 원하는 부위에만 방사선이 투과하고 나머지 부분은 방사선으로부터 완벽하게 차폐될 수 있는 형태로 고안되었으며, 이를 통해 방사선 조사를 이용한 종양조직 제거 과정에서의 림프계 관련 조직 손상을 동물모델에서 재현할 수 있어 더욱 진보된 림프부종 동물모델을 개발에 활용될 수 있다. 소동물

용 국소 조사 방사선 차폐기는 방사선 발생 장치의 수리/개조가 아닌 실험동물의 차폐에 초점을 맞추어, 실험동물에 원하는 부위에만 방사선을 노출시키고, 그 이외의 부분을 완벽하게 차폐하여 외과적 수술과 방사선 조사의 복합적인 처리를 가능하게 함으로써 현재 밝혀지지 않은 림프부종 발생 메커니즘에 대한 정확한 이해와 이를 제어할 수 있는 물질의 개발을 가능하게 하여 효과적인 암 치료 수술에 의한 합병증 연구에 이바지할 것이다.

결 론

대사 메커니즘 별 분자생물학적인 연구와 치료 전략의 효과적 증명 등의 림프부종에 대한 원활한 연구를 위해서는 후천성 림프부종 환자의 다양한 병리학적 증상을 재현할 수 있는 후천성 림프부종 마우스 모델을 지속적으로 제작할 수 있는 프로토콜의 개발이 중요하다. 재현성 있고 신뢰할 수 있는 림프부종 마우스 모델은 우리에게 림프 부종에 대한 중요한 생물학적 정보를 제공할 뿐만 아니라, 유도 메커니즘이나 림프 부종 치료에 대한 연구에서 중요하게 이용될 수 있다. 아울러 외과적 시술과 방사선 국부 조사를 통해 제작된 동물 모델은 병용 요법을 통한 후천성 림프부종 치료 연구 뿐만 아니라, 방사선 노출 시 발생할 수 있는 조직 내 영향 및 관련 유전자들의 기능 구명에도 활용될 수 있을 것이다.

Conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Global Ph.D. Fellowship Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), which is funded by the Ministry of Education (2015H1A2A1034469).

REFERENCES

1. Rockson, S.G. Lymphedema. The American journal of medicine 2001;110(4):288-295.
2. Shin, W.S., A. Szuba, and S.G. Rockson. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. Lymphatic research and biology 2003;1(2):159-169.
3. Korpan, M.I., R. Crevenna, and V. Fialka-Moser. Lymphedema: a therapeutic approach in the treatment and rehabilitation of cancer patients. American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation 2011;90(5):69-75.
4. Passik, S.D. and M.V. McDonald. Psychosocial aspects of upper extremity lymphedema in women treated for breast carcinoma. Cancer 1998;83(S12B):2817-2820.
5. McWayne, J. and S.P. Heiney. Psychologic and social sequelae of secondary lymphedema. Cancer 2005;104(3):457-466.
6. Ridner, S.H. Quality of life and a symptom cluster associated with breast cancer treatment-related lymphedema. Supportive Care in Cancer 2005;13(11):904-911.
7. Petrek, J.A., et al. Lymphedema in a cohort of breast carcinoma survivors 20 years after diagnosis. Cancer 2001;92(6):1368-1377.
8. Kissin, M., et al. Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer. British Journal of Surgery 1986;73(7):580-584.
9. DiSipio, T., et al. Incidence of unilateral arm lymphoedema after breast cancer: a systematic review and meta-analysis. The lancet oncology 2013;14(6):500-515.
10. Schook, C.C., et al. Primary lymphedema: clinical features and management in 138 pediatric patients. Plastic and reconstructive surgery 2011;127(6):2419-2431.
11. Kim, J.H., et al. Incidence and risk factors of lower-extremity lymphedema after radical surgery with or without adjuvant radiotherapy in patients with FIGO stage I to stage IIA cervical cancer. International Journal of Gynecological Cancer 2012;22(4):686-691.
12. Wilke, L.G., et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. Annals of surgical Oncology 2006;13(4):491-500.
13. Chang, S.B., et al. Prospective assessment of postoperative complications and associated costs following inguinal lymph node dissection (ILND) in melanoma patients. Annals of surgical oncology 2010;17(10):2764-2772.
14. Hunt, K.K., R. Askew, and J.N. Cormier. Measuring lymphedema in patients with breast cancer: go with the flow? Breast cancer research and treatment 2009;117(3):559-560.
15. Saito, Y., et al. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. Circulation 2006;114(11):1177-1184.
16. Kashiwagi, S., et al. Role of COX-2 in lymphangiogenesis and restoration of lymphatic flow in secondary lymphedema. Laboratory investigation 2011;91(9):1314-1325.
17. Gong Kang, H. and H. Yuan Pai. An experimental model for lymphedema in rabbit ear. Microsurgery 1983;4(4):236-242.

18. Yoon, Y.-s., et al. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. The Journal of clinical investigation 2003;111(5):717-725.
19. Roh, K., et al. Therapeutic effects of hyaluronidase on acquired lymphedema using a newly developed mouse limb model. Experimental Biology and Medicine 2017;242(6): 584-592.
20. Cho, S., et al. Hydrolysis of Hyaluronic Acid in Lymphedematous Tissue Alleviates Fibrogenesis via TH 1 Cell-Mediated Cytokine Expression. Scientific Reports 2017;7(1):35.
21. Lee, J., et al. Proteomic profiling of lymphedema development in mouse model. Cell biochemistry and function 2016;34(5):317-325.
22. Rossant, J. and L. Howard. Signaling pathways in vascular development. Annual review of cell and developmental biology 2002;18(1):541-573.
23. Mebius, R.E. Organogenesis of lymphoid tissues. Nature Reviews Immunology 2003;3(4):292-303.
24. De Togni, P., et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. Science, 1994;264(5159):703-708.
25. Mäkinen, T., et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF C/D receptor VEGFR-3. The EMBO journal 2001;20(17): 4762-4773.
26. Prevo, R., et al. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. Journal of Biological Chemistry 2001;276(22):19420-19430.
27. Breiteneder-Geleff, S., et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. The American journal of pathology 1999;154(2):385-394.
28. Schacht, V., et al. T1α/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. The EMBO journal 2003;22(14):3546-3556.
29. Hwang, J.H., et al. Therapeutic lymphangiogenesis using stem cell and VEGF-C hydrogel. Biomaterials 2011;32(19): 4415-4423.
30. Weissmann, B. and K. Meyer. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical Cord1, 2. Journal of the american chemical society 1954;76(7):1753-1757.
31. Liu, N. and L. Zhang. Changes of tissue fluid hyaluronan (hyaluronic acid) in peripheral lymphedema. Lymphology 1998;31(4):173-179.
32. Wold, L.E., E.A. Hines, and E.V. Allen. Lipedema of the legs: a syndrome characterized by fat legs and edema. Annals of internal medicine 1951;34(5):1243-1250.
33. Helyer, L.K., et al. Obesity is a risk factor for developing postoperative lymphedema in breast cancer patients. The breast journal 2010;16(1):48-54.
34. Mehrara, B.J. and A.K. Greene. Lymphedema and obesity: is there a link? Plastic and reconstructive surgery 2014; 134(1):154e.
35. Bolan, G.A. and J.N. Wasserheit. The emerging threat of untreatable gonococcal infection. The New England journal of medicine 2012;366(6):485.
36. Rosen, E.D., et al. PPARγ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Molecular cell 1999; 4(4):611-617.
37. Rosen, E.D., et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes & development 2000;14(11):1293-1307.
38. Tontonoz, P. and B.M. Spiegelman. Fat and beyond: the diverse biology of PPARγ. Annu. Rev. Biochem. 2008; 77:289-312.
39. Wynn, T.A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. Nature Reviews Immunology 2004;4(8):583-594.
40. Torrisi, J.S., et al. Lymphaticovenous bypass decreases pathologic skin changes in upper extremity breast cancer-related lymphedema. Lymphatic research and biology 2015; 13(1):46-53.
41. Avraham, T., et al. Th2 differentiation is necessary for soft tissue fibrosis and lymphatic dysfunction resulting from lymphedema. The FASEB Journal 2013;27(3):1114-1126.
42. Hinrichs, C.S., et al. Lymphedema secondary to postmastectomy radiation: incidence and risk factors. Annals of surgical oncology 2004;11(6):573-580.
43. Lee, S.C., et al. Radiation shield to locally irradiate radiation. 2015, Korean Intellectual Property Office.