

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22941

研究課題名（和文）リンパ節介在血行性転移理論に関する実験的研究

研究課題名（英文）An experimental study on the theory of lymph node-mediated hematogenous metastasis

研究代表者

小玉 哲也（KODAMA, Tetsuya）

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：40271986

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本課題は、センチネルリンパ節が遠隔転移の起点になり得ると考えるリンパ節介在性血行性転移理論を実験的に検証するものである。本研究成果は以下の2点に要約される。(1) リンパ節転移の初期段階において血流欠損が形成される。(2) 頭頸部がん患者のリンパ節病理像を精査し、リンパ節被膜を貫く穿通枝の存在を確認した。リンパ節介在血行性転移理論とは、腫瘍細胞がリンパ節の辺縁洞に転移・増殖した初期段階における血行性転移を示す。今後は、本理論の実験的事実の積み上げが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、本理論が適用される転移リンパ節のステージを明らかにした。本理論に基づきセンチネルリンパ節からの遠隔転移を予防するには、原発巣が確認された段階で、原発巣周囲に確認される全てのリンパ節に対して予防的治療を実施することが求められる。本研究成果は、本理論の学術的根拠ならびに転移初期段階にあるリンパ節の予防的治療の理論的根拠を提示するものである。

研究成果の概要（英文）：This proposal is to experimentally verify the theory of lymph node-mediated hematogenous metastasis, which considers that the sentinel lymph node can be the origin of systemic metastasis. The results of this study can be summarized in the following two points. (1) A perfusion defect is formed in the early stage of lymph node metastasis. (2) The pathological images of lymph nodes in patients with head and neck cancer were carefully examined, and the presence of perforating branches penetrating the lymph node capsule was confirmed. The lymph node-mediated hematogenous metastasis theory accurately describes hematogenous metastasis in the early stage when tumor cells have metastasized and proliferated in the marginal sinuses of lymph nodes. In the future, it is necessary to accumulate experimental evidence for this theory.

研究分野：医用システム

キーワード：リンパ節転移 転移 解剖 血流欠損

1. 研究開始当初の背景

従来のリンパ節転移に関する腫瘍動態は、原発巣からの離脱、新生リンパ管を介した所属リンパ節への転移、数珠状に繋がるリンパ節介したリンパ系内の移動、静脈系を介した遠隔臓器への転移、であると考えられてきた。最近、研究代表者らは、腫瘍細胞が輸入リンパ管からリンパ節の辺縁洞に侵入する段階において、辺縁洞を貫通する静脈に浸潤し、腫瘍細胞は血行性として遠隔臓器に転移することを見出し、この転移形態をリンパ節介在血行性転移理論として提唱した。

2. 研究の目的

本研究では、リンパ節内の血管構造、血流の流れ、病理解析からリンパ節介在血行性転移理論を実験的検証することを目的とする。

3. 研究の方法

東北大学遺伝子組換え実験計画書および東北大学動物実験計画書の承認後に、本実験を実施した。

(1) リンパ節表層の血管の流れ

2種類の蛍光溶液として、NBD-リボソーム(励起: 463 nm; 蛍光: 536 nm) および 5(6)-carboxyfluorescein (MW: 376; 励起: 492 nm; 蛍光: 517 nm)を使用した。NBD リボソームの膜組成は、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC; MC8080; 日油), N-(carbonylmethoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2000; DSPE-020CN; 日油), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-DPPE; 日油) からなり、モル比は 92 : 6 : 2 である。粒子径・ゼータ電位解析装置 (ELSZ-2; 大塚電子) を用いて測定した平均粒子径は 200 nm, ゼータ電位は -1.5 mV であった。リンパ節内の血管構造の解析のために、リンパ節腫脹マウス MXH10/Mo-*lpr/lpr* (MXH10/Mo/*lpr*) を使用した。このマウスを麻酔下におき、腸骨下リンパ節 (SiLN) を露出させ、蛍光溶液を SiLN に注射した。実体蛍光顕微鏡で蛍光色素の流れを可視化した。

(2) リンパ節内の血管構造

血管造影用に、硫酸バリウム、ゼラチン、赤色アクリルバリウムからなるバリウム造影剤を準備する。造影剤の大きさは $1.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ であった[1]。つぎに、マウスに麻酔をかけ、37°C パッドの上に置いた。シリンジポンプ (Legato100; KD Scientific) を用いて造影剤を SiLN に注入した。造影剤注入後、SiLN および固有腋窩リンパ節 (PALN) を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で 4°C, 4 日間固定した。最後に固定したリンパ節をマイクロ CT スキャナー (8 ~ 20 μm , scanXmate/E090, コムスキャンテクノ株式会社) を用いて解析をおこなった。取得したスライスタータは 3D 画像としてレンダリングした (Amira-Avizo, Thermo Scientific) [2]。

(3) リンパ節内の腫瘍増殖

リンパ節内の腫瘍増殖形態を明らかにするために、ルシフェラーゼ遺伝子と蛍光強化型緑色蛍光遺伝子の融合遺伝子を発現する KM-Luc/GFP 悪性線維性組織球腫様細胞およびルシフェラーゼ遺伝子を発現する FM3A-Luc マウス乳腺がん細胞を用いた。リンパ節転移モデルを作製するために、細胞混合液を準備する。細胞混合液は 20 μL の PBS と 40 μL のマトリゲル (400mg/mL) からなり、この溶液に 1.0×10^4 個の KM-Luc/GFP 細胞または 1.0×10^4 個の FM3A-Luc 細胞を混合させた。つぎに、マウスを麻酔下におき、混合溶液を SiLN に注入し、リンパ管を介して PALN に転移させる。コントロールとして 60 μL の PBS を用いた。移植日を day 0 とした。腫瘍増殖・転移の評価に、生物発光イメージング (IVIS; PerkinElmer) を用いた。計測日は KM-Luc/GFP 細胞では day 0, day 4, day 7, day 10, FM3A-Luc 細胞では day 0, day 14, day 21, day 28, day 35 であった。PALN ルシフェラーゼ活性がコントロールのバックグラウンドレベル ($\sim 4 \times 10^4$ photons/sec) を超えた時点で、転移が成功したと判断した。PALN ルシフェラーゼ活性は KM-Luc/GFP 細胞では 0 日目, FM3A-Luc 細胞では 21 日目の値を用いて正規化した。

(4) 組織学的評価

実験最終日に SiLN および PALN を摘出し、10%ホルマリン 4°C で一晩固定し、脱水後、パラフィンに包埋し連続して切片(3~5µm)を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色、あるいは抗 CD31 抗体免疫染色した。組織学的画像はデジタルカメラ(DP72; オリンパス)で撮影する。

(5) ヒト頭頸部がん病理標本の解析

ヒト頭頸部がん治療時に摘出されたリンパ節の病理標本を顕微鏡下で解析する。

4. 研究成果

(1) リンパ節表層の血管の流れ

リンパ節表層には静脈が走行し、この静脈にリンパ節内の静脈が吻合する。尾静脈に NDB-リボゾームを投与すると、リンパ節表層の静脈内の血液の流れは内部から外向きであった。蛍光溶液を SiLN に投与すると、SiLN は蛍光溶液で満たされる。その後、蛍光溶液は輸出リンパ管および胸腹壁静脈に流れる。KM-Luc/GFP 細胞の移植した腸骨下リンパ節に蛍光溶液を投与すると、ほとんどの場合、蛍光溶液は胸腹壁静脈に流れ、つぎに輸出リンパ管に流れる。FM3A-Luc 細胞では、蛍光溶液は胸腹壁静脈に流れ、輸出リンパ管に流れる。この両者の蛍光色素の流動の違いは各腫瘍細胞のリンパ節内での腫瘍増殖形態の違いに起因する。

(2) リンパ節内の血管構造

KM-Luc/GFP 細胞および FM3A-Luc 細胞で形成される転移リンパ節内の血管構造を造影マイクロ CT 撮影法で精査した。腫瘍細胞の増殖によりリンパ洞ならびに血管の流れが欠損する血流欠損が確認された[3]。血流欠損は辺縁洞から形成がはじまり、辺縁洞直下の表層皮質を腫瘍細胞に置き換えながら拡大する。表層皮質には高内皮細静脈が存在し血液成分であるリンパ球の出入り口であることから、Brown ら[4]は高内皮細静脈が腫瘍細胞の血液循環への入口であると推測している。一方、われわれは、内部静脈と表層静脈を連結する穿通枝内への腫瘍細胞の侵入によって、腫瘍細胞が血液循環に入る可能性を提案した。

(3) ヒト頭頸部がん患者の組織標本

頭頸部がん患者から摘出したリンパ節の組織標本を解析し穿通枝の存在を確認した。しかし、内部血管と表層血管とが連絡している画像は観察されなかった。

以上から、腫瘍細胞がリンパ節の辺縁洞に転移・増殖した初期段階において、腫瘍細胞は穿通枝内に侵入し、遠隔転移を来す。一方、腫瘍細胞は表層被膜に浸潤・増殖し血流欠損が形成される。リンパ節介在血行性転移理論とは、腫瘍細胞がリンパ節の辺縁洞に転移・増殖した初期段階における血行性転移を的確に表現している。今後は、本理論の実験的根拠の積み上げが必要である。

参考文献

- [1] T. Kochi, Y. Imai, A. Takeda, Y. Watanabe, S. Mori, M. Tachi, T. Kodama, Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models, PLoS One, 8 (2013) e84047.
- [2] R. Iwamura, M. Sakamoto, S. Mori, T. Kodama, Imaging of the Mouse Lymphatic Sinus during Early Stage Lymph Node Metastasis Using Intranodal Lymphangiography with X-ray Micro-computed Tomography, Mol Imaging Biol, 21 (2019) 825-834.
- [3] T. Yamaki, A. Sukhbaatar, R. Kikuchi, M. Sakamoto, S. Mori, T. Kodama, Formation of Perfusion Defects in Lymph Nodes During the Early Stage of Metastasis, Research Square, 2021.
- [4] M. Brown, F.P. Assen, A. Leithner, J. Abe, H. Schachner, G. Asfour, Z. Bago-Horvath, J.V. Stein, P. Uhrin, M. Sixt, D. Kerjaschki, Lymph node blood vessels provide exit routes for metastatic tumor cell dissemination in mice, Science, 359 (2018) 1408-1411.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Kato S, Shirai Y, Motozono C, Kanzaki H, Mori S, Kodama T | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 In vivo delivery of an exogenous molecule into murine T lymphocytes using a lymphatic drug delivery system combined with sonoporation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.174 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sukhbaatar A, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Analysis of tumor vascularization in a mouse model of metastatic lung cancer. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 16029 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52144-2. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kato S, Shirai Y, Sakamoto M, Mori S, Kodama T | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Use of a lymphatic drug delivery system and sonoporation to target malignant metastatic breast cancer cells proliferating in the marginal sinuses. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 13242 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49386-5. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kikuchi R, Sukhbaatar A, Sakamoto M, Mori S, Kodama T | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 A model system for studying superselective radiotherapy of lymph node metastasis in mice with swollen lymph nodes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clin Transl Radiat Oncol | 6. 最初と最後の頁 53-57 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ctro.2019.05.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Fujii H, Horie S, Sukhbaatar A, Mishra R, Sakamoto M, Mori S, Kodama T | 4. 巻 8(5) |
| 2. 論文標題 Treatment of false・E]negative metastatic lymph nodes by a lymphatic drug delivery system with 5・E]fluorouracil. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Med | 6. 最初と最後の頁 2241-2251 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2125 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Iwamura R, Sakamoto M, Mori S, Kodama T | 4. 巻 21(5) |
| 2. 論文標題 Imaging of the mouse lymphatic sinus during early-stage lymph node metastasis using intranodal lymphangiography with X-ray micro-computed tomography | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Mol Imaging Biol | 6. 最初と最後の頁 825-834 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11307-018-01303-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fukumura R, Mishra R, Sukhbaatar A, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Effect of drug osmotic pressure on the delivery efficiency for a Lymphatic Drug Delivery System |
| 3. 学会等名 Tohoku University Forum for Creativity Thematic 2019, Cancer - from Biology to Acceptance (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sukhbaatar A, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Enhancement of Epirubicin Anticancer Activity by LDDS in Metastatic Lymph Node Mouse Model |
| 3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Fukumura R, Mishra R, Sukhbaatar A, Yadav N, Shrivastava S, Saurav S, Shiga K, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Optimized Physiochemical Properties for Lymphatic Drug Delivery System |
| 3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mishra R, Sukhbaatar A, Shrivastava S, Saurav S, Yadav N, Neetu K, Shiga K, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Flow Visualization and Lymphatic Vessel Characterization for Lymphatic Drug Delivery System |
| 3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mishra R, Sukhbaatar A, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Effect of Osmotic Pressure of drug on treatment efficacy for a Lymphatic Drug Delivery System |
| 3. 学会等名 The 4th International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development(iLIM-4) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fukumura R, Mishra R, Sukhbaatar A, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Effect of drug osmotic pressure on the therapeutic effect using a lymphatic drug delivery system |
| 3. 学会等名 The 4th International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development(iLIM-4) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小玉哲也 |
| 2. 発表標題 リンパ行性薬物送達法に関する研究 |
| 3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ariunbuyan S, Takahashi T, Mori S, Kodama T |
| 2. 発表標題 Removal of lymph nodes increases the incidence of metastasis |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 福村凌一, ラディカ ミシュラ, アリウンブヤン スフバートル, 阪本真弥, 森士朗, 志賀清人, 小玉哲也 |
| 2. 発表標題 リンパ系薬物送達システムに必要な薬物の浸透圧と粘度の最適範囲 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mishra R, Fukumura R, Ariunbuyan S, Sakamoto M, Mori S, Shiga K, Kodama T |
| 2. 発表標題 Importance of osmotic pressure for lymphatic drug delivery system |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sukhbaatar Ariunbuyan, 森士朗, 小玉哲也 |
| 2. 発表標題 Therapeutic effect of epirubicin at different osmotic pressure in metastatic lymph nodes at the early stage using lymphatic drug delivery system |
| 3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mishra Radhika, Sukhbaatar Ariunbuyan, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也 |
| 2. 発表標題 Flow dynamics of lymphatic drug delivery system in mice |
| 3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 小玉研究室ホームページ https://web.tohoku.ac.jp/kodama/achievement/ |
|--|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 山口 匡 (Yamaguchi Tadashi) (40334172) | 千葉大学・フロンティア医工学センター・教授 (12501) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|