

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650286

研究課題名(和文)リンパネットワークの3次元構造解析と機能評価

研究課題名(英文)Three dimensional structural analysis and functional evaluation of lymphatic network

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リンパネットワークは転移機序と密接に関与すると報告されるが、その構造や機能は十分に明らかにされていない。本研究では、ヒトのリンパ節と同等の大きさを有するリンパ節腫脹マウスMXH10/Mo-lpr/lprを使用し、腸骨下リンパ節から腋窩リンパ節に向うリンパ管の形態学的な特徴やリンパ管を介した転移誘導の特性を実験的に明らかにした。また、腸骨下リンパ節と腋窩リンパ節との圧力差に起因して発生するリンパ液の流動を理論的に解明した。本研究成果は今後のリンパ行性転移の作用機序の解明やリンパ行性薬剤送達法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The lymphatic system plays a crucial role in tumor formation and metastasis progression. However, its function and structure have not been investigated fully. Here we show characteristics of lymphatic network between the subiliac lymph node (SiLN) and proper axillary lymph node (PALN), and of metastasis induction via lymphatic vessel. We used MXH10/Mo-lpr/lpr inbred mice that exhibit systemic lymphadenopathy. We found that bifurcation patterns for the lymphatic vessel that lies between the SiLN and the PALN. In most cases the lymphatic vessel had at least one bifurcation. Furthermore we found that metastasis was induced in the PALN by injection of tumor cells into the SiLN. The intranodal pressure increased in the SiLN and PALN during the course of LN metastasis. The findings provide new insights relevant to the investigation of the mechanisms of lymph node metastasis and the development of treatment methods for lymph node metastasis, including drug delivery systems.

研究分野：複合領域

キーワード：リンパ節 転移 ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

リンパ管やリンパ節からなる「リンパネットワーク」は、乳癌、悪性黒色腫、頭頸部癌など多くの「がん」の転移経路であり、古くからのその重要性が指摘されてきた。しかしながら、臨床病理学的にも、実験病理学的にもリンパネットワークを明らかにした研究報告は少なく、リンパ行性転移やリンパ管新生の機序の解明、あるいは転移の診断・治療の方法論がいまだ確立されていないのが現状である。

(1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

リンパ管生長因子や分子マーカーはわずかに10年前に同定され (Alitalia et al., *Nature*, 2005), リンパ管新生, リンパ管内皮細胞の単離, リンパ行性転移などの問題が解明されつつある (Skobe et al., *Nat Med*, 2001). また, 現在の小型動物用イメージング機器の開発により, リンパ管ネットワークやリンパ節転移機序に関する研究が精力的に進められている (Kosaka et al., *J Invest Dermatol*, 2009).

(2) 着想に至った経緯

通常のマウスのリンパ節は、長径約 1~2 mm 程度であり、リンパ管やリンパ節を同定することは困難である。研究代表者らは、ヒトのリンパ節の大きさである長径約 10mm 程度までリンパ節が腫脹するマウスを使用して、リンパ節転移モデルの開発とリンパ節転移早期診断法の開発を進めてきた (2008 年度 日本癌治療学会「優秀演題賞」受賞)。このモデルでは腸骨下リンパ節から腋窩リンパ節に1本のリンパ管を介してリンパ節に腫瘍細胞が転移することが、蛍光実体顕微鏡観察と生体発光イメージング法から明らかにされている。したがって、このモデルを用いることで、X線CT、蛍光実体顕微鏡、造影超音波の画像解析から、各臓器に隣接する全ての所属リンパ節とリンパ管からなるリンパネットワークを構築することが可能であり、転移に関わるリンパネットワークの機能を解明することができるという着想に至った。

(3) これまでの研究成果を発展させる方法

研究代表者はリンパ管を介したドラッグデリバリーシステム(DDS)の基礎研究をすでに進めている。本研究において、各臓器の所属リンパとリンパ管からなるリンパネットワークを解明することができれば、既存の概念を打ち破るリンパ管経路によるセラノステイクス (Theranostics) を有する革新的なDDSが展開されるものと考えられる。

(4) 本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義
がん治療には動脈・静脈を介した血液循環に

基づいた治療が実施されているが、リンパ管を介した薬剤投与はこれまでおこなわれていない。本研究では、リンパネットワークの全容を明らかにして、これにより、革新的なリンパ管経路による薬剤投与方法の開発に展開するものである。本研究成果により、分子生物学的な転移機序の解明や、転移に関わる腫瘍細胞の流動特性、腫瘍細胞を標的にする新たな分子マーカーの開発、超早期のリンパ節転移の診断・治療法の開発が期待でき、医工学、腫瘍学、病理学、薬理学等の分野への波及も大きく普遍的である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトのリンパ節と同等の大きさを有するリンパ節腫脹マウス MXH10/Mo-*lpr/lpr* (MXH10/Mo/*lpr*) を使用して、X線CT、蛍光実体顕微鏡、小動物用高周波超音波システムから (1) 腸骨下リンパ節および腋窩リンパ節を介するリンパネットワークを明らかにして、(2) 同定されたリンパ節から下流側へのリンパ節転移を誘導することで、本リンパネットワークが病的な機能を有していることを立証し、かつ、(3) 転移に関わるリンパネットワークの実験的・理論的な解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) MXH10/Mo/*lpr* マウスの系統維持
マウスを14-16週齢まで系統維持・繁殖させる。この時点で *lpr* 遺伝子の表現形質であるリンパ節腫脹が発現し、その大きさはヒトのリンパ節と同等の長径約 10 mm になる。

(2) X線CTを用いたリンパ節内の3次元血管構造の解析

麻酔下で抗凝固薬ヘパリン 0.1 mL をマウス尾静脈投与し、つぎに血管拡張・鎮痙剤であるパバペリン塩酸塩 0.05 mL を皮下に注射する。開腹・開胸後に、左心室に穿刺し X 線造影剤であるバリトゲンゾルを 18 mL/hr で 1.5 mL をシリンジポンプで注入する。実験動物用 X 線 CT を使用して、機器の最高分解能 (ピクセルサイズ: 24 μ m, スライス厚: 24 μ m, スライス間隔: 24 μ m) で撮影をおこなう。得られたデータから 3 次元血管像を構築する。

(3) リンパネットワーク内の流れの解析

マウスを開腹して腸骨下リンパ節に蛍光分子 (FITC 5.6-Carboxyfluorescein, MW 376, Ex: 492nm, Em: 517nm; あるいはインドシアニングリーン (ICG, Ex: 800 nm, Em: 845 nm) を注射し、腋窩リンパ節に流れるリンパ管の流れを蛍光実体顕微鏡あるいは近赤外蛍光観察システムで明らかにする。

(4) リンパ節転移の誘導

ルシフェラーゼタンパクを発現する細胞株 MRL/KM-Luc および FM3A-Luc 細胞株を使用する。腸骨下リンパ節にこれらの細胞を移植し、下流側の腋窩リンパ節に転移を誘導する。転移の評価には生体発光イメージングシステムを使用する。

(5) 転移の生体分布計測

下流側のリンパ節の転移以外に、他の臓器にも転移されるかどうか検査するために、移植後、他のリンパ節、肝臓、腎臓、肺、心臓等の各臓器を摘出し、ルシフェラーゼ発現活性をルミノメータで測定する。

(6) ナノバブルと高周波超音波を用いた新生血管の評価

脂質二重膜の音響性リポソーム (ナノバブル) を使用する。膜組成は 94 mol% Distearoyl- Phosphocholine (DSPC) + 6 mol % Distearoyl- phosphoethanolamine (DSPE) - PEG- OMe であり、内部ガスは C_3F_8 ガスを使用する。移植後 0 日、6 日、10 日、14 日目に、マウス尾静脈にナノバブルを注射し、高周波超音波イメージング装置 (中心周波数 40MHz) でリンパ節の血管像を二次元的および三次元的に抽出する。また、その単位面積および単位体積当たりの血管密度を算出する。

(7) 組織学的評価

細胞移植後、リンパ節を摘出し、パラフィン切片作製後に、血管内皮細胞マーカー CD31 およびリンパ管内皮細胞マーカー LYVE-1 を免疫染色する。前述の 3- の血管抽出像は免疫染色部位に一致することを検証する。

(8) 腫瘍成長にともなうリンパ節の内部圧力計測と腫瘍流出特性の計測

移植後、リンパ節の腫瘍正着と増殖にともなうリンパ節内の圧力上昇を圧力トランスデューサーで測定する。また、輸出リンパ管に流出する腫瘍細胞の流動特性を同時に蛍光顕微鏡で観察することで、圧力計測値からリンパ管の抵抗係数、圧力損失、細胞平均流動特性を理論的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) 腸骨下リンパ節および腋窩リンパ節を介在するリンパネットワークの解明

通常のマウスのリンパ節の大きさは 1-2 mm 程度であるのでリンパ節に直接に薬剤を注射し、下流側のリンパ節に薬剤を到達させる実験系の樹立は困難であったが、本研究では MXH10/Mo/lpr マウスの腸骨下リンパ節に直接蛍光色素を投与することによって、腸骨下リンパ節内、リンパ管、腋窩リンパ節の流動場を世界で初めて明らかにした (Kodama et al. 2015)。腸骨下リンパ節から腋窩リンパ節に向かうリンパ管は通常は 1 本のリンパ管

が分岐し 2 本に分かれたり、2 本が 1 本に結合するなどの形態をとり、単管である場合は希である。X 線 CT 解析からは腸骨下リンパ節の表面上の胸腹壁静脈と内部の血管網との交通が明らかになった。

(2) 外側腋窩リンパ節と内側腋窩リンパ節のネットワーク

外側腋窩リンパ節と内側腋窩リンパ節のネットワークを調べるために、内側腋窩リンパ節に蛍光色素を投与あるいは外側腋窩リンパ節に蛍光色素を投与した。内側腋窩リンパ節から外側腋窩リンパ節への流れは存在せず、外側腋窩リンパ節から内側腋窩リンパ節への流れが存在することが明らかになった (Kodama et al. 2015)。

(3) 腸骨下リンパ節から腋窩リンパ節への転移誘導

腸骨下リンパ節に腫瘍細胞を移植することで腋窩リンパ節に転移を誘導することに成功した。腋窩リンパ節への転移は KM-Luc/GFP 細胞は移植後 4-6 日、FM3A-Luc 細胞が 9 日前後であった。細胞の増殖速度が速いほど、転移が確認される日数が短くなる傾向にある。腸骨下リンパ節への腫瘍細胞の移植は腋窩リンパ節だけでなく、肺、肝臓にも確認された。肺、肝臓への転移は、腸骨下リンパ節に腫瘍細胞が移植された際にリンパ節上の胸腹壁静脈を介してこれらの臓器に播種されることが示唆された。

(4) リンパ節内の圧力測定

腸骨下リンパ節に腫瘍細胞を移植後に、経時的に腸骨下リンパ節ならびに腋窩リンパ節の内圧を計測した。腫瘍細胞移植後に、腸骨下リンパ節ならびに内側腋窩リンパ節に圧力は上昇することが明らかになった。固形腫瘍細胞の場合には腫瘍新生血管からの液体の流出とリンパ管の液体回収能の低下によって固形腫瘍内の圧力が増加すると報告される。しかしながらリンパ節の場合には腫瘍新生血管が成長する前の段階、すなわち niche 形成の段階で圧力増加が観察されることから、固形腫瘍の場合に観察される圧力上昇の機序と異なった作用で圧力上昇が発生するものと判断された (特願 2014-064466)。

(5) 転移に関わるリンパネットワークの実験的・理論的な解明

腫瘍細胞を腸骨下リンパ節に移植すると腫瘍増殖にともない腸骨下リンパ節ならびに腋窩リンパ節内の圧力が増加することが示された。腸骨下リンパ節と腋窩リンパ節の圧力をもとにリンパ管内を流れるリンパ流の速度を求めた。また、圧力計測値からリンパ管の抵抗係数、圧力損失、細胞平均流動特性を理論的に明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kodama T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S. Visualization of flow fields in lymphatic vessels and lymph nodes using a mouse model to test a lymphatic drug delivery system. Biomed Opt Express. 2015; 6(1):124-34. doi: 10.1364/BOE.6.000124. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

八巻哲平, 柳沢ゆかり, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. マイクロ CT を用いた転移リンパ節内の血管構造解析. 日本機械学会第 27 回バイオエンジニアリング講演会. 2015 年 1 月 9 日-10 日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

八巻哲平, 柳沢ゆかり, 阪本真弥, 森士朗, 志賀清人, 小玉哲也. マイクロ CT を用いた転移リンパ節内の血管構造解析. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日-27 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

柳沢ゆかり, 八巻哲平, 志賀清人, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. マイクロ CT を用いた転移リンパ節内血管構造解析に関する研究. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日-27 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

柳沢ゆかり, 野呂和正, 伊藤康一, 清水良央, 森士朗, 小玉哲也. マイクロ CT を用いた転移リンパ節内血管構造解析に関する研究. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会. 2014 年 7 月 30 日-31 日, 慶應義塾大学薬学部(東京都港区)

Yamaki T, Yanagisawa Y, Kochi T, Mori S, Kodama T. Study of diagnosis of lymph node metastasis by microCT. 8th Student Workshop East Asia Consortium on Biomedical Engineering, Mar 12-13, 2014, Aoba Memorial Hall, Aobayama Campus, Tohoku University, Sendai, Miyagi.

畠山友梨子, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. リンパ行性薬剤送達法におけるリンパ管内の薬剤動態の観察. 日本機械学会 2013 年度年次大会. 2013 年 9 月 8 日-11 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市).

Yanagisawa Y, Ito K, Noro K, Aoki T, Mori S, Kodama T. Development of

contrast-enhanced high-frequency ultrasound for early diagnosis of tumor. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March 23-24, 2013, National University of Singapore (NUS), Singapore.

Hasegawa N, Kodama T, Sato T, Kochi T, Mori S. Early diagnosis of lymph node metastasis. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March 23-24, 2013, National University of Singapore (NUS), Singapore.

Shao L, Okuno T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S, Kodama T. Lymphatic drainage routes mapping in a novel experimental lymph metastasis model of mice. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 19 日-21 日, ロイトン札幌(北海道札幌市)

Hatakeyama Y, Sax N, Kato S, Okuno T, Sakamoto M, Nori S, Kodama T. Pressure-driven flow characteristics in the lymphatic vessel for lymphatic drug delivery system. The 9th International Conference on Flow Dynamics, September 19-21, 2012, Hotel Metropolitan Sendai, Sendai, Miyagi.

畠山友梨子, 李麗, Sax N, 奥野竜希, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. リンパ行性薬剤送達システムの開発. 日本機械学会 2012 年度年次大会. 2012 年 9 月 9 日-12 日, 金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市)

畠山友梨子, Sax N, 奥野竜希, 森士朗, 阪本真弥, 小玉哲也. リンパ行性薬剤送達システム開発のためのリンパ節およびリンパ管内の流動特性. 第 28 回日本 DDS 学会プログラム予稿集. 2012 年 7 月 4 日-5 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

Hatakeyama Y, Kodama T. Fluid dynamics in the afferent lymphatic. International Symposium of Biomedical Engineering, June 14-15, 2012, Ryokusuitei, Sendai, Miyagi.

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: リンパ節転移のリスク評価プログラム及び装置
発明者: 森士朗, 小玉哲也

権利者：東北大学
種類：特許
番号：特願 2014-064466
出願年月日：平 26 年 3 月 26 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kodama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 哲也 (KODAMA, Tetsuya)
東北大学・大学院医工学研究科・教授
研究者番号：4 0 2 7 1 9 8 6

(2) 研究分担者

小野 栄夫 (ONO, Masao)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：2 0 3 0 2 2 1 8