

令和元年5月18日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05491

研究課題名(和文) 機能的リンパ組織移植法の開発!

研究課題名(英文) Development of functional lymph node transfer

研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70271674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、リンパ浮腫に対する外科的リンパ系再構築法として、血管柄付きリンパ節移植の臨床報告が相次いでいるが、血流の有無が移植リンパ節の機能に及ぼす影響は明らかではない。移植リンパ節への血流の有無が異なるモデルを作製し、移植リンパ節の形態・機能を比較することで、より機能的なリンパ組織移植法を検証した。血管柄付きリンパ節移植は、リンパ節内の機能的な高内皮細静脈を保持することにより、移植リンパ節の免疫能の観点からも有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでリンパ節移植の研究としては、リンパ浮腫の改善という移植リンパ節の循環系としての機能に着目した研究が多く行われてきた。移植リンパ節の免疫系としての機能を検討した研究は少ないが、リンパ浮腫の患者は患肢の蜂窩織炎を合併することが多い。本研究により、血管柄付きリンパ節移植は、移植リンパ節の免疫系としての機能も期待できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vascularized lymph node transfer is gaining popularity in the treatment of lymphedema. However, it is unclear whether vascularization of transferred lymph nodes contributes to functional improvement. This is the first experimental study to compare changes in the quantitative histology of transferred lymph nodes with or without vascularization in a mouse model of vascularized lymph node transfer. We found that vascularized lymph node transfer preserved more functional high endothelial venules within the transferred lymph node than did nonvascularized lymph node transfer.

研究分野：形成外科学

キーワード：血管柄付きリンパ節移植 リンパ系再構築 遊離リンパ節移植 機能的リンパ移植法 lymph node transfer

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のマイクロサージャリー技術の進歩により、四肢のリンパ浮腫に対する局所の外科的リンパ系再構築法として、血管柄付きリンパ節移植の臨床報告が相次いでいる。移植リンパ節への血流がリンパ節の生着と機能の維持に重要とされるが、移植リンパ節への血流の有無により、その形態・機能を比較した報告は少ない。

移植リンパ節の循環系としての機能は、リンパ管新生とリンパ節内の高内皮細静脈 (high endothelial venule、HEV) を介したリンパ静脈交通によるとされる。また、抗原や抗原提示細胞は末梢組織から輸入リンパ管を通してリンパ節に入るが、ナイーブリンパ球は静脈から HEV の細胞間隙を通してリンパ節に入るため、HEV はリンパ節の免疫系としての機能に重要な管腔構造である。移植リンパ節へのリンパ流がリンパ節における HEV の維持に重要であることは数多く報告されているが、移植リンパ節への血流が HEV にどのように影響するかという報告は乏し得た限りなかった。

我々は血管柄のない遊離リンパ節移植を行ったマウスに同種移植可能なメラノーマ細胞を移植したモデルを用いて、移植リンパ節における免疫細胞や HEV を解析することで、移植リンパ節は限られた範囲で免疫能を有する可能性を示した。<sup>1</sup> そのモデルにおいて移植リンパ節の機能は、Sham 手術群の同リンパ節より劣る結果となり、その差は移植リンパ節への血流の差ではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

マウスを用いた血管柄付きリンパ節移植モデルを確立し、その血管柄付きリンパ節移植と血流のないリンパ節移植モデルにおいて移植リンパ節を比較することで、血流の有無が移植リンパ節の形態・機能に与える影響を組織学的に検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 8週齢雄の C57BL/6N マウス 25 匹を用いて、左単径リンパ節に流入する浅腹壁動脈を茎とするリンパ節脂肪弁を挙上し、同側の膝窩リンパ節摘出部に移行する血管柄付きリンパ節移植モデルを作製した。術後 3、4 週目に後肢足蹠に indocyanine green (ICG) を皮下注射し、後肢のリンパ流を評価した。術後 4 週目に左後肢足蹠に 2% パテントブルー溶液を皮下注射し、移植リンパ節が染色された場合、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通ありと判定した。移植リンパ節および対側の単径・膝窩リンパ節を摘出し、hematoxylin and eosin (HE) 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各切片におけるリンパ節の大きさを計測した。

(2) 上記のマウス 50 匹を用いて、以下の 3 群を作製し、下記の方法で各群を比較した。Group 1 は第一章で作製した有茎血管柄付きリンパ節移植群 ( $n = 20$ )、Group 2 は有茎血管柄結紮リンパ節移植群 ( $n = 15$ )、Group 3 は遊離リンパ節移植群 ( $n = 15$ ) とした。術後 4 週目に第一章と同様の方法でパテントブルーによる移植リンパ節の染色の観察後、移植リンパ節および対側の単径リンパ節を摘出し、HE 染色および MECA-79 (HEV)、B220 (B 細胞)、CD3 (T 細胞)、CD11c (樹状細胞) に対する免疫組織化学染色で組織学的に評価した。外周  $100 \mu\text{m}^2$  以上の総 HEV、そのうち内腔  $80 \mu\text{m}^2$  以上の拡張 HEV を定義し、画像閲覧ソフトウェアを用いて各切片における数をカウントして、総 HEV 数に占める拡張 HEV 数の割合を計算した。画像解析ソフトウェアを用いて B 細胞、T 細胞、樹状細胞のリンパ節に占める面積の割合を計測した。多群間の比較には、Steel-Dwass 検定を用いた。  $P < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

### 4. 研究成果

(1) 全てのマウスが術後合併症なく、術後 4 週で安楽死させるまで生存した。全例において単径リンパ節は単径脂肪組織内に 1 つ存在し、血管茎は有茎で膝窩へ移植するのに十分であり、HE 染色で移植リンパ節を認めた。

ICG 蛍光リンパ管造影では、全例において手術操作を加えた対側の右膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた。術後 3、4 週目では、25 例中 16 例 (64.0%) に手術操作を加えた左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた (図 1A、B)。残りの 9 例 (36.0%) では、左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めず、後肢から単径にかけてリンパ管の側副路や皮膚へのリンパ逆流鬱滞所見である dermal backflow と考えられる蛍光像を認めた (図 1C、D)。

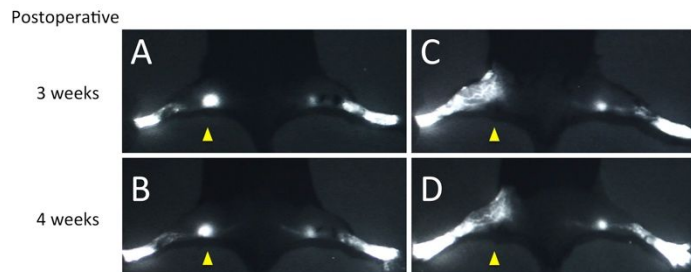


図 1. 術後蛍光リンパ管造影 (腹臥位)

A、B. 移植リンパ節の蛍光像が確認された例  
C、D. 移植リンパ節の蛍光像が確認されなかった例  
矢頭. 単径リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩  
(文献 2 より引用改変)

ICG 蛍光リンパ管造影で左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた 16 例では、パテントブルー色素による移植リンパ節の染色を認めた。残りの 9 例ではパテントブルー色素による移植リンパ節の染色を認めなかった。移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通率は 64.0%であり、術後 3 週以降の ICG 蛍光リンパ管造影で再疎通を予測可能であった。輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節よりも有意に縮小したが、皮質における濾胞構造は明瞭であった。一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は、リンパ節内の細胞密度が高く、濾胞構造は明らかではなかった(図 2)。

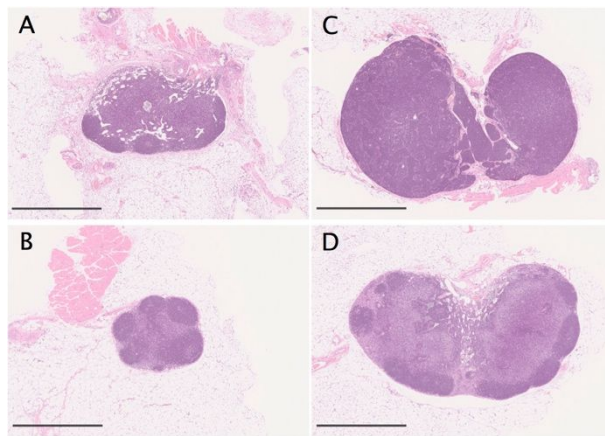


図 2. 血管柄付きリンパ節移植モデルのリンパ節 HE 染色、Bars = 1 mm (文献 2 より引用)  
 A. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節  
 B. 対側正常膝窩リンパ節  
 C. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節  
 D. 対側正常単径リンパ節

(2) 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通率は、Group 1 が 65.0%、Group 2 が 66.7%、Group 3 が 46.7%であった。

Group 1 では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節 VLN (+)において、背の高い内皮細胞が特徴である HEV の内腔が拡張した所見が観察された(図 3A、E)。一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節 VLN (-)においては、HEV の内腔が狭小化した所見が観察された(図 3B、F)。Group 2 の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節 non-VLN (+)および Group 3 の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節 FLN (+)においても、HEV の内腔が狭小化した所見が観察された(図 3C、D、G、H)。

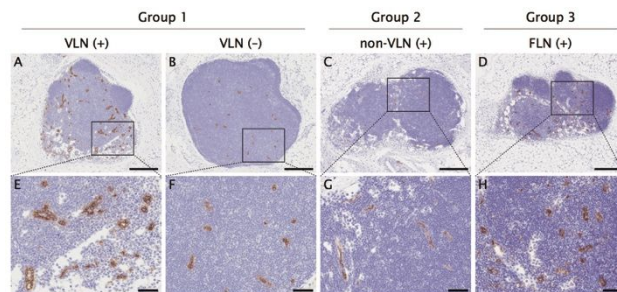


図 3. 移植リンパ節の HEV に対する免疫組織化学染色  
 A-D. Bars = 250 μm、E-H. Bars = 50 μm  
 (文献 3 より引用)

各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、リンパ節における拡張 / 総 HEV 数は、Group 1 が Group 2 および Group 3 よりも有意に多かった(図 4)。リンパ節における B 細胞、T 細胞、樹状細胞の割合は、各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、いずれの群間にも有意差はなかった。

以上より血管柄付きリンパ節移植は、機能的 HEV を保持することにより、移植リンパ節の免疫能の観点から有用である可能性が示唆された。

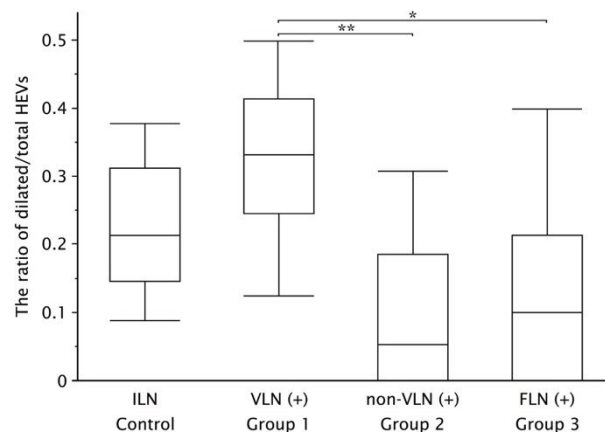


図 4. 各モデルのリンパ節における拡張 / 総 HEV 数 (文献 3 より引用)

#### < 引用文献 >

1. Maeda T, Hayashi T, Furukawa H, Iwasaki D, Ishikawa K, Funayama E, Murao N, Osawa M, Oyama A, Yamamoto Y: Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. International Journal of Cancer, 143, 1224-1235, 2018

2. Ishikawa K, Maeda T, Funayama E, Hayashi T, Murao N, Osawa M, Furukawa H, Oyama A, Yamamoto Y: Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: A preliminary study. *Microsurgery*, 39, 247-254, 2019
3. Ishikawa K, Funayama E, Maeda T, Hayashi T, Murao N, Osawa M, Ito R, Furukawa H, Oyama A, Yamamoto Y: Changes in high endothelial venules in lymph nodes after vascularized and nonvascularized lymph node transfer in a murine autograft model. *Journal of Surgical Oncology*, 119, 700-707, 2019

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Ishikawa Kosuke, Maeda Taku, Funayama Emi, Hayashi Toshihiko, Murao Naoki, Osawa Masayuki, Furukawa Hiroshi, Oyama Akihiko, Yamamoto Yuhei: Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: A preliminary study. *Microsurgery*, 査読有, 39, 247-254, 2019
2. Ishikawa Kosuke, Funayama Emi, Maeda Taku, Hayashi Toshihiko, Murao Naoki, Osawa Masayuki, Ito Riri, Furukawa Hiroshi, Oyama Akihiko, Yamamoto Yuhei: Changes in high endothelial venules in lymph nodes after vascularized and nonvascularized lymph node transfer in a murine autograft model. *Journal of Surgical Oncology*, 査読有, 119, 700-707, 2019

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 石川耕資, 前田 拓, 舟山恵美, 林 利彦, 村尾尚規, 大澤昌之, 古川洋志, 小山明彦, 山本有平: マウスリンパ節移植モデルにおける高内皮細静脈の組織学的検討～移植リンパ節への血流の有無による比較. 第 43 回日本リンパ学会総会, 東京, 2019.3.22
2. 石川耕資, 舟山恵美, 林 利彦, 村尾尚規, 大澤昌之, 前田 拓, 古川洋志, 小山明彦, 山本有平: マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける移植リンパ節に関する研究. 第 37 回北大形成外科アカデミー, 札幌, 2018.12.8
3. 石川耕資, 舟山恵美, 林 利彦, 村尾尚規, 大澤昌之, 前田 拓, 山本有平: マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおけるリンパ管再疎通および移植リンパ節の組織学的検討. 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京, 2018.10.19
4. 石川耕資, 古川洋志, 小山明彦, 舟山恵美, 林 利彦, 村尾尚規, 大澤昌之, 前田 拓, 山本有平: 機能的移植リンパ節に関する基礎研究. 第 35 回北大形成外科アカデミー, 札幌, 2017.12.16
5. 村尾尚規, 岩寄大輔, 前田 拓, 大芦孝平, 塩谷隆太, 小山明彦, 古川洋志, 山本有平: リンパ管治療の基礎から臨床応用に向けて～リンパ浮腫の予防及び悪性腫瘍の転移制御. 第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会, 大阪, 2016.9.15

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：舟山 恵美

ローマ字氏名：FUNAYAMA, Emi

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10533630

研究分担者氏名：林 利彦

ローマ字氏名：HAYASHI, Toshihiko

所属研究機関名：北海道大学

部局名：歯学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00432146

研究分担者氏名：村尾 尚規

ローマ字氏名：MURAO, Naoki

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 90706558

研究分担者氏名: 大澤 昌之  
ローマ字氏名: OSAWA, Masayuki  
所属研究機関名: 北海道大学  
部局名: 大学病院  
職名: 助教  
研究者番号(8桁): 70625029

研究分担者氏名: 前田 拓  
ローマ字氏名: MAEDA, Taku  
所属研究機関名: 北海道大学  
部局名: 医学研究院  
職名: 助教  
研究者番号(8桁): 80813542

研究分担者氏名: 小山 明彦  
ローマ字氏名: OYAMA, Akihiko  
所属研究機関名: 福島県立医科大学  
部局名: 医学部  
職名: 教授  
研究者番号(8桁): 70374486

研究分担者氏名: 石川 耕資  
ローマ字氏名: ISHIKAWA, Kosuke  
所属研究機関名: 北海道大学  
部局名: 大学病院  
職名: 医員  
研究者番号(8桁): 60791374

## (2)研究協力者

研究協力者氏名: 古川 洋志  
ローマ字氏名: FURUKAWA, Hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。