

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05001

研究課題名(和文) 郭清術後のリンパ組織再構築術～悪性黒色腫予後の改善を目指して！

研究課題名(英文) The surgical lymphatic regeneration for improving the prognosis of melanoma

## 研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00399924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、リンパ組織の破綻に対する外科的治療法の開発がすすみ、リンパ系の再構築法として、リンパ節移植が登場した。血管吻合を行うことで、viabilityを有するリンパ組織が移植先で機能し、リンパ浮腫に対する新たなドレナージ効果が期待できる。しかしながら、基礎および臨床でのリンパ節移植の有用性については詳細な報告が少ない。そこで今回外科的リンパ系再構築法によるリンパドレナージパターンの回復、およびリンパ節局所免疫能の回復について検証し、その結果リンパ節移植が循環系・免疫系の回復をもたらすことを証明することができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, as a relatively new physiologic surgical treatment of impairment of local lymphatic system, lymph node transplantation was introduced and applied. However, the reports supporting the utility of the lymph node transplantation are limited. Here, the authors demonstrated that a transplanted LN served as a tumor-draining LN and exerted an immune-mediated antitumor effect. Following local tumor control by surgical resection, an additional lymph node transplant might be practical for preventing lymphedema and reduced immunity.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ系再構築 リンパ節移植 循環系 免疫系 回復

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫治療の根治を目指した治療の一環として、所属リンパ節の郭清術は悪性黒色腫のステージングによっては必須の治療と考えられている。しかしながらこの治療は、リンパ組織に一定の侵襲を加える。リンパ系は輸送機能を有するが、外科的治療によるリンパ系の破壊によりこの輸送機能は傷害される。その結果、循環系への影響として、タンパク質の貯留や組織間への液体の移行促進が惹起され、さらに炎症性変化が起こること、リンパ浮腫という病態が生じる。また、リンパ管はさまざまな抗原や免疫系の細胞を輸送する。それゆえ、その輸送機能が傷害されると免疫系の機能の破綻をまねく可能性も考えられる。我々のグループは、局所リンパ系破綻モデルである、マウスリンパ浮腫モデルに悪性黒色腫を移植し、肺転移が増加したことを報告した(Oashi et al., 2013)。このことにより、免疫系の影響として、リンパ組織の破綻が局所免疫低下につながる可能性が示唆された。すなわち、リンパ節郭清術という局所リンパ系破壊行為は循環系への影響としてリンパ浮腫に、また免疫系への影響として腫瘍の易転移性につながる可能性がある。

一方で、近年このリンパ組織の破綻に対する外科的治療法の開発が進み、リンパ系の再構築術法として、リンパ管静脈吻合術やリンパ節移植術が臨床で行われるようになってきた。これらの治療がリンパ浮腫に対して一定の効果をもたらすことは報告されているが、エビデンスは十分ではなく、一方で免疫系に与える効果についてはほとんど解明されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

外科的リンパ系再構築法の樹立を目指し、マウス動物モデルを用いて、外科的リンパ系再構築法としてのリンパ節移植による、循環系および免疫系の回復について検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスリンパ節移植モデルの作成

マウス膝窩リンパ節切除部へのリンパ節移植により変化するリンパ流を正常化できるという仮説をたてた。a. 皮膚に切開のみを加えたコントロール群、b. 膝窩リンパ節を切除した群(局所リンパ系破綻群)、c. 膝窩リンパ節を切除した後にリンパ節移植した群(リンパ節移植群)を作成した。

### (2) 蛍光リンパ管造影によるリンパ流評価

全身麻酔下でインドシアニンググリーン(ICG)を左足に皮下投与して近赤外線カメラであるPDEでリンパ流の評価を行った。動物モデルを作成した後、術後1、2、3、4週と継時的に評価を行った。

### (3) 蛍光標識デキストラン

移植したリンパ節が生着しリンパ管との

連続性を回復しているかどうかを検証する為に、リンパに特異的に取り込まれる蛍光標識デキストランを用いて移植リンパ節の蛍光観察を行なった。

### (4) 免疫組織化学染色、エラスチカマッソン染色

手術操作を行った後4週目にa群(コントロール群)、c群(リンパ節移植群)から、膝窩リンパ節を採取し、LYVE-1でリンパ管内皮を、B220で皮質領域のB細胞を、CD3で傍皮質領域のT細胞を評価した。

また線維化の評価を行うためにエラスチカマッソン染色を行った。

### (5) マウスメラノーマ移植モデルの作成

リンパ節移植による免疫系の回復を証明するために、それぞれの動物モデルの後肢foot padにルシフェラーゼ遺伝子を導入した悪性黒色腫細胞(B16F10LUC2)または赤色に蛍光される蛍光タンパク質発がん悪性黒色腫細胞(B16F10RFP)を移植した。

### (6) In vivo optical imaging

Bioluminescence(生物発光)の検出による腫瘍動態(増殖、転移)追跡を経時的に行った。150mg/kg/bodyのD-luciferinをPBSに溶解して、各群に腹腔内投与した。投与15分後に、冷却Charge-coupled device(CCD)カメラを装備したLumazine bioluminescence imagerによって生物発光を検出した。

### (7) ルシフェラーゼアッセイ

腫瘍の転移量をルシフェラーゼアッセイで評価した。鼠径リンパ節、腋窩リンパ節、肺を採取し、Cell Culture Lysis Reagent(Luciferase Assay System; Promega)に溶解した。遠心後、上清を採取し、Luciferin(Luciferase Assay Reagent; Promega)を添加して生じる生物発光を検出(GloMax 20/20n Luminometer; Promega)した。

### (8) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織学的検証

a、c群のマウスモデルにモデル作成後4週目にB16F10RFPメラノーマ細胞を移植し、メラノーマ細胞移植後2、3、4週目にFITC-dextranをfoot padに注射し、左膝窩リンパ節を採取し、切片(30 $\mu$ m)を作製した。共焦点レーザー顕微鏡Fluoview 1000D(Olympus)で蛍光観察した。

なお、マウスモデルa群においては、腫瘍移植後に直接リンパが流れ込むリンパ節は膝窩リンパ節であり、tumor draining popliteal lymph node(TDPLN)と呼称する。c群においては、リンパが流れ込むリンパ節は移植リンパ節であり、tumor draining transplanted lymph node(TDTLN)と呼称する。なおコントロールとして、左foot padに生食を投与し、生体内に腫瘍を持たない膝窩リンパ節をnaïve popliteal lymph node(NPLN)と呼称する(図1)。

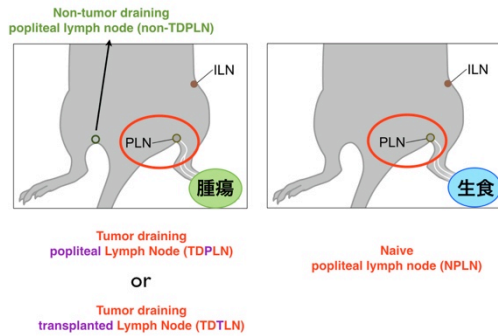


図 1. 腫瘍を有するかどうかによる膝窩リンパ節の呼称

#### (9) リンパ節内のサイトカインの発現検討

腫瘍の転移動態を評価するために Tyrp1 の mRNA 発現レベルを評価した。腫瘍細胞移植後 1、2、3、4 週の時点で、左膝窩リンパ節を採取した。RNA を抽出し、逆転写した後に、Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) を用いたインターカレーション法により PCR 増幅産物生成量を測定し、遺伝子発現量の比較のため、 $\Delta\Delta CT$  法により解析した。

#### (10) リンパ節内のリンパ球の変化の検討

リンパ節内のリンパ球の動態を評価するため、Fluorescence-activated cell sorting (FACS) による解析を行なった。モデル作成後 4 週の時点で a、c 群のマウスのそれぞれに B16-F10-LUC2 メラノーマ細胞を移植し、腫瘍移植後 4 週目左膝窩リンパ節 (TDPLN と TDPLN) を採取した。コントロールとして foot pad に生食を注入した群から NPLN を採取した。蛍光標識抗体 (CD3、CD4、CD8、CD25、CD44、CD62L、CD127、B220、CXCR5、PD-1) で処理する。制御性 T 細胞同定のために、CD25、CD127 を、濾胞性ヘルパー T 細胞の同定のため CXCR5、PD-1 を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) Fluorescence lymphangiography による

##### 術後リンパ流評価

コントロール群 (a 群) では foot pad に注射した ICG が膝窩に流れ、蛍光画像として明瞭に描出された。術後 1、2、3、4 週のいずれにおいても同様の画像が観察された。

膝窩リンパ節切除群 (b 群) では n=10 において術後 1、2 週目はコントロール群と同様に膝窩リンパ節が描出された。しかし、術後 3 週目以降は描出されなかった。これは切除された膝窩リンパ節を反映した結果と考えられた (図 2)。また n=8 においては術後 1 週目からリンパ流が変化し、膝窩ではなく鼠径リンパ節が描出された (図 3)。

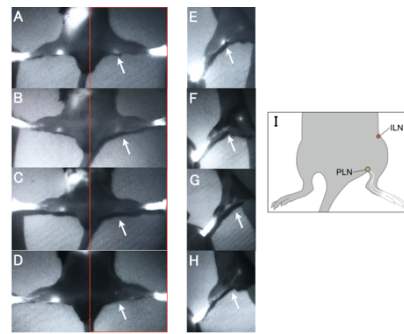


図 2. 膝窩へのリンパ流 (①より引用)

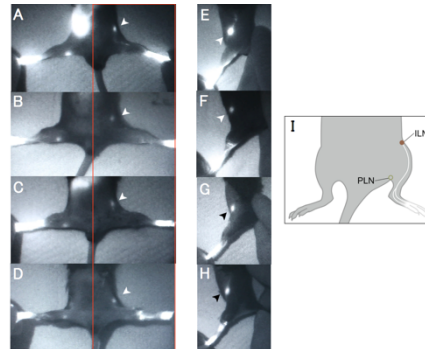


図 3 鼠径へのリンパ流 (①より引用)

膝窩リンパ節を切除した後にリンパ節を移植した群 (Group3) では n=16 において術後 1 週目から 4 週目まで膝窩リンパ節が描出された (図 4)。

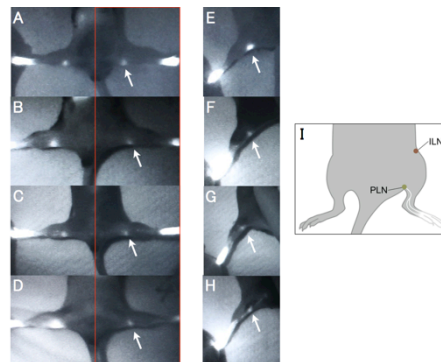


図 4 リンパ節移植により膝窩へのリンパ流が回復した (①より引用)。

#### (2) 蛍光標識デキストランによる移植リンパ節の評価

コントロール群 (a 群) では foot pad に注射した FITC-dextran が膝窩に流れ、蛍光画像として明瞭に描出された。Dextran は選択的にリンパ管に吸収されるために、リンパが流れる辺縁洞、髓洞がとくに明瞭に描出された (図 5A)。一方で、リンパ節を移植した c 群においても辺縁洞および髓洞が明瞭に描出された (図 5B)。これは輸入リンパ管がリンパ節と

繋がり、リンパがリンパ節へと流れたことを示した。なお、移植リンパ節では部分的にリンパ節周囲が厚みを持って描出された。

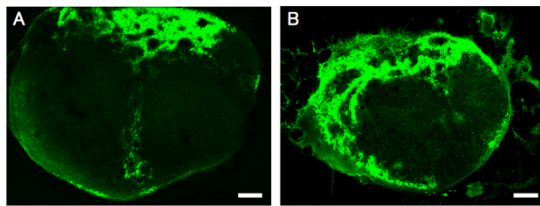


図 5 FITC で蛍光標識されたリンパ節(左-A : 膝窩 LN、右-B : 移植 LN)。(①より引用)

(3) 膝窩リンパ節および移植リンパ節の免疫組織化学染色、エラスチカマッソン染色

○膝窩リンパ節

LYVE-1 による免疫組織化学染色ではリンパ管内皮は辺縁部分に局在していた(図 6A)。CD3 による T 細胞の局在は傍皮質領域に(図 6B)、また B220 による B 細胞の局在は皮質領域に認められた(図 6C)。またエラスチカマッソン染色では膠原線維が染色されるが、リンパ節周囲に線維化は認められなかった(図 6D)。

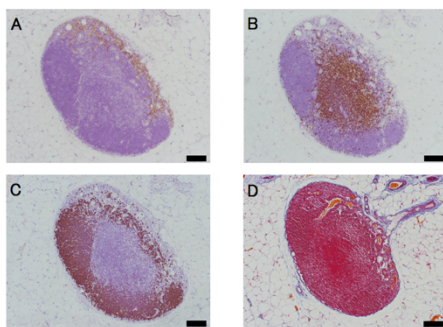


図 6 膝窩リンパ節の免疫組織化学染色(A : LYVE-1、 B : CD3、 C : B220)およびエラスチカマッソン染色(D)。(A)リンパ管内皮は辺縁部分に局在していた。(B) T 細胞は傍皮質領域に認められた。(C) B 細胞は皮質領域に認められた。(D)リンパ節周囲に線維化は認められなかった。 bar=100  $\mu$ m。(①より引用)

○移植リンパ節

LYVE-1 による免疫組織化学染色ではリンパ管内皮は通常の膝窩リンパ節と同様に辺縁部分に局在していた(図 7A)。これは蛍光標識デキストランによって描出された移植リンパ節を支持する結果であった。また T 細胞の局在は傍皮質領域に(図 7B)、そして B 細胞の局在は皮質領域に、膝窩リンパ節と同様に分布していた(図 7C)。エラスチカマッソン染色ではリンパ節周囲に線維化が認められ(図 7D)。蛍光標識デキストランでリンパ節周囲が肥厚して描出された結果は本結果を反映したものと思われた。

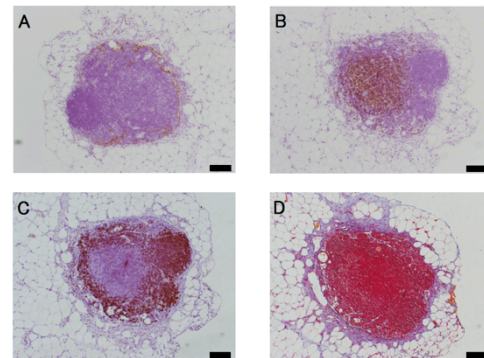


図 7 移植リンパ節の免疫組織化学染色(A : LYVE-1、 B : CD3、 C : B220)およびエラスチカマッソン染色(D)。(A)リンパ管内皮は辺縁部分に局在していた。(B) T 細胞は傍皮質領域に認められた。(C) B 細胞は皮質領域に認められた。(D)リンパ節周囲に線維化を認めた。 bar=100  $\mu$ m。(①より引用)

(4) 膝窩リンパ節切除でリンパ節・肺転移が増悪し、リンパ節移植により抑制される

上述したごとく、膝窩リンパ節の切除によりリンパ流が鼠径リンパ節へと変化し、リンパ節移植によりリンパ流が正常化し、膝窩に流れた。そして Group1 がコントロール群、Group2 が膝窩リンパ節切除群、Group3 がリンパ節移植群に該当する(図 8a)。これらのマウスの foot pad にメラノーマ細胞を移植し 4 週目に腫瘍の量を蛍光強度で評価したが Group 間では原発に相当する腫瘍量については差が認められなかった(図 8b、 8c)。

リンパ節転移量、肺転移量をルミノメーターで定量化した。Group2 では肉眼的に鼠径リンパ節のサイズが大きく、また転移と思われる黒色調変化が認められた。また Group2 では腋窩リンパ節のサイズも Group1、3 と比較するとわずかに腫大していた。これらの変化は、膝窩リンパ節切除に伴うリンパ流の変化を反映したものと考えられた。Luc2 による発光量から算出した Group2 の肺転移量、リンパ節転移量は、Group1 のものよりも統計学的有意差を持って多かった(\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、図 8d)。そしてリンパ節移植を行うことで、リンパ節転移量は有意差を持って減少した(\* $p < 0.05$ )。

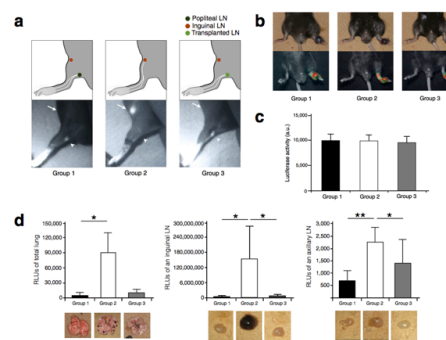


図 8. (a)各 Group でのリンパ流。(b)各 Group での foot pad での腫瘍量(原発腫瘍)。(c)蛍光強度による Group 間での腫瘍量の差(各 group n=12)。(d)各 Group での肺転移、鼠径リンパ節転移、腋窩リンパ節転移の転移量の差(各 group n=12)。(②より引用)

(5) 移植リンパ節はリンパ流の中で抗腫瘍効果を有する

TDLN はメラノーマに対する腫瘍免疫の中で中心的な役割を果たし、このリンパ節は臨床における SLN に相当する。そこで今回、腫瘍免疫におけるリンパ節の抗腫瘍効果を検証するために、TDPLN および TDTLN を評価した。肉眼的には、TDPLN はメラノーマ抗原に反応し腫大していた(図 9a)。TDTLN もまた腫大していたが、その程度は TDPLN に比べると小さかった。このサイズの違いは TDPLN、TDTLN、NPLN のルシフェラーゼ活性の程度に一致していた。そして TDTLN は NPLN よりも有意差を持って転移量は大きかったが、TDPLN はさらに転移量が有意差を持って TDTLN よりも大きかった。

腫瘍は進行するにつれて、微小環境下において免疫抑制の状態を周囲組織にもたらし、自らが転移しやすい環境をつくる。われわれのマウスモデルにおいては、移植した腫瘍は約 3 週間で TDPLN へ転移し、その後増悪した。この転移の進行の程度のは RFP メラノーマ細胞を蛍光顕微鏡で観察でき、またこの結果は RT-PCR で分析した Tyrp 1 の結果とも一致していた(図 9b、9c)。腫瘍細胞移植後 4 週でメラノーマ細胞の TDTLN への転移が認められたが、その割合も TDPLN に比べて少なかった(図 9b、9c)。

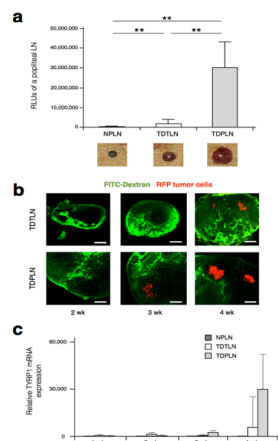


図 9. (a)各 Group でのリンパ節 NPLN、TDTLN、TDPLN の蛍光強度による腫瘍量の差。(b)腫瘍移植後 2、3、4 週目の TDTLN および TDPLN のリンパ節の蛍光画像(緑: FITC-リンパ、赤: RFP-腫瘍)。(c)腫瘍移植後 1、2、3、4 週目の NPLN、TDTLN、TDPLN の Tyrp1 mRNA の転写量。(②より引用)

(6) リンパ節移植後の獲得免疫に伴うリン

パ節内のリンパ球の分布の変化および拡大

メラノーマ細胞移植後 4 週目での膝窩リンパ節の肉眼的所見では、TDPLN、TDTLN、NPLN のサイズはそれぞれ 3.0mm、1.5mm、1.0mm であった(図 10a)。TDPLN および TDTLN のリンパ節中の全リンパ球数は NPLN に比べて、それぞれ 38.7 倍、7.7 倍であった(図 10b)。一方で B 細胞については、TDPLN および TDTLN のリンパ節内の B リンパ球は NPLN に比べて、それぞれ 45.6 倍、9.4 倍であり、T 細胞については、27.3 倍、8.6 倍であり、B 細胞と T 細胞とで増加の割合は、TDPLN と TDTLN では異なっていた。

実際のリンパ節内における B 細胞と、CD4 陽性 helper T 細胞、CD8 陽性 killer T 細胞の割合を、FACS で評価した(図 10c)。メラノーマ抗原認識後の獲得免疫の結果、T 細胞と比較して、B 細胞の割合の増加が TDTLN と TDPLN で確認された。そして TDPLN の方がより B 細胞の割合の増加を認めた。対照的に、TDTLN および TDPLN の T 細胞の割合は NPLN に比べ減少した。一方で、T 細胞の割合は減少したものの、TDTLN および TDPLN における helper T 細胞と killer T 細胞の割合もまた変化した。その中で、特に TDPLN と TDTLN の naïve helper T lymphocyte の割合の減少が NPLN に比べ有意に認められ、このことは effector helper T 細胞が TDTLN と TDPLN でより抗腫瘍効果を発揮していたということの意味したものと考えられた。

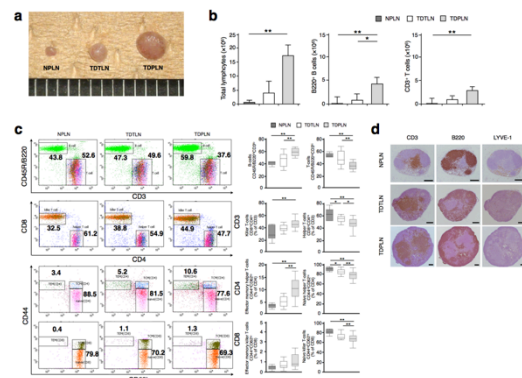


図 10. (a)メラノーマ細胞移植後 4 週目の NPLN、TDTLN、TDPLN の肉眼的所見。(b)NPLN、TDTLN、TDPLN の全リンパ球数、T リンパ球数、B リンパ球数。(c) FACS でのリンパ節内のリンパ球数の割合(NPLN、TDTLN、TDPLN)。B220<sup>hi</sup>CD3<sup>lo</sup> B-cells と B220<sup>lo</sup>CD3<sup>hi</sup> T-cells (1 段目)、CD8<sup>hi</sup>CD4<sup>lo</sup> killer T-cells と CD8<sup>lo</sup>CD4<sup>hi</sup> helper T-cells (2 段目)、CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup> naïve T-cells と CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup> effector/memory CD4<sup>+</sup> helper T-cells (3 段目)、and CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup> naïve T-cells と CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup> effector/memory CD8<sup>+</sup> killer T-cells (4 段目)。(d) NPLN、TDTLN、TDPLN の免疫組織化学染色(LYVE-1、CD3、B220)。(②より引用改変)

<引用文献>

①Lymphatic Reconnection and Restoration of Lymphatic Flow by Nonvascularized Lymph Node Transplantation: Real-Time Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran. Maeda T, Yamamoto Y, Iwasaki D, Hayashi T, Funayama E, Oyama A, Murao N, Furukawa H. *Lymphat Res Biol*. 16:165-173,2018.

②Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. MaedaT, Hayashi T, Furukawa H, Iwasaki D, Ishikawa K, Funayama E, Murao N, Osawa M, Oyama A, Yamamoto Y. *Int J Cancer* 2018 Mar 31 doi: 10.1002/ijc.31414. [Epub ahead of print]

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 2 件)

①Lymphatic Reconnection and Restoration of Lymphatic Flow by Nonvascularized Lymph Node Transplantation: Real-Time Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran. Maeda T, Yamamoto Y, Iwasaki D, Hayashi T, Funayama E, Oyama A, Murao N, Furukawa H. *Lymphat Res Biol*. 16:165-173,2018. 査読有.

②Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. MaedaT, Hayashi T, Furukawa H, Iwasaki D, Ishikawa K, Funayama E, Murao N, Osawa M, Oyama A, Yamamoto Y. *Int J Cancer*. 2018 Mar 31. doi: 10.1002/ijc.31414. [Epub ahead of print] 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

1. 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: パネルディスカッション4 リンパ管治療の基礎から臨床へ. 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. 15-16
2. 前田 拓、村尾尚規、岩寄大輔、塩谷隆太、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、林利彦、七戸龍司、山本有平. リンパ系再構築法としてのリンパ節移植~リンパ節移植後のリンパ流を検証する~. 第25回日本形成外科学会基礎学術集会、大阪、2016.9.15-16
3. 前田 拓、村尾尚規、岩寄大輔、塩谷隆太、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、林利彦、大澤昌之、山本有平. リンパ系再構築法としてのリンパ節移植~移植リンパ節は生着・機能しているか~. 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会、大阪、

2017.10.19-20

4. Taku Maeda, Naoki Murao, Kosuke Ishikawa, Daisuke Iwasaki, Toshihiko Hayashi, Hiroshi Furukawa, Emi Funayama, Akihiko Oyama, Masayuki Osawa, Yuhei Yamamoto. Non vascularized lymph node transplantation: Immune-mediated antitumor effect of transplanted lymph node. PRS Korea 2017, Seoul, 2017.11.10-12

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA Hiroshi)

北海道大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 00399924

(2)研究分担者

林 利彦 (HAYASHI Toshihiko)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号: 00432146

舟山 恵美 (FUNAYAMA Emi)

北海道大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 10533630

山本 有平 (YAMAMOTO Yuhei)

北海道大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70271674

小山 明彦 (OYAMA Akihiko)

福島県立医科大学・教授

研究者番号: 70374486

村尾 尚規 (MURAO Naoki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 90706558