

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670545

研究課題名(和文)免疫学的手法を駆使したセンチネルリンパ節内小転移病巣の可視化技術の確立

研究課題名(英文) In vivo visualization of small metastatic lesion in sentinel lymph node using immunological methods

研究代表者

藤井 博史 (Fujii, Hirofumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：80218982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：センチネルリンパ節(SLN)内の転移状態をインビボで評価するために、SLN内の大部分を占める非がん部を構成する免疫細胞の状態を可視化することで、間接的に転移病巣の診断を可能とするサロゲート・イメージング技術の開発を目指した。

SLNに転移が生じる場合、早期よりB細胞が増加し、胚中心(GC)を形成することが分かった。蛍光タンパク質(tdTomato)を強制発現したEMT6乳癌細胞移植モデルを用いた実験から、このGCががん細胞の増殖に反応していることが示唆された。こうした転移の進展に伴い発現が顕著となる細胞の局在をイメージングすることで、SLNの転移状態の診断につながることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Imaging of immunological changes inside sentinel lymph nodes (SLNs) might be surrogate in vivo imaging methods of metastatic status of SLNs because most parts of SLNs are occupied by non-tumor cells such as immune cells.

Our study revealed that the number of B cells insides SLNs increases in the early phase of metastases and these B cells tends to form germinal centers (GCs). The results of mouse experiments using EMT6 mammary tumors cells with the expression of tdTomato suggested that these GCs would grow by the reaction to tumor cells.

Our study indicated that imaging of objects that could respond to the growth of tumor cells inside SLNs would be useful to in vivo visualization of metastatic status of SLNs.

研究分野：画像診断学

キーワード：センチネルリンパ節 免疫応答 小転移病巣 胚中心 抗体遺伝子改編酵素 分子イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

所属リンパ節の転移状態が重要な予後因子になることが様々ながんで報告されており、その正確な評価は予後予測や治療の最適化に重要である。この所属リンパ節の転移状態の診断を少ない侵襲で、かつ、高い精度で行うために、センチネルリンパ節(SLN)の概念が注目されている。これは原発巣からのリンパ流を直接受ける SLN にリンパ行性転移が初発するという概念である。これが成立する悪性腫瘍において、臨床的にリンパ節転移を認めない早期癌の場合には、SLN 生検を行って、SLN の転移状態を診断することで、所属リンパ節全体の転移状態を予測することが可能である。SLN に転移が認められなければ、所属リンパ節の郭清を省略することができ、低侵襲治療が実現する。

もし、術前の画像診断検査で SLN 内の小リンパ節転移の有無まで診断することができれば、SLN の生検自体の省略も可能となり、更なる低侵襲治療が可能となる。しかし、小転移病巣を直接検出することは必ずしも容易ではない。また、近年 SLN 内転移病巣の存在が必ずしも予後増悪につながらないことが示されつつあり、これまでのように形態学的に SLN 内の小リンパ節転移を可視化するだけでは、予後の評価は難しいと考えられるようになってきている。したがって、予後の増悪を含めた予後予測に繋がる SLN 内の小転移病巣を可視化することが重要と考えられるが、これまでに、このような画像診断検査は確立されていない。

### 2. 研究の目的

SLN 生検の対象となる症例では、SLN 内の転移病巣は存在したとしても、小病変であり、従来の画像診断検査でこれを描画することはしばしば困難である。逆の見方をすれば、転移病巣を有する SLN であっても、その大部分は非がん細胞で占められていることになる。このため、本研究ではこれまでの転移病巣を直接的に可視化する方法とは発想を転換し、SLN 内の非がん部の大半を占める免疫細胞に着目した。まず、転移病巣が形成される過程で大きな変化を生じうる免疫細胞やそれらに関連して増減する分子の探索を行った。候補として見いだされた転移の状態や予後予測に関連する細胞亜群や分子の中から、イメージングターゲットとしての可能性有するものを選び、それらを描出するイメージング技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

最初に、SLN 内に転移病巣が生じた場合に、それを検出するターゲット分子の探索を行った。

動物モデルを使用して、SLN 内での転移の進行に伴う免疫細胞の経時的変化を観察し、その過程で大きな変化を示す細胞や分子を見いだすことを目指した。免疫細胞の変化に

注目して解析するため、免疫不全動物や移植したがん細胞に対して、拒絶反応(GVH)を起こすモデルは使用できないため、野生型の宿主と、その宿主に由来するがん細胞株を使用したモデルを使用した。具体的には、ヒトにおいても SLN 理論が成立し、臨床において SLN 生検とその診断に基づくリンパ節郭清の適否が決定されている悪性黒色腫と乳癌を対象とした。それぞれのマウスがん細胞株、B16F10 メラノーマと EMT6 を、各由来動物である C57BL/6 と BALB/c を宿主としモデル(C57BL/6-B16F10 メラノーマ、BALB/c-EMT6)に移植して、動物モデルを得た。また、EMT6 に関しては蛍光タンパク質 tdTomato を強制発現させた株を樹立し、蛍光観察により転移の状態を確認できるようにした。

それぞれの動物モデルにおいて、がん細胞をマウス足蹠部に移植し、足蹠部の SLN と見做すことができる膝窩リンパ節を、移植後経時的に摘出し、SLN 内の細胞分画をフローサイトメトリーにより解析した。フローサイトメトリーを用いた解析においては、T 細胞に関しては、抗 CD3+抗体を、B 細胞に関しては、抗 B220+抗体や抗 CD19+抗体を、マクロファージに関しては、抗 F4/80+抗体を用いた。

また、イメージングターゲットのリンパ節内の局在や分布も、イメージングプローブを用いたインビボイメージングにおいて、プローブの標的分子への送達に大きく関係する。このため、これを明らかにするため、免疫組織染色により、標的分子の局在について、組織学的な解析を行った。

### 4. 研究成果

まず、C57BL/6-B16F10 悪性黒色腫モデルを用いて、がん細胞をマウスの足蹠部に移植した後、足蹠部の SLN と見做せる膝窩リンパ節を経時的に摘出し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

その結果、検討した SLN 全体としては、リンパ球(T 細胞(CD3+), B 細胞(B220+/CD19+))の有意な増加が見られたのに対して、樹状細胞(CD11c+)やマクロファージ(F4/80+)の細胞数に有意な変化は認められなかった。

転移が起こった SLN では、移植一週間後から、T 細胞、B 細胞共に、転移が認められなかった群と比較して、有意に増加したが、B 細胞の割合が有意に高いことが示された。

転移が認められなかった SLN においても、T 細胞、B 細胞共に増加が観察されたが、その程度は軽微であった。これらの結果から、転移の進行に伴い B 細胞の増加・増殖が起きていることが示唆された。

また、B 細胞は血中から高内皮性小静脈(high endothelial venules)を通りリンパ節内に移動後、皮質側に局在し、そこで B 細胞領域を形成することが知られている。このた

め、上記同様摘出したリンパ節を免疫組織化学的に解析したところ、転移を来した SLN 内では、経時的に B 細胞濾胞が腫大することが示された。また、腫大した B 細胞濾胞内に胚中心(GC)の形成が確認され、その数も経時的に増加することが明らかとなった。

この悪性黒色腫移植マウスモデルを使用して得られた知見が、他の癌腫にも認められるものかを確認するために、マウス乳癌細胞株 (EMT6) を由来動物である BALB/c マウスに移植したモデルを用いて、同様の検討を行った。さらに、この乳癌細胞移植マウスモデルでは、移植したがん細胞の SLN 内における局在を確認するために、蛍光タンパク質 tdTomato を強制発現し、株化した EMT6-tdTomato 細胞を使用した。

C57BL/6-B16F10 悪性黒色腫モデルを用いた場合と同様の検討を行った結果、この乳癌モデルにおいても、転移病巣の発現を認めた SLN 内で、B リンパ球の数が経時的に有意に増大した。この SLN 内での B リンパ球の増加率は、C57BL/6-B16F10 悪性黒色腫モデルを用いた場合と同様の傾向を示した。

これらの結果から、転移を来した SLN 内で認められる B リンパ球優位のリンパ球増加が悪性黒色腫に特有の反応ではないことが示された。

また、この EMT6-tdTomato 細胞移植モデルにおいても、増加した B 細胞はリンパ濾胞を形成し、IgM 陽性、IgD 陽性のナイーブ B 細胞画分に加えて、胚中心 B 細胞 (GL7 陽性、PNA 陽性) (GCB) も有意に増加していることが確認できた。

さらに、これらの反応が転移とは関係なく、原発巣の周囲で生じる慢性的な炎症反応によって誘導されたものと異なるものであることを確認するため、完全フロイントアジュバント (CFA) をがん転移モデルと同様に足蹠に投与した皮下炎症誘導モデル (CFA モデル) 用いて、同様の検討を行い、その結果を、がん細胞を移植したモデルでの検討結果と比較した。その結果、CFA モデルでもリンパ球の増加自体は確認されたが、T 細胞の増加率に対する B 細胞の増加率は、がん転移モデルに比して、低値を示した。また、胚中心 B 細胞は、悪性黒色腫および乳癌移植モデルで有意に増加しており、がんの転移と関連性が高い現象であることが示唆された。

以上のがん転移モデルの経時的解析により、がん転移 SLN 内の特徴的な免疫細胞の変化として B 細胞の増加を見いだすことができた。また、増加した B 細胞は、胚中心の形成に関わっていた。

非がんリンパ節腫大モデルである CFA モデルにおいても、リンパ球の増加が認められ端ものの、その増加の程度は軽微であり、がんモデルで認められた SLN 内の胚中心形成は

顕著ではなかった。

したがって、SLN 内の B 細胞の有意な増加および、胚中心形成は、がんの転移との関連性が高いものであることが推察された。

従来、抗腫瘍免疫応答については、SLN 内を含め、細胞傷害性を示す CTL や抑制的に働く制御性 T 細胞の反応が注目され、研究が盛んに行われており、B 細胞に関しては詳細な役割が示されず、あまり注目されてこなかった。しかし、イメージングターゲットとして注目したとき、細胞数の増加や活性化に伴う分子の発現や分化は可視化しやすいものと考えられた。

そこで、イメージングターゲットの候補として評価をするために EMT6-tdTomato 移植モデルの SLN を免疫組織化学的に経時解析した。その結果、転移病巣の形成が進行した移植後 2 週間に、採取した SLN では、C57BL/6-B16F10 悪性黒色腫モデルと同様に B 細胞濾胞の腫大と GC の形成が確認されたが、確認されたほとんどの GC 内部に tdTomato 由来の蛍光が確認され、EMT6 マウス乳癌細胞の存在が示唆されたため、GC 形成にがん細胞自身および、あるいはがん細胞由来の抗原が寄与していることが示唆された。

この tdTomato 由来の蛍光は GC の皮質側で確認されたが、免疫組織染色でのマクロファージ由来の蛍光 (抗 CD68+抗体または抗 CD169+抗体) との重なりは確認できなかった。このため、マクロファージに貪食された EMT6-tdTomato 細胞に由来するものではないと考えられた。

また、胚中心内の GCB 細胞の一部では抗体遺伝子改変酵素 (Activation-induced cytidine deaminase: AID) の発現も確認された。従って、これら GC は転移したがん細胞由来の抗原に対して抗体の親和性の成熟が行われていると考えられた。

また、興味深いことに、移植後一週間のモデルでは対照群と比較し濾胞の腫大と多数の GC 形成は確認されたが、上記の蛍光タンパク質の局在は認められず、AID の発現も認められなかった。このように、移植後約二週の SLN で認められるほとんどの GC 内に蛍光タンパク質が存在したことを考慮すると、早期に認められた GC も同様にがん由来抗原 (蛍光タンパク質) によって活性化した B 細胞で形成された可能性が示唆される。

近年、リンパ節辺縁洞に局在する CD169 陽性マクロファージがリンパ流に乗ってリンパ節に流入する微小粒子 (抗原) を直下の B 細胞領域に送達することが報告されている。つまり、原発巣におけるがん細胞の細胞死によって生じた抗原が早期の GC 形成を誘導した可能性が高いと言える。従って、この GC 形成は現在の術中迅速組織診における遊離腫瘍細胞 (ITC) や微小転移など、早期転移に対するサロゲートマーカーになりうる

思われる。これらの結果から PNA や GL7 抗体など既知の GC マーカーと AID など抗原に対する活性化に伴い発現が誘導される分子を同時にイメージングターゲットにする事で、SLN の転移状態の診断につながる事が考えられる。また、GC 形成が免疫応答の活性化であることを鑑みれば、予後との相関に影響している可能性が高く、予後予測への応用も期待できる。

これらは今後、検討を重ねていくべき課題である。

近年、乳癌において、SLN 内の転移病巣の大きさが 2 mm 以上であっても腋窩リンパ節郭清省略による生存率や再発率が低下しないと報告が散見されるが、省略の可否は他の条件の適・不適をふまえたうえで、担当医との相談によって決められる。

このため、上記の GC 形成や GCB 細胞の活性化と予後の相関性を明らかにすることができれば、乳癌の所属リンパ節（腋窩リンパ節）の郭清の省略の可否を判断する補足情報として有力なものとなり、乳癌患者の quality of life の向上に貢献するものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

大貫 和信、藤井 博史、マウスモデルを用いたセンチネルリンパ節内免疫反応の経時的解析、第 18 回 SNNS 研究会学術集会、2016 年 11 月 12 日、品川シーズンテラスカンファレンス（東京都・品川区）

大貫 和信、藤井 博史、マウスリンパ節転移モデルを用いたセンチネルリンパ節内免疫反応の経時的解析、第 17 回 SNNS 研究会学術集会、2015 年 11 月 13 日、ワークピア横浜（神奈川県・横浜市）

大貫 和信、藤井 博史、マウス転移モデルを用いたセンチネルリンパ節内免疫反応の経時的解、第 16 回 SNNS 研究会学術集会、2014 年 9 月 20 日、城山観光ホテル（鹿児島県・鹿児島市）

大貫 和信、藤井 博史、マウス転移モデルを用いたセンチネルリンパ節内免疫反応の経時的解析：画像診断技術への応用、第 15 回 SNNS 研究会学術集会、2013 年 9 月 21 日、釧路プリンスホテル（北海道・釧路市）

Kazunobu Ohnuki、Hirofumi Fujii、Time-course analysis of the immune cells in the sentinel lymph node in a mouse model of metastatic melanoma: possibility of the application toward an imaging diagnostic technology. The 5th

International Symposium on Cancer Metastasis and the Lymphovascular System and the 8th International Sentinel Node Society (ISNS) Meeting (Joint International Oncology Congress, 2013), 2013 年 5 月 27 日, San Francisco, CA, USA

〔図書〕(計 1 件)

Kazunobu Ohnuki, Hirofumi Fujii: Non-clinical imaging studies for the diagnosis of lymph node metastases. Shoji Natsugoe, ed., (In) Lymph Node Metastasis in Gastrointestinal Cancer, Springer, (in press).

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博史 (FUJII, Hirofumi)  
国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・分野長  
研究者番号： 80218982

(4) 研究協力者

大貫 和信 (OHNUKI, Kazunobu)  
国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・RI 管理者