



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	外科的リンパ系再構築法を目指したリンパドレナージパターンおよびリンパ節局所免疫能に関する研究
Author(s)	前田, 拓
Description	配架番号 : 2408
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13029号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13029
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70318
Type	doctoral thesis
File Information	Taku_Maeda.pdf



学 位 論 文

外科的リンパ系再構築法を目指したリンパドレナージパターン
およびリンパ節局所免疫能に関する研究

(Studies on the lymph drainage patterns and local immune-mediated effect of a
lymph node for the surgical lymphatic regeneration)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

前 田 拓

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 項
緒言	3 項
略語表	5 項
第一章 頭頸部領域におけるリンパドレナージパターンの分析	
緒言	7 頁
実験方法	8 項
実験結果	9 項
考察	14 項
第二章 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について	
緒言	17 頁
実験方法	19 項
実験結果	22 項
考察	28 項
第三章 外科的リンパ系再構築法によるリンパ節局所免疫能の回復について	
緒言	31 頁
実験方法	32 項
実験結果	39 項
考察	49 項
総括および結論	52 項
謝辞	53 項
引用文献	54 項

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Maeda T, Yamamoto Y, Furukawa H, Oyama A, Funayama E, Murao N, Hayashi T.

Dominant lymph drainage patterns in the occipital and parietal regions: evaluation of lymph nodes in patients with skin cancer of the head.

International Journal of Clinical Oncology (Int J Clin Oncol. 22, 774-779(2017))

2. Maeda T, Yamamoto Y, Iwasaki D, Hayashi T, Funayama E, Oyama A, Murao N, Furukawa H.

Lymphatic Reconnection and Restoration of Lymphatic Flow by Nonvascularized Lymph Node Transplantation: Real-Time Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran.

Lymphatic Research and Biology (Lymphat Res Biol.Sep 28(2017) doi:10.1089/lrb.2016.0070)

また、本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

3. Maeda T, Hayashi T, Yamamoto Y, Iwasaki D, Ishikawa K, Funayama E, Murao N, Osawa M, Oyama A, Furukawa H.

Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node

International journal of cancer (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 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
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, 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
3. 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

緒言

生体内において、リンパ系は複雑でありその機能は多岐に渡る。リンパ系は骨髄、胸腺、リンパ節、リンパ管、脾臓などの全てを含む概念であり、リンパ組織はリンパ球とそれらが存在する結合組織を指す。リンパ球産生に関わる骨髄、胸腺は一次リンパ組織に、リンパ球反応の場であるリンパ節、脾臓、パイエル板などは二次リンパ組織に含まれる。リンパ管は組織液の恒常性を制御し、免疫細胞の輸送に関わる。リンパ節は輸出入リンパ管と連続し、免疫応答に関わる。リンパ組織として、循環に関わるリンパ管と免疫反応に関わるリンパ節は密接に関係している。

リンパ節転移に対して施行されるリンパ節郭清術は、この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で、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。

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、リンパ管静脈吻合術が広く行われるようになってきた。これは、リンパ輸送能を回復させるために、リンパ管を直接静脈へ吻合することで、リンパを効率よく輸送させるという方法である。本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、数多くの文献で報告されている。しかしながら、炎症が進行し、瘢痕を形成した組織に対しては、その効果は不十分である。そこで新たに登場した術式が、外科的リンパ系再構築法の一つであるリンパ節移植という方法である。リンパ節を含むリンパ組織を血管付きで移植し、マイクロサージャリーの技術を用いて、移植先の血管と血管吻合を行う。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。難治なリンパ浮腫に対しても本方法が有用であるとする報告が近年増えている。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く、今後基礎研究・臨床研究によるデータの蓄積が待たれる。

リンパ組織を扱う際に、循環系・免疫系という観点からリンパ系の破綻・回復を論

じることが、今後ますます重要となってくると思われるが、リンパドレナージパターンというリンパの流れもまた重要な概念の一つである。特に、皮膚悪性腫瘍の治療においては、リンパドレナージの概念の理解が必要である。なぜなら腫瘍はドレナージパターンに沿ってリンパ節転移するからである。現在、リンパドレナージパターンに基づいた必要十分なリンパ組織の郭清が、根治を目指す上で、必要不可欠な治療法の一つとされている。皮膚癌がリンパドレナージパターンに沿って流れていく最初のリンパ節である、センチネルリンパ節(Sentinel lymph node: SLN)の大多数は腋窩、鼠径で確認されるが、特に頭頸部領域ではリンパドレナージパターンが十分に解明されていない。今後、リンパ節郭清後の外科的リンパ系再構築法を応用するにあたり、生体でのリンパドレナージパターンの十分な把握が不可欠である。

そこで、外科的リンパ系再構築法の樹立を目指し、まずは最も複雑なリンパ流の一つと考えられる頭頸部領域のリンパドレナージパターンについて、第一章でその研究を論述した。そして、リンパドレナージパターンの分析で得られた知見を踏まえ、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。第二章において、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についての研究を論述し、また第三章において、外科的リンパ系再構築法によるリンパ節局所免疫能の回復についての研究を論述した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA	analysis of variance
BCA	bicinchoninic acid assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBA	fetal bovine serum
HE	hematoxylin and eosin
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
ICG	indocyanine green
IFN- γ	interferon-gamma
IL	interleukin
LYVE-1	lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1
NPLN	naïve popliteal lymph node
PBS	phosphate-buffered saline
PDE	photo dynamic eye
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RT	reverse transcription
SEM	standard error of the mean
SLN	sentinel lymph node
SLNB	sentinel lymph node biopsy
TDPLN	tumor draining popliteal lymph node
TDTLN	tumor draining transplanted lymph node
Tyrp1	tyrosinase-related protein 1

頭頸部領域における
リンパドレナージパターンの分析

緒言

メラノーマの治療においては、生検に基づく進行期に応じた治療体系が重要な予後規定因子であり、どの患者にリンパ節郭清を行うべきかが重要である¹。その中で、SLN 生検(sentinel lymph node biopsy: SLNB)およびリンパ節郭清がメラノーマを含む皮膚癌の治療において必須であると現在考えられている。

SLN は、上述したように、原発から腫瘍細胞がリンパに乗って最初に流れ込むリンパ節である。メラノーマの大規模研究では SLN は腋窩に 55%，鼠径部に 45%同定されるが、頸部ではわずかに 7%であり、その他の場所が 3%であった²。特に頭部原発の皮膚癌においては、典型的なリンパドレナージパターンの報告が過去にほとんどないために、特に SLN の正確な同定が必要と考えられる。

これまで当教室は、顔面原発皮膚癌のリンパドレナージパターンについて分析・報告してきた³。一方で、後頭部や頭頂部原発皮膚癌のリンパドレナージパターンについては詳細な報告がない。しかし実際には、後頭部や頭頂部原発皮膚癌患者に対してリンパ節郭清術を施行することはあり、どの領域をどの程度郭清すべきかについては慎重に検討しなければならない。

リンパ節郭清後のリンパ系再構築法によるその効果の検証を最終目標とし、生体内でのリンパドレナージパターンの充分かつ適切な把握が必要であることから、まずは頭頸部領域の複雑なリンパドレナージパターンについて分析を行った。

実験方法

1. 患者情報の集積

本研究では、1981 年 1 月から 2015 年 12 月までに当科を受診した、後頭部および頭頂部原発の皮膚癌患者でありかつ、SLNB そして/またはリンパ節郭清を受けた、原発から所属リンパ節までのリンパ流が同定可能な患者を対象とした。

本研究は、北海道大学で承認された自主臨床研究計画(自 016-0334)に基づいて行ったものであり、倫理性が確保された研究を遂行するためにヘルシンキ宣言の原理に基づいて行った。

2. 研究の評価項目の設定

原発腫瘍からのリンパのドレナージパターンを分析するために、リンパ節郭清後の SLN またはリンパ節転移の場所を後ろ向きに調査した。

SLN の同定のために、triple technique（リンパシンチグラフィー、術中のパテントブルーによる色素法、ガンマプローベ法を併用）を施行した。リンパシンチグラフィーは、術前にテクネシウム 99 で標識したフチン酸を、腫瘍周囲の皮内に投与し、評価した。2009 年以降は、頭頸部領域での shine-through 現象による干渉をさけるために、triple technique に加え、indocyanine green(ICG)を用いたリアルタイム蛍光リンパ管造影検査を併用した。

結果

表 1 に対象とした患者の情報を記載した。本研究に参加した患者は男性が 5 名、女性が 3 名であり年齢の中央値が 43 才(36 才-85 才)であった。3 名が頭頂部に、5 名が後頭部に原発腫瘍を認めた。疾患の内訳は、メラノーマ 5 名、有棘細胞癌 1 名、粘液癌 1 名、脂腺癌 1 名であった。臨床上、明らかに所属リンパ節転移を認める 3 名がリンパ節郭清を施行され、遠隔転移が臨床上認められない 5 名において SLNB が施行された。SLN の結果、病理学的にリンパ節転移を認めた症例に対しては(Case2,3,5), 引き続いて、リンパ節郭清が施行された。

表 1. 後頭部領域および側頭部領域に原発皮膚癌を認めた患者のリンパ流の分析結果

Case	Age (years)/sex	Disease	Primary region	Metastatic status of regional LN	SLN location	LN metastasis after dissection	Prognosis
1	42/male	Melanoma	Occipital	Clinically positive		Occipital LN Levels II, III, IV, V	DOD (12 months)
2	85/male	Melanoma	Parietal	Clinically negative	Occipital LN (+) Level II (+)		DOD (12 months)
3	43/female	Melanoma	Occipital	Clinically negative	Occipital LN (+) Level V (+)		DOD (14 months)
4	36/male	Melanoma	Occipital	Clinically positive		Level II	CDF (14 years)
5	51/male	Melanoma	Parietal	Clinically negative	Level V (+)		CDF (16 months)
6	54/female	Squamous cell carcinoma	Occipital	Clinically positive		Retroauricular LN Occipital LN, Level II	CDF (16 months)
7	43/female	Mucinous carcinoma	Occipital	Clinically negative	Occipital LN (-) Level II (-), V (-)		LM, AWD (15 months)
8	38/male	Sebaceous carcinoma	Parietal	Clinically negative	Occipital LN (-) Level V (-)		LM, AWD (34 months)

LN lymph node, SLN sentinel lymph node, DOD died of the disease, CDF continuously disease-free, LM lung metastasis, AWD alive with the disease, (+) lymph node metastasis, (-) no lymph node metastasis

原発腫瘍の場所と実際のそれぞれの患者のリンパ流のパターンを図 1 に示す。最終的に、後頭リンパ節に流れた症例が 8 例中 6 例で 75%, Level II に流れた症例が 5 例で 62.5%, Level V に流れた症例が 5 例で 62.5%であった。Level III へは 1 例で 12.5%, Level IV へは 1 例で 12.5%, 後耳介リンパ節へは 1 例で 12.5%であった。

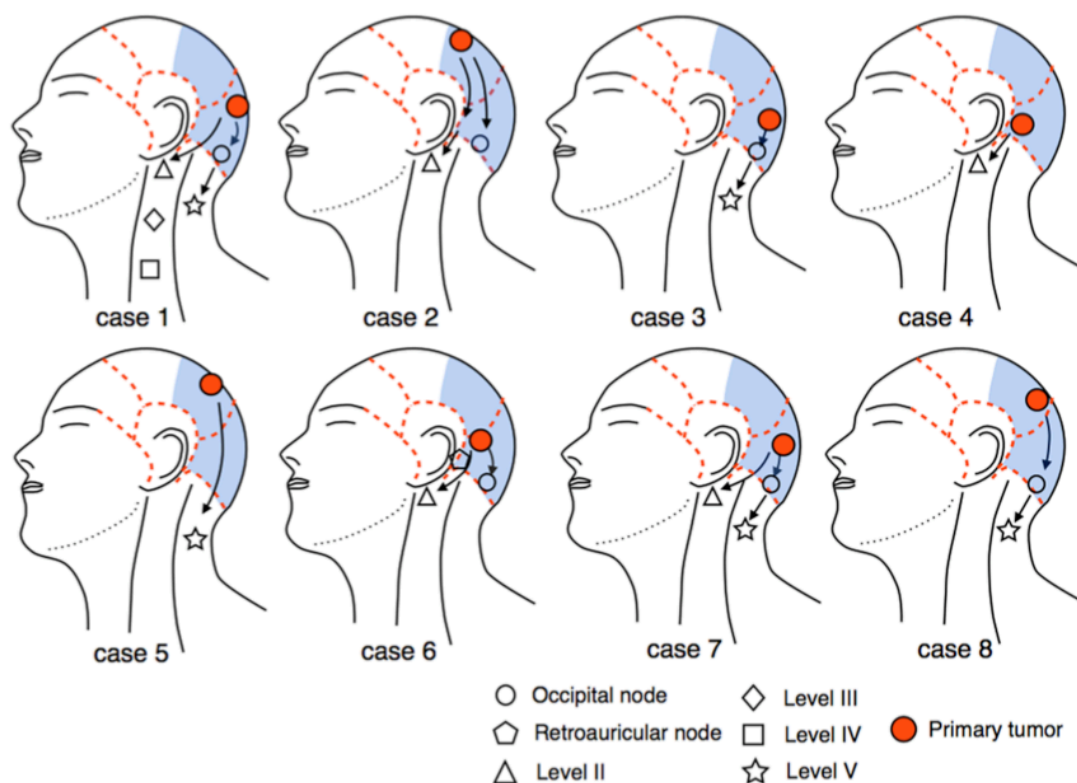


図1. 個々の症例の原発腫瘍部位とリンパドレナージパターン。赤丸は原発巣を、白抜き図形は頭頸部のリンパ節領域を示す。後頭リンパ節に流れた症例が8例中6例で75%, Level IIに流れた症例が5例で62.5%, Level Vに流れた症例が5例で62.5%であった。Level IIIへは1例で12.5%, Level IVへは1例で12.5%, 後耳介リンパ節へは1例で12.5%であった。

本研究で対象とした8例のうち、後頭リンパ節への流れを認めた6症例のリンパドレナージパターンをまとめたものを図2に示す。このうち、6例中4例(67%)でLevel Vへのリンパドレナージパターンを認めた。解剖学的見地から、リンパは後頭領域からはLevel IIよりはLevel Vへと流れる傾向があるものと思われた。6例中2例においては、リンパは後耳介リンパ節、Level II、Level IIIへと流れた。このことは、リンパは後耳介リンパ節からは、Level Vではなく、Level II-IVへと流れる傾向があると思われた。

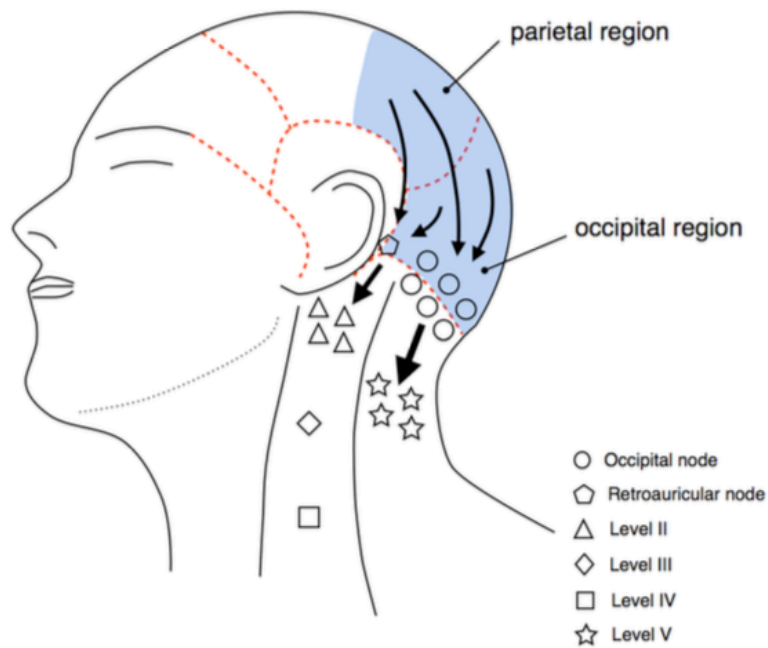


図2. 後頭リンパ節にリンパの流れを認めた6症例(Case 1-3, 6-8)におけるリンパドレナージパターンをまとめたもの。6例中4例(67%)でLevel Vへのリンパドレナージパターンを認めた。

後頭リンパ節へ転移を認めた症例の予後は不良であり, 4例中1例のみが術後16ヶ月生存していた。3例は14ヶ月以内に亡くなった(表1)。

症例

・ Case 2. 85 才男性。頭頂部メラノーマ

頭頂部の色素斑を incisional biopsy 施行したところ、メラノーマと診断された。術前のリンパシンチグラフィーでは、Level II、後頭リンパ節に SLN を認めた(図 3)。原発腫瘍の広範囲切除術および SLNB を受けた。切除病変部の病理学的所見では, thickness 4mm のメラノーマの診断であった。SLN は Level II で 1/2, 後頭リンパ節で 1/1 で転移陽性であり, pT3bN2aM0, Stage III C と診断され, リンパ節郭清術および術後 IFN- β の補助療法を 3 コース, 術後放射線療法 40Gy/20Fr を受けた。しかしながら, 肝臓および骨髄へ転移を認め, 外科的加療後 12 ヶ月で亡くなった。

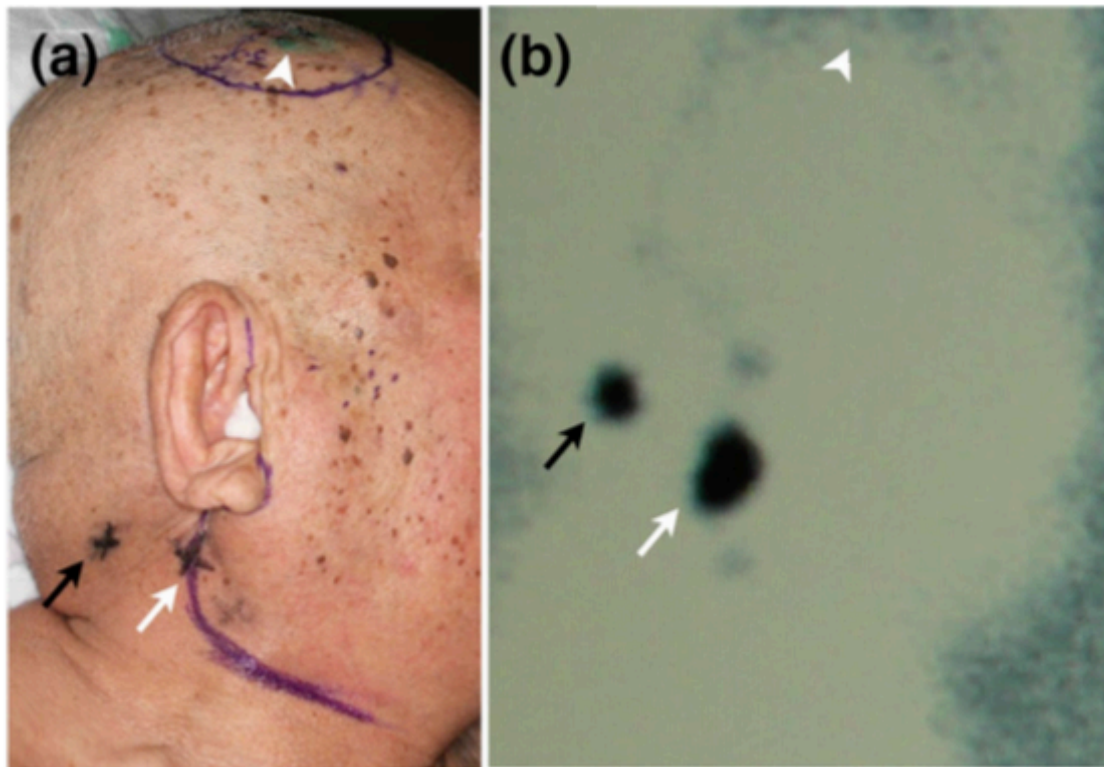


図 3. 85 才男性。頭頂部原発メラノーマ。(a)原発腫瘍部位と SLN の場所 (b)リンパシンチグラフィー。White arrowhead : 原発, black arrow : 後頭リンパ節, white arrow : Level II

・ Case 7.43 才女性。後頭部粘液癌

後頭部領域に 25mm×23mm の硬い結節を認め、辺縁部切除の結果、病理学的に粘液癌と診断された。術前のリンパシンチグラフィーでは後頭リンパ節領域、Level II、Level V に SLN を認めた(図 4)。その後、原発の拡大切除および SLNB を受けた。病理学的に腫瘍の残存はなく、SLN にも転移は認められなかった。後頭部 SLN のサイズは約 5mm であり、その他の SLN に比べると極めて小さかった。経過の中で肺転移をきたしたが現在タモキシフェンによる化学療法を受けており、生存している。

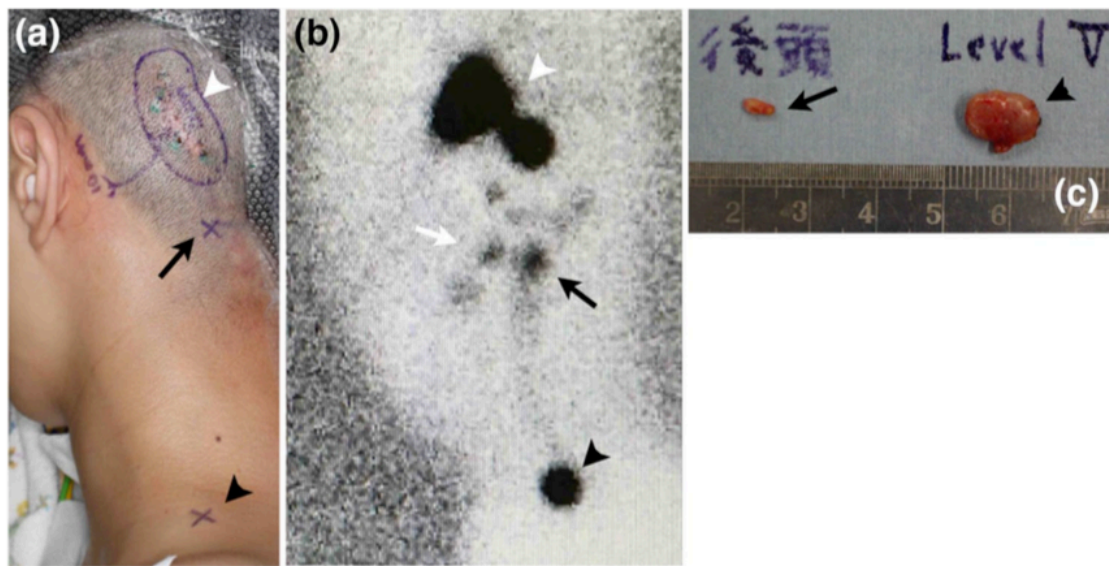


図 4. 43 才女性。後頭部粘液癌。(a)原発腫瘍部位と SLN の場所 (b)リンパシンチグラフィー。White arrowhead : 原発, black arrow : 後頭リンパ節, white head : Level II, black arrowhead : Level V

考察

外科的リンパ系再構築法を目指すためには、適切なリンパドレナージパターンの分析が必要である。これを行うことで、どの場所に、どのような方法を用いて、最も適切な外科的リンパ系再構築を行うことができるか、についての実現可能な計画を立てることが可能と考える。そこで動物実験での外科的リンパ系再構築法につなげるために、まずは最も複雑なリンパドレナージパターンを有する、頭頸部領域のリンパドレナージパターンについての分析を行った。

頭頸部領域におけるリンパドレナージパターンに関する研究は少ない。その中で Cadaver を用いてドレナージパターンを詳細に検証した研究がある。Pan らは頭頸部皮下の浅い組織のドレナージパターンに関して検証し、リンパが頭頂部領域から後耳介領域と頸部の領域へ、そして後頭部領域から後頭リンパ節へと流れることを示した⁴。2005 年に Suami らが報告した方法⁵を用いて、彼らはまた頭頸部領域の皮下の深い組織のリンパドレナージパターンについても検証し、頭頂部領域から後耳介領域と深部後頭リンパ節へ流れることを示した。一方で、後頭部領域からは浅および深後頭リンパ節および Level V リンパ節へと流れることを Cadaver study において示した⁶。実臨床での報告はわれわれの報告が初めてとなるが、われわれの研究結果では、頭頂部後頭部領域からのリンパドレナージパターンは Pan らの報告とほぼ一致していたと考えられた(後頭領域から後耳介を経由して Level II へ流れる症例が複数あった点が異なっていた)。後頭リンパ節へのドレナージを認める症例は、6 例中 4 例(67%)が Level V への流れを認め、このことは実際の臨床においても(Viability のある組織においても)、後頭リンパ節から Level V への直接の流れがあること示唆した。

実際の臨床においては、頭頂部原発皮膚癌と後頭部原発皮膚癌をリンパ流の観点から分ける必要性は少ないと考える。その理由は、SLNB に基づいたリンパ節郭清を考える際に、治療自体は、最終的には同じ手技を行うことになるからである。頭頂部、後頭部領域に原発を有する皮膚癌のリンパ流を分析する際には、後頭部、後耳介部、Level II, Level V リンパ節を SLN として考える必要がある。

本領域の皮膚癌は希少である。それゆえ、確立されたリンパ節郭清の方法がないのが現状である。Posterolateral neck dissection が治療方法の一つとして挙げられる。Plukker らが 1993 年に本術式を報告し⁷、その後、修正を加えた術式が報告された⁸。

Posterolateral neck dissection は level II-V の領域に加えて、後耳介領域と後頭領域を含む郭清手技である。後頭リンパ節は通常は、皮下組織で、僧帽筋浅筋膜下に存在する⁹。本研究では、一例において、僧帽筋の下に再発を認めた。それゆえ、われわれは、郭清を行う際には、頭板状筋の浅い筋膜のすぐ上の層で僧帽筋の頭側を部分的に切除することを考慮しても良いのではないかと考えている。

後頭リンパ節のサイズは本研究では4-6mmと非常に小さかった。後頭リンパ節のマッピングをおこなった研究では、後頭部領域皮下の領域には平均して4個の後頭リンパ節が、平均3mmの長さ(1-6mm)で認められた⁹。後頭部領域以外の領域と比較すると、後頭リンパ節は小さく、同定が難しい。それゆえ、手術の際に、見落とされるリスクが高いと考えられる。そのために triple technique(リンパシンチグラフィー、色素法、ガンマプローベ法)に ICG を用いた Real time 蛍光リンパ管造影検査はこれらのリンパ節の同定に有用であると考えられる¹⁰。

本研究で対象とした患者のうち、後頭リンパ節転移が陽性であったメラノーマ3例と有棘細胞癌1例で、リンパ節郭清を行った。そしてこれらの患者のうち1例のみ(25%)が、経過観察期間内で生存していた。所属リンパ節転移陽性のメラノーマは通常は Stage III または IV と分類される。そして TNM 分類に準拠した5年生存率は、39%から70%と報告されている¹¹。一般的なメラノーマの予後と比較すると、頭頂部または後頭部原発の皮膚癌で後頭リンパ節転移陽性の症例は予後が悪い。この理由の一つは、頭頸部領域の複雑なリンパ流によるのではないかと考えられた。複数の SLN が同定され、この複雑なリンパ系にのって腫瘍が転移する可能性があるために、これを外科的に制御することが非常に難しいと思われる。もう一つの可能性は、リンパ節郭清手技の難しさにある。所属リンパ節転移陽性症例に対して、確実な手技に基づいた郭清は必須であるが、手技が比較的稀であり、統一がなされていない現状を鑑みると後頭リンパ節という小さなリンパ節を十分に郭清することは容易ではないと思われ、今後の検討が必要である。

本研究結果から、リンパドレナージパターンの解析について今後安定した研究を行うには、安定したリンパドレナージが1本確実に同定される場所が望ましいと考えられた。少なくともいくつかのリンパドレナージの経路が認められる場所では、外科的リンパ系再構築を行ったとしてもその評価が難しくなる。頸部リンパ節郭清が一般的な手技であることから、頭頸部はリンパドレナージ研究の候補となりうる場所ではある。しかしながら、特に頭部に限った場合においてもその流れは複雑であり、現時点では鼠径リンパ節郭清を施行した後に、外科的リンパ系再構築法を施行する動物モデルが望ましいのではないかと考え、第二章ではそのモデルを用いて研究を行なった。なお、本研究で得た知見をもとに、リンパドレナージパターンの評価として、リンパシンチグラフィーは複数回の施行が現実的ではないことから、汎用性の高い ICG を用いて、研究を行う方針とした。

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について

緒言

リンパ系は循環系的一部分であり、リンパ管、免疫系のリンパ組織、二次リンパ組織であるリンパ節を含む。リンパは輸送の機能を有するが、異常な脈管系の発達、リンパ管の閉塞、外科的治療によるリンパ系の破壊によりリンパの輸送機能は傷害される。その結果、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、リンパ浮腫という病態が生じる¹²。さらに、リンパ管はまた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。近年、Oashi らはマウスリンパ浮腫モデルでは、通常のマウスに比べ、移植された悪性黒色腫が容易に肺転移することを示した。このことはまさに、免疫細胞の輸送に関わるリンパ管の輸送機能の破綻が腫瘍の増大・転移増悪を惹起することを示している¹³。

傷害されたリンパ系を修復すること、すなわち正常なリンパドレナージパターンを回復すること、はリンパ浮腫の治療において重要である。Supermicrosurgery の技術を用いたリンパ管静脈吻合術は、リンパ浮腫の外科的治療法の一つである¹⁴。臨床では、本方法を支持するさまざまな報告がなされている一方で、動物実験では持続的なリンパ浮腫のモデルを作ることが難しい。しかし、リンパ浮腫の早期持続モデルにおいては、リンパ管静脈吻合の有用性を支持するいくつかの基礎実験の報告もある^{15,16}。近年、リンパ系の局所の外科的再構築法の一つとして、リンパ管静脈吻合以外に、リンパ節移植が報告され、行われるようになってきた^{14,17}。臨床においては、リンパ浮腫の状態にはない別の場所から血管をつけたリンパ節を含む組織を採取し、それをリンパ浮腫の状態となった組織に移植することで、リンパ浮腫の状態を改善させるという報告が増えている¹⁸。リンパ節移植がリンパ系の機能を回復させる機序を示す動物実験の報告もある。Tobbia らは羊を用いて、リンパ節郭清後のリンパ節移植に伴うリンパ系の再構築を、iodine-125 を用いてその効果を示した¹⁹。また Aschen らは、リンパ節移植後のリンパ節とリンパ管との連続性を、technetium-99m を用いて証明した²⁰。しかしながら、これまでリンパ節移植がリンパ系機能の回復に寄与する、すなわち移植したリンパ節へと末梢のリンパ管からリンパが流れていることは間接的に証明されてきたにも関わらず、リンパ管とリンパ節の連続性の回復の詳細な機序および回復の経過についての直接的な証明はされていない²¹。

メラノーマの治療においては現在 SLNB が標準化された方法として確立され、一連の治療の中で重要な検査と位置付けられている¹。Kwon らは、マウスモデルで、この SLN に相当する膝窩リンパ節を切除することで、リンパドレナージパターンが大きく変化することを ICG リンパ管造影検査で示した²²。そしてメラノーマがこの変化したドレナージパターンにそって転移し、転移増悪を惹起する可能性を示唆した。それゆ

え，リンパドレナージパターンの変化が腫瘍の増大，転移増悪に影響を及ぼす可能性がある。もしそうであるならば，局所リンパ系の破綻後のリンパドレナージパターンの回復は腫瘍の増大，転移増悪を抑制する可能性もある。

そこで第二章においてはまず，マウスモデルにおいて，リンパ節の切除がリンパドレナージパターンの変化を引き起こすのか，そしてリンパ節移植を単純な外科的リンパ系再構築法と位置付け，この方法がリンパ管との連続性を回復し，リンパドレナージパターンに対してどのような影響を及ぼすのかについて検証した。

実験方法

1. 実験動物

6-8 週齢の C57BL/6N マウス(18-20g)を三協ラボサービスから購入し使用した。実験は 2.5%のイソフルラン吸入麻酔下で行なった。マウスの左後肢 foot pad に 2 μ l の 2% パテントブルーを局注し、リンパ管およびリンパ節の同定を行なった。皮膚切開のみ加えたコントロール群(Group1), 膝窩リンパ節を切除した群(Group2), 膝窩リンパ節を切除した後にリンパ節を移植した群(Group3)を作成した。マウスを腹臥位とし、外科用剪刀で左後肢に 1cm の切開を行なった(図 5A)。コントロール群では切開した皮膚を 5-0 ナイロンで縫合した。リンパ節切除群では、大腿二頭筋下に青色で染色された膝窩リンパ節(図 5B)を周囲の脂肪組織をつけないでリンパ節のみ切除(図 5C)し、皮膚を 5-0 ナイロンで縫合した。リンパ節移植群では、切除した膝窩リンパ節をそのままもとに戻し(non-vascularized lymph node transplantation), 筋膜を 10-0 ナイロンで縫合し(図 5D), さらに皮膚を 5-0 ナイロンで縫合した。これらの操作は顕微鏡下で行なった。

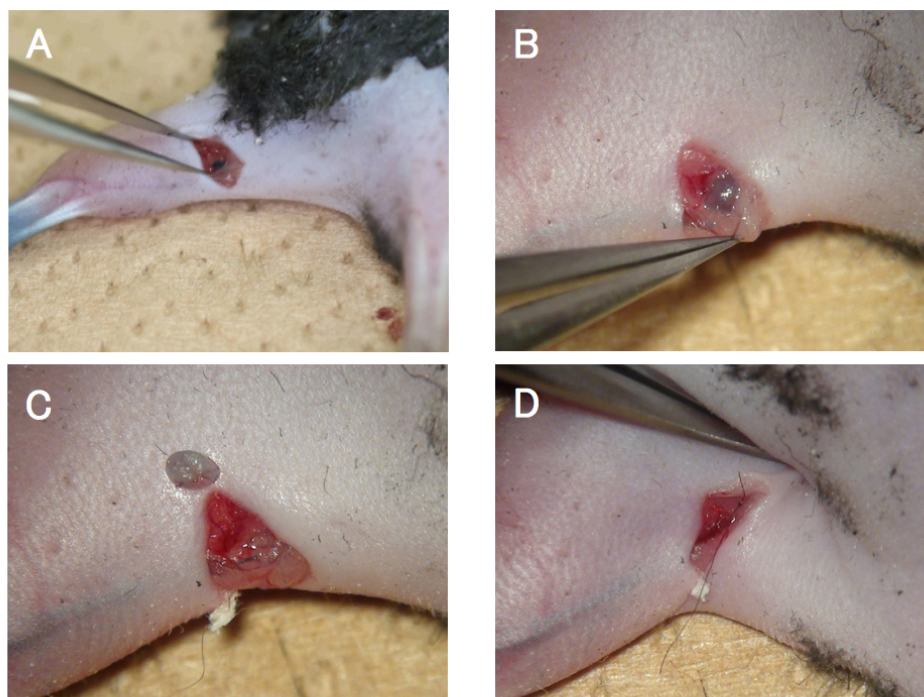


図5 動物モデルの作成。A:マウスを伏臥位とし、左後肢に切開を加え、青染された膝窩リンパ節を同定したところ, B:膝窩リンパ節, C:リンパ節周囲を剥離し、膝窩リンパ節のみを切除したところ, D: リンパ節移植群では、切除した膝窩リンパ節をそのままもとに戻し、筋膜を 10-0 ナイロンで縫合した。

動物実験に際しては、「動物の保護および管理に関する法律」および「実験動物の使用および保管等に関する基準」を遵守し、北海道大学大学院医学研究科における動物実験に関する指針に則り、研究を遂行した。

2. ICG 蛍光造影検査によるリンパ流の同定

術後後肢のリンパ流評価のために、Fluorescence lymphography (蛍光リンパ管造影)を行った。Group1,2,3 の各グループにおいて、術後 4 週間にわたって、1 週間毎に評価した(n=18 per each group)。マウスは、撮像する前に、除毛した。

5 μ LのIndocyanine green (ICG) 溶液(1 mg/ml) を両側のマウス後肢food padに27ゲージのツベルクリン針を使用して皮下投与した。ICGを投与して15分後に、近赤外線カメラ(Photodynamic Eye;Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を使用して後肢全体の蛍光画像を取得した。

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。10 mg/mL fluorescein isothiocyanate-dextran (molecular weight 2000 kD; Molecular Probes, Eugene, OR)10 μ l をマウス両側後肢 foot pad に局注し、15 分後に膝窩リンパ節を採取した。なお右側はコントロールとして採取し OCD コンパウンドに入れ冷凍保存した。クライオトームを用いて組織から切片(20 μ m の厚さ)を作製した。作製した切片を共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview 1000D(Olympus)で蛍光観察した。

4. 免疫組織化学染色, エラスチカマッソン染色

手術後 4 週の時点で Group1,3 のマウスを安楽死させ、解剖学的評価を行うために左膝窩リンパ節を採取した。採取した皮膚検体は4%パラホルムアルデヒドで固定して、パラフィン包埋した組織より切片(4 μ m の厚さ)を作製した。作製したパラフィン切片を使用して免疫組織学的染色およびエラスチカマッソン染色を行った。1 次抗体は The rat anti-mouse CD3 (CD3-12)ポリクローナル交抗体 The rabbit anti-mouse (GeneTex, Irvine, CA), The rat anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)ポリクローナル抗体(WuXi Biosciences, San Diego, CA), The rabbit anti-mouse lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1(LYVE-1)ポリクローナル抗体(Abcam, Inc., Cambridge, Mass.)を使用して、リンパ節の構造の解析をおこなった。脱パラフィン化、抗原の賦活化、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング、非特異的反応のブロッキング、1 次抗体反応の後、ペルオキシダーゼでラベルした同種 IgG 抗体である Histofine Simple Stain MAX-PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan)を反応させジアミノベンジジンで発色した(n = 5 per group per group)。

5. Spectrophotometry

リンパ管の機能を評価する為に青色色素のエバンスブルーをマウス footpad に局注し、リンパに選択的に吸収される色素の回収率について評価した。実験方法については Tammela T らの過去の報告²³を参考にした。色素については、リンパ管内のタンパク質と結合しリンパを染める色素としてメチレンブルー、パテントブルー、オレンジ G、インジゴカルミンなどがある。スルホン基の数が多い方がリンパ管内のタンパク質との結合率が高く、より吸収率を正確に測定可能であるためにエバンスブルーを用いた。

Group 1, 2, 3 のそれぞれに対して、術後 1 日目, 7 日目, 14 日目に 2%エバンスブルーを 20 μ l footpad に局注した。8 時間後に左頸部の静脈から 100 μ l 採血した。これに 900 μ l のホルムアミドを加え、一晩 55°C で incubation した。3000rpm で 10 分間遠心してから上清を採取し、spectrophotometry を用いて 620nm で吸光度を測定した。

実験結果

1. Fluorescence lymphangiography による術後リンパ流評価(n=18 per group)

コントロール群(Group1)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。これは Group2 および Group3 の健側においても同様の正常なリンパドレナージパターンが確認された。

膝窩リンパ節切除群(Group2)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 6)。また n=8 においては術後 1 週目からドレナージパターンが変化し、膝窩ではなく鼠径リンパ節が描出された(図 7)。

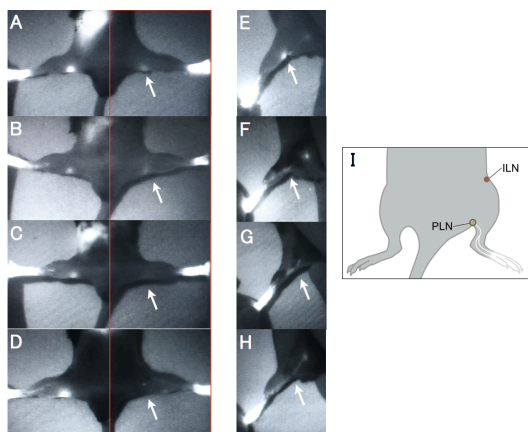


図 6 膝窩へのリンパ流 (n=10)

A-D: 腹臥位, E-H: 側臥位

A, E : 術後 1 週目

B, F : 術後 2 週目

C, G : 術後 3 週目

D, H : 術後 4 週目

Foot pad からのリンパは術後 1 週目から 4 週目まで膝窩リンパ節部位へと流れた。3 週目以降は膝窩リンパ節は描出されなかった。

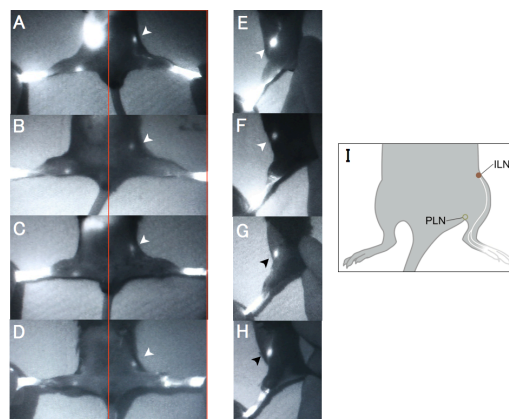


図 7 鼠径へのリンパ流 (n=8)

A-D: 腹臥位, E-H: 側臥位

A, E : 術後 1 週目

B, F : 術後 2 週目

C, G : 術後 3 週目

D, H : 術後 4 週目

術後 1 週目からリンパドレナージパターンが変化し、膝窩ではなく鼠径リンパ節が描出された

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 8)。n=2 においては膝窩リンパ節および鼠径リンパ節の両方が術後 1 週目から 4 週目まで描出された(図 9)。

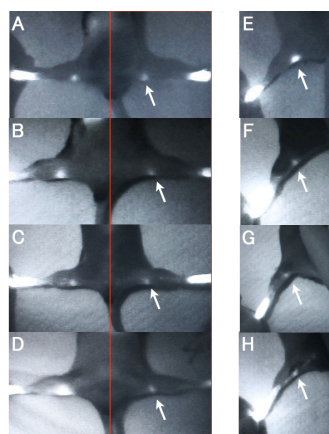


図 8 膝窩へのリンパ流 (n=16)

A-D: 腹臥位, E-H: 側臥位

A, E : 術後 1 週目

B, F : 術後 2 週目

C, G : 術後 3 週目

D, H : 術後 4 週目

Foot pad からのリンパは術後 1 週目から 4 週目まで膝窩リンパ節部位へと流れた。

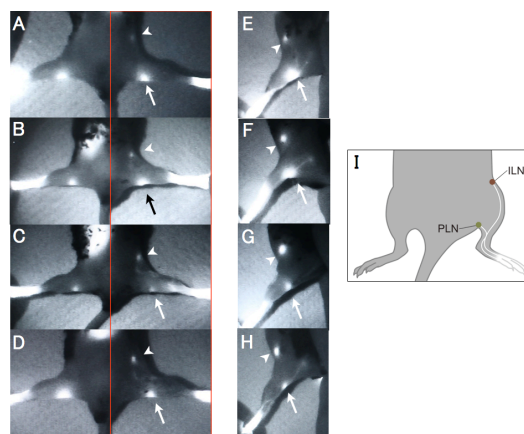


図 9 膝窩と鼠径へのリンパ流 (n=2)

A-D: 腹臥位, E-H: 側臥位

A, E : 術後 1 週目

B, F : 術後 2 週目

C, G : 術後 3 週目

D, H : 術後 4 週目

Foot pad からのリンパは術後 1 週目から 4 週目まで膝窩リンパ節部位と鼠径リンパ節部位の両方へと流れた。

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(Group1)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、髄洞がとくに明瞭に描出された(図 10A)。一方で、リンパ節を移植した Group3 においても辺縁洞および髄洞が明瞭に描出された(図 10B)。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。

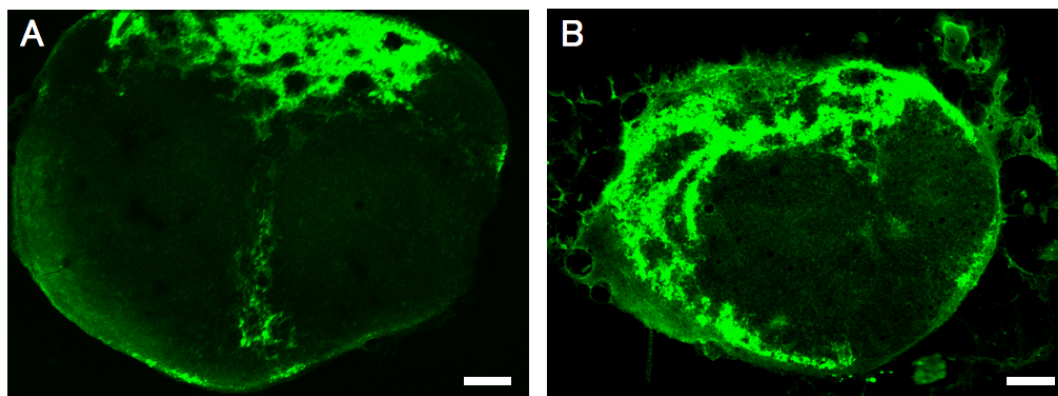


図 10 FITC で蛍光標識されたリンパ節(A : 膝窩リンパ節, B : 移植リンパ節)。
Foot pad に注射した FITC-dextran が膝窩に流れ, リンパが流れる辺縁洞, 髄洞
がとくに明瞭に描出された。

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 11A)。CD3 による T 細胞の局在は傍皮質領域に(図 11B), また B220 による B 細胞の局在は皮質領域に認められた(図 11C)。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 11D)。

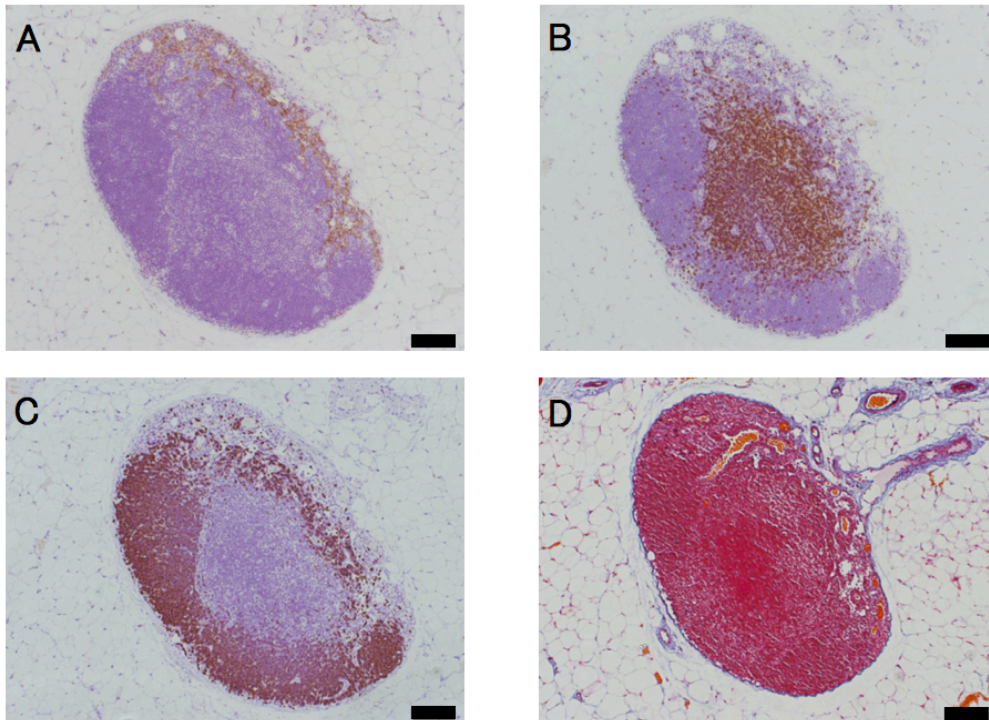


図 11 膝窩リンパ節の免疫組織化学染色(A : LYVE-1, B : CD3, C : B220)およびエラスチカマッソン染色(D)。 (A)リンパ管内皮は辺縁部分に局在していた。 (B) T 細胞は傍皮質領域に認められた。 (C) B 細胞は皮質領域に認められた。 (D)リンパ節周囲に線維化は認められなかった。 bar=100 μ m。

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 12A)。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 12B), 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 12C)。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た(図 12D)。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る。

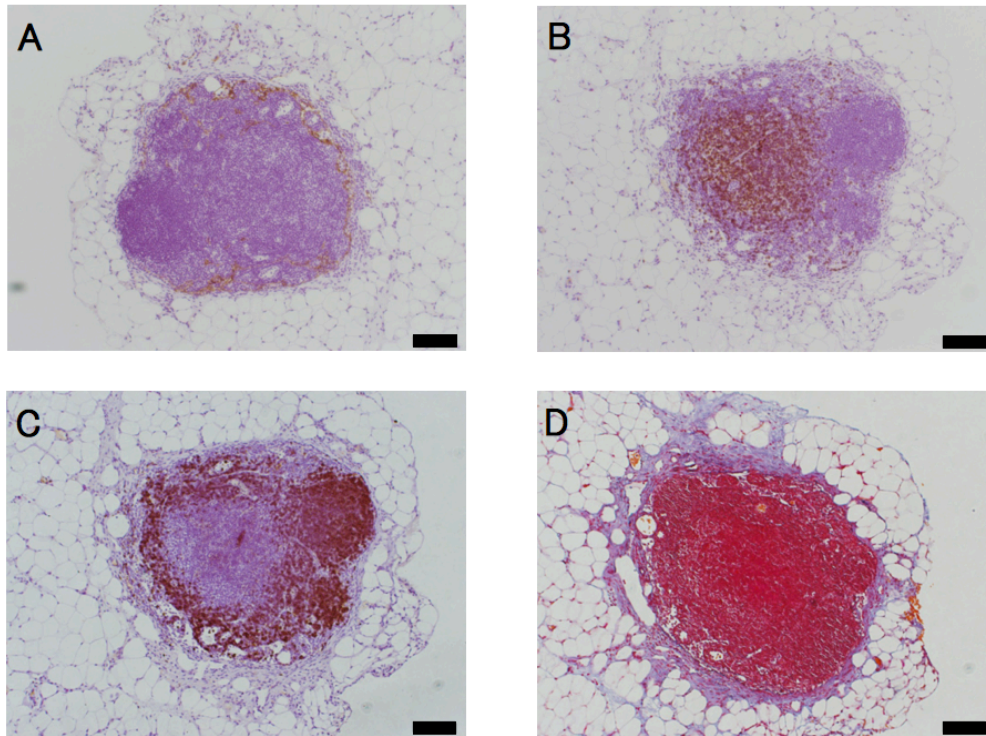


図 12 移植リンパ節の免疫組織化学染色(A : LYVE-1, B : CD3, C : B220)およびエラスチカマッソン染色(D)。 (A)リンパ管内皮は辺縁部分に局在していた。 (B) T 細胞は傍皮質領域に認められた。 (C) B 細胞は皮質領域に認められた。 (D)リンパ節周囲に線維化を認めた。 bar=100 μ m。

4. Spectrophotometry

リンパ系の機能が問題なく、リンパ管へのエバンスブルーの吸収が効率的に行われれば、エバンスブルーの血中濃度が早期から高くなることが予想された。そのためコントロール群では早期から最も吸光度が高く、リンパ節切除により吸光度が低くなり、リンパ節移植では吸光度がコントロール群に近づくことが予測された。

しかしながら、術後 1 日目、7 日目、15 日目、21 日目、35 日目の評価では吸光度の差は認められなかった(図 13. n=2-3)。そのために本実験はリンパ系再構築の機能を証明するための手法としては本実験計画では適当ではないと判断した。

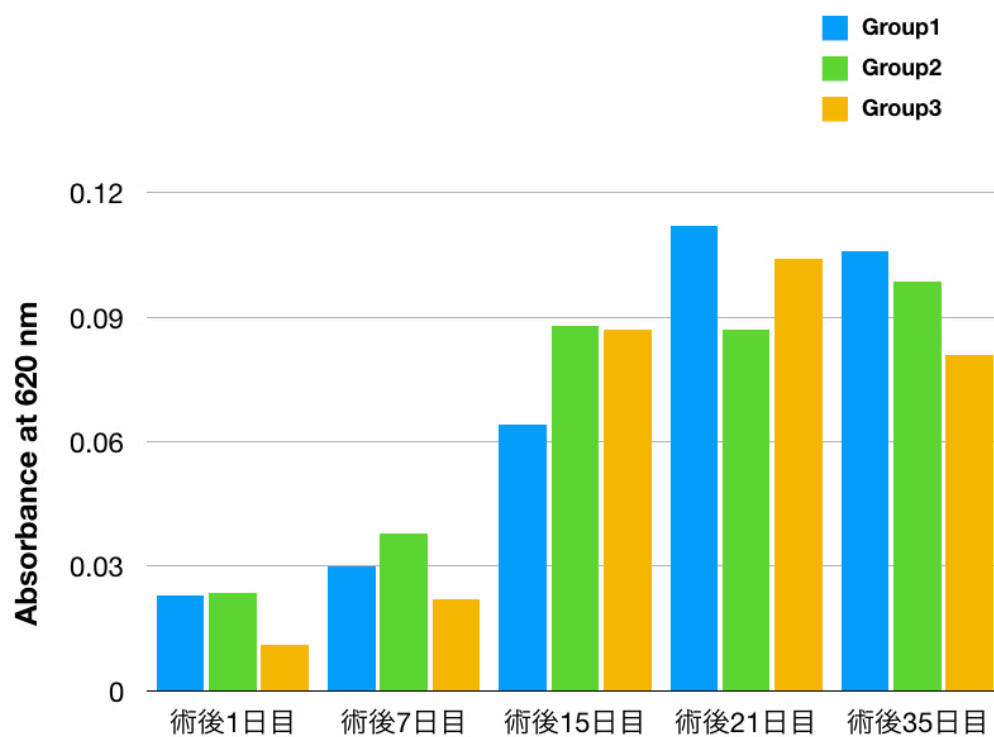


図 13. Spectrophotometry(Group1,2,3 の血中のエバンスブルーの吸光度)。Group 間でエバンスブルーの吸光度に傾向を持った差を認めなかった。

考察

ICG 蛍光造影検査を用いたマウス膝窩リンパ節切除後のリンパドレナージパターンの変化については、過去にいくつか報告されている^{22,24,25}。マウスにおいて、foot pad からのリンパドレナージパターンは通常は膝窩リンパ節から坐骨リンパ節へと流れる。Kwon らは、膝窩リンパ節採取後に foot pad からのリンパ流が鼠径リンパ節へと流れることを報告し、さらに肉眼的所見ではあるが、foot pad に投与したメラノーマ細胞がそのドレナージパターンにのって鼠径リンパ節へと流れ、転移増悪の可能性を示した²²。また Blum らはリンパドレナージパターンの変化の度合いは手術侵襲の程度によるものと報告し、さらに新たなリンパ組織の構築が約 3 週間程度で起こると述べている²⁴。本研究においては、膝窩リンパ節を 1 個のみを切除することでドレナージパターンが膝窩リンパ節から鼠径リンパ節へと変化することを確認したが、ドレナージパターンが安定化するの約 3 週間であり、これは Blum らの報告と一致していた。そして、Group2 で得られた所見、すなわちリンパ節切除後にドレナージパターンが変化せずに膝窩に流れたものの、切除したにも関わらず、術後 2 週目まで膝窩リンパ節が ICG 蛍光造影検査で描出された理由は、リンパ系再構築が行われる過程で、膝窩リンパ節直後に欠損が生じ、そこへ ICG が流れたが、次第にその欠損が消失し再生組織によって完全に置換されたものと推察された。

リンパ浮腫の外科的治療として、近年リンパ節移植の有用性を支持する報告が増えている^{14,18,26,27}。しかしながらこれを支持する基礎研究は限られ、リンパ節移植後のリンパドレナージパターンの回復について詳細に検討した報告はない^{19,20,28,29}。正常なドレナージパターンが回復するためには管腔内の Interstitial flow が重要であることがわかっている^{30,31}。しかし、われわれが本実験で示したように、膝窩リンパ節切除後の、新しいリンパドレナージパターンは、近位リンパ管と遠位リンパ管との間のギャップを橋渡しする前にすでに形成されていた。そしてリンパ節移植は、移植後比較的すぐに近位リンパ管と遠位リンパ管とをつなぐ管腔構造としての役割を果たしていた。リンパ節移植を行った Group3 のうち、2 例において、膝窩と鼠径の両方へのドレナージパターンが確認された。このことは新たなリンパドレナージパターンが、例えリンパ節移植が行われたとしても、外科的介入に引き続いて形成されることを示唆した。

今回われわれが使用した FITC-dextran が、移植リンパ節とリンパ管との形成・結合を視覚化するのに有効であった。デキストランは、皮下への投与の後に選択的にリンパ管に吸収されるために、リアルタイムでリンパの流れを計測することが可能である³⁰。通常のマウス膝窩リンパ節をこの FITC-dextran を用いた方法で行うとリンパ節の周囲の辺縁洞、すなわち輸入リンパ管がリンパ節に入ってきた後に最初に通る構造、が明瞭に蛍光で描出される。そしてそら豆型の中央部に位置する門部でより強く描出

される。これはリンパが辺縁洞に入ったのちに、髄洞へと流れ、最終的に輸出リンパ管へと流れていく構造を反映したものと考えられた。FITC-dextran を移植リンパ節で評価したところ、通常の膝窩リンパ節とほぼ同様に描出された。これは実際に輸入リンパ管が移植リンパ節と繋がり、リンパが髄洞へと流れたことを意味したと考えられた。移植リンパ節の周囲は肥厚した所見が認められ、これが通常のリンパ節との違いであったが、外科的侵襲によって起こった炎症性変化を反映したものと考えられた。LYVE-1 による免疫組織化学染色で検討したリンパ管内皮、および膠原線維を染めるエラスチカマッソン染色の結果もまた FITC-dextran の結果と一致していた。

リンパ節は二次リンパ組織であり、複雑な機能を有している。腫瘍免疫において最も重要な機能の一つは、末梢組織で膠原を認識した樹状細胞がナイーブ T 細胞へと抗原提示を行う場所であるということである²¹。そしてこれらの働きはリンパ管とリンパ節が繋がっているという前提で行われる、このことによってリンパ節内の免疫細胞の恒常性が保たれている³²。われわれは今回、リンパ管と移植リンパ節との形成・結合および移植リンパ節内の T 細胞および B 細胞の分布が保たれるということを示した。しかしながら、実際に自己組織として移植したリンパ節において、腫瘍免疫系で実際にリンパ球が機能しているかどうかについては更なる検証が必要である。そこで第三章として、Tumor draining lymph node(TDLN)としての下肢の SLN と考えられる Tumor draining popliteal lymph node(TDPLN)と、移植したリンパ節のリンパ球の機能に着目した外科的リンパ系再構築後の免疫系の回復, についての研究を行うこととした。なお、免疫系としては、当教室がその仕様を習熟しているメラノーマ細胞を用いることとし、腫瘍免疫系の解析を行う方針とした。

外科的リンパ系再構築法による
リンパ節局所免疫能の回復について

緒言

緒言で述べたように、リンパ系はリンパ管および免疫システムに関わるリンパ組織からなる。リンパ節はこのリンパ組織の構成組織の一つである。リンパ管の主な機能は血管から漏出した液体の回収しそれを血流へも戻すことである。それゆえ、リンパ管の輸送障害は組織のリンパの蓄積、腫脹、繊維化、すなわちリンパ浮腫を引き起こす。またリンパ管は免疫機構において、様々な抗原と抗原を捉える細胞をリンパ節へと運搬する役割を担う^{12,33}。

リンパ組織の構成要素の一つである SLN は腫瘍免疫において非常に重要である。原発腫瘍から最初にリンパの流れを受けるリンパ節であり、腫瘍が転移する際に足場となる場所でもある。また SLN は腫瘍関連因子、たとえばサイトカインなどによって強く影響を受ける²¹。それゆえ郭清などのリンパ組織の破壊は抗腫瘍免疫を減弱させる可能性がある^{13,34}。

近年、臨床においてリンパ浮腫に対するリンパ節移植の有用性を示す報告が増えてきている。しかしながら、本治療はどのようにして効果があるのかという基本的な問題を含めて、解明すべき点が多く、また特に免疫系に与える影響についてはほとんどわかっていない。Huang らが近年、リンパ節移植を行ったマウスでも樹状細胞が増加し、T 細胞免疫が引き起こされたと報告した。しかし、移植リンパ節内で起こるサイトカインや免疫系の細胞の機能面における動的な変化についての詳細は不明である。

Kwon らは、ICG 蛍光リンパ管造影検査によって、マウスの膝窩リンパ節を切除することでリンパドレナージパターンが変化し、このリンパ流にそってメラノーマが転移する可能性を示した²²。リンパ節郭清などによってリンパ管が破壊されると腫瘍の浸潤や転移様式に影響を与える可能性があるという視点は非常に重要である。なぜなら腫瘍はリンパの流れにそって転移する、すなわちリンパは腫瘍細胞が転移する道を供給していることに他ならないからである。第二章において、マウスモデルを用いて、リンパ節の切除がリンパドレナージパターンの変化を引き起こし、リンパ節移植がリンパ管との連続性を回復し、リンパドレナージパターンを回復させたことを示した³⁵。

そこで第三章では、リンパドレナージパターンの変化が腫瘍動態にどのように影響を与えるのか、そしてリンパ節移植という外科的リンパ系再構築法は、ドレナージパターンを回復させることで腫瘍の転移を抑制するのか、について検証した。そしてさらに移植したリンパ節が tumor-draining popliteal lymph node (TDPLN) と比較して、どの程度免疫系に寄与するのかについて、リンパ節局所免疫能という観点から検証した。

実験方法

1. 動物実験モデルの作製

第二章で作成したマウスモデル、すなわち皮膚切開のみ加えたコントロール群 (Group1), 膝窩リンパ節を切除した群(Group2), 膝窩リンパ節を切除した後にリンパ節を移植した群(Group3)を本実験でも用いた。

2. Cell lines (ルシフェラーゼおよび Red fluorescent protein 安定発現メラノーマ癌細胞の維持と調整)

蛍の発光遺伝子であるルシフェラーゼを安定的に発現する B16F10Luc2 メラノーマ細胞株(Caliper Life sciences, Hopkinton, MA)を購入し使用した。B16F10Luc2 細胞は、レンチウイルスベクターによって蛍発光遺伝子(Luc2)を B16F10 細胞に遺伝子導入することで作製される。また RFP を安定的に発現する B16-F10 メラノーマ細胞も用いた。これは、pFB-Neo レトロウイルスによって *Discosoma* sp.RFP を B16F10 細胞に遺伝子導入することで作製される。

移植に用いる細胞は、対数増殖期にある癌細胞を使用した。培養容器に接着している subconfluent に増殖した癌細胞を Trypsin-EDTA solution (0.25% w/v trypsin; Gibco, Eggenstein, Germany)を用いて剥離した後、10% fetal bovine serum (FBS)を添加した RPMI 1640 培養液(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を加えた後、細胞を遠心管に移して遠心 (1500rpm, 5 分間)した。遠心後、細胞を氷冷 phosphate-buffered saline (PBS, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 不含)に再浮遊した。細胞の cell viability (90%以上)を確認するため、トリパンブルーを使用して、細胞数を算定した。細胞密度を $8 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した細胞浮遊液を作製した。

上記で作製した 3 群の動物モデルの左後肢 foot pad に 4×10^5 個(0.05ml)の癌細胞を、27 ゲージ針付ツベルクリンシリンジを用いて注入し、移植した³⁶。腫瘍移植の時期は、各群における手術施行後 4 週間とした。

なお、Group1 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。Group 3 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。反対側のリンパが直接流れ込まない膝窩リンパ節を non-tumor draining popliteal lymph node (non-TDPLN)と呼称する。なおコントロールとして、左後肢 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 14)。

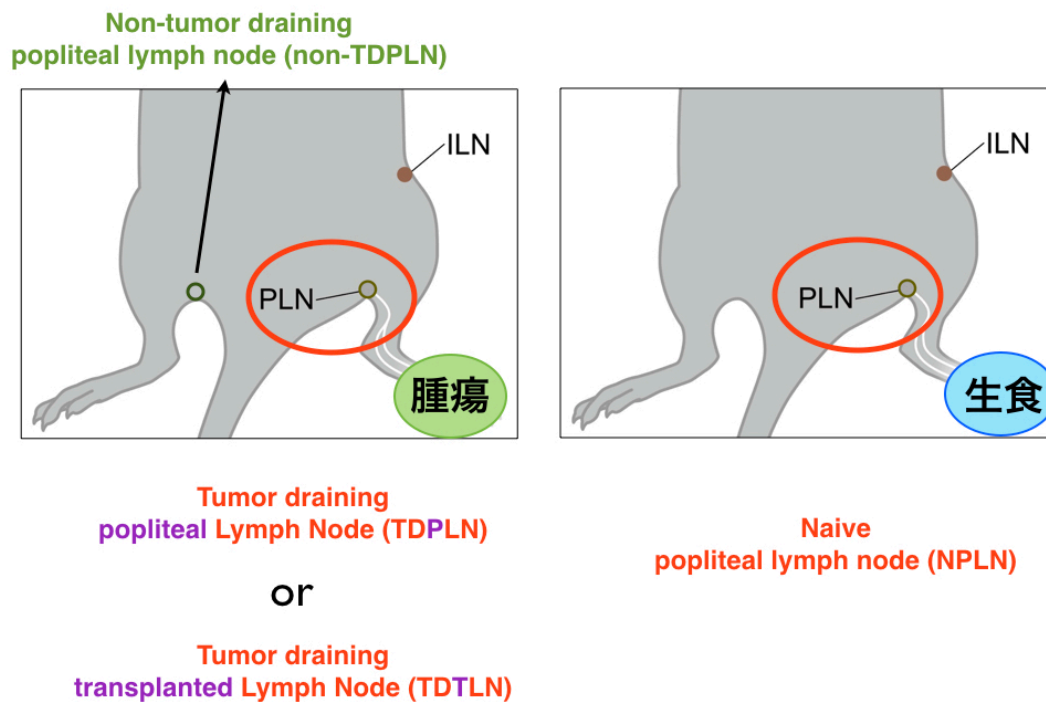


図 14. 腫瘍を有するかどうかの違いによる膝窩リンパ節の呼称について。腫瘍移植後に直接リンパが流れ込むリンパ節は膝窩リンパ節であり， tumor draining popliteal lymph node (TDPLN)と呼称する。リンパが流れ込む移植リンパ節は， tumor draining transplanted lymph node (TDTLN)と呼称する。リンパが直接流れ込まない膝窩リンパ節を non-tumor draining popliteal lymph node (non-TDPLN)と呼称する。

3. 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、非侵襲的かつ経時的に行った。発光酵素であるルシフェラーゼは、その基質であるルシフェリンを酸化ルシフェリンに変換することによって、腫瘍細胞からの生物発光を生じさせる。

150mg/kg/body の D-luciferin (VivoGlo Luciferin, In Vivo Grade; Promega, Madison, WI) 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 Lumazone bioluminescence imager (Nippon Roper, Tokyo, Japan) によって生物発光を検出した。この生物発光の強度は、腫瘍の増加量と重さに一致すると言われている³⁷。この Optical Imaging System を使用して、腫瘍内から発せられる生物発光強度を 1 分間の露出時間で測定した。発光強度は対象領域内で検出される全ての photon の積算値とした(the sum of all detected photon counts)。生物発光の検出は術

後4週で評価した。各 Group で12匹ずつのマウスを用いた。データはSlideBook software (Intelligent Innovations Inc., Denver, CO)を用いて評価した。

4. ルシフェラーゼアッセイによるリンパ節、肺転移の定量的評価

腫瘍移植後5週間で各群のマウスを安楽死させ、鼠径リンパ節、腋窩リンパ節、肺を採取した。PBS で洗浄し、付着血液を除去した組織を液体窒素にて瞬間凍結した。凍結組織は、Micro Smash MS-100(TOMY)を使用して 3500 prm で15秒間破碎した後、Cell Culture Lysis Reagent (Luciferase Assay System; Promega)に溶解した。細胞溶解液を13000rpm、4℃で遠心して上清を採取した。上清に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)することで、転移の定量的評価とした。1群につき C57BL/6N マウス 12匹を用いた。

5. 共焦点レーザー顕微鏡

Group 1, 3それぞれのマウスに対して、モデル作成後4週目に B16-F10-RFP 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(molecular weight 2000 kD; Molecular Probes Inc., Eugene, OR)を foot pad に注射した。15分後に Group1 から左膝窩リンパ節である TDPLNs を、Group3 から左膝窩リンパ節である TDTLNs を採取しOCD コンパウンドに入れ冷凍保存した。クライオトームを用いて組織から切片(30 μ m の厚さ)を作製した。作製した切片を共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview 1000D(Olympus)で蛍光観察した。

6. 組織学的評価

モデル作成後4週の時点で Group1,3 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週目にマウスを安楽死させ、解剖学的評価を行うために左膝窩リンパ節を採取した。なお Group1 の膝窩リンパ節は TDPLNs, Group3 の膝窩リンパ節が TDTLNs となる。採取した組織を4%パラホルムアルデヒドで固定して、パラフィン包埋した組織より切片(4 μ m の厚さ)を作製した。作製したパラフィン切片を使用して免疫組織学的染色を行った。1次抗体は The rat anti-mouse CD3 (CD3-12)ポリクローナル抗体 The rabbit anti-mouse (GeneTex, Irvine, CA), The rat anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)ポリクローナル抗体(WuXi Biosciences, San Diego, CA), The rabbit anti-mouse lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1(LYVE-1) ポリクローナル抗

体(Abcam, Inc., Cambridge, Mass.)を使用して、リンパ節の構造の解析をおこなった。

またメラノーマ細胞のリンパ節転移前のリンパ節の High Endothelial venule (HEV) の評価目的に、腫瘍細胞移植後 2 週目に同様に膝窩リンパ節を採取した。Purified rat anti-mouse MECA-79 (BD Biosciences, San Jose, CA) を 1 次抗体として使用した。脱パラフィン化、抗原の賦活化、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング、非特異的反応のブロッキング、1 次抗体反応の後、ペルオキシダーゼでラベルした同種 IgG 抗体である Histofine Simple Stain MAX-PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan) を反応させジアミノベンジンで発色した (n = 5 per group per group)。

7. RNA 抽出

腫瘍細胞移植後 1, 2, 3, 4 週の時点で、各群のマウスをそれぞれ 6-7 匹安楽死させ、左膝窩リンパ節を採取して凍結保存した。凍結保存した組織は、Micro Smash MS-100 (TOMY, Tokyo, Japan) を使用して凍結破碎した後、スピンカラム法にて total RNA を抽出した。ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐ目的で DNase 処理を行った。一連の操作に用いた試薬は QIA shredder, RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, RNase-Free DNase Set (いずれも QIAGEN, Hilden, Germany) である。得られた RNA 濃度は分光光度計 (Nano Drop ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) を用いて測定した。

8. 逆転写 (RT: reverse transcription) 反応

1 μ g の total RNA から RT により cDNA を作成した。逆転写酵素として High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) を使用した。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) による RT 反応条件は 37°C 60 分, 95°C 5 分, 4°C ∞ とした。

9. リアルタイム PCR

初期熱変性 95°C $\cdot$ 10 分、熱変性 95°C $\cdot$ 15 秒、アニーリング／伸長反応 60°C $\cdot$ 60 秒 $\times$ 40 サイクルのプロトコールでリアルタイム PCR を行った。PCR 装置は StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。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 (n=6-7 per group per time point)。内在性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) を用いた。リアルタイム PCR で使用したプライマー

は以下のとおりである (表 2)。なおリンパ節への転移の評価目的にメラノサイトに特異的なマーカーとして Tyrosinase-related protein 1 (Tyrp1) gene を用いた³⁸。

表 2. 使用したプライマー

Real-time qRT-PCR primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
I12	5' -GGA GCA GCT GTT GAT GGA CCT A-3'	5' -AAT CCA GAA CAT GCC GCA GA-3'
I14	5' -ACG GAG ATG GAT GTG CCA AAC-3'	5' -AGC ACC TTG GAA GCC CTA CAG A-3'
I121	5' -CAG GCT AAG AGC TTG TAT CGT TTG G-3'	5' -AGG ACT GGC TGA GTC TTG AGC AC-3'
IFN- γ	5' - CGG CAC AGT CAT TGA AAG CCT A-3'	5' - GTT GCT GAT GGC CTG ATT GTC-3'
TRP 1	5' - GGA GCT GCA TGC AAC CAG AA-3'	5' - CCA TAT CCA AGG CCC TGA CAA-3'
HPRT	5' - TTG TTG TTG GAT ATG CCC TTG ACT A-3'	5' - AGG CAG ATG GCC ACA GGA CTA-3'

10. フローサイトメトリー, ソーティング

モデル作成後 4 週の時点で Gropu1,3 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 週目にマウスを安楽死させ, リンパ節内のリンパ球の評価を行うために左膝窩リンパ節(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。採取した組織を 0.2%bovine serum albumin(BSA)を添加した PBS 中に浸した。組織を 75 μ ナイロンメッシュで single cell とし, セルカウンターでリンパ級数を測定した。その後, シングルセルを蛍光で標識された抗体(CD4, CD8, CD25, CD62L, B220, CXCR5, PD-1)(いずれも BD Biosciences)で処理した。濾胞性ヘルパー T 細胞の同定のために CXCR5, PD-1 を用いた³⁹。

抗体で処理したサンプルを FACS ariaIII sorter(BD Biosciences)で run した。補正に isotype control を使用した。サンプルを解析した後に, セルソーティングを行ない, CD4 陽性 helper T 細胞, CD8 陽性 cytotoxic T 細胞を採取し, ELISpot アッセイと LIVE/DEAD 細胞傷害性アッセイに使用した。

11. ELISpot アッセイ

IL-2 single color ELISpot kit (Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH) を使用して ELISpot アッセイを行った。腫瘍移植後 4 週目に採取した NPLN, TDTLN, TDPLN から FACS ariaIII sorter によって分類した CD4 陽性 T リンパ球(各 7 匹ずつ)を各 well に 10 万個、サイトカイン特異的な抗体でコーティングしたプレートへ加えた。リンパ球刺激目的に concanavalin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を使用したものと使用しなかった群を作成した⁴⁰。B16-F10-luc2 メラノーマ細胞を各 well に 1 万個加え、9%CO₂ 環境下で、37°C で 24 時間インキュベーションした。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.05% Tween-20 添加 PBS で 2 回洗浄した。IL-2 の detection のため、detection antibody を加えプレートを room temperature で 2 時間インキュベーションした。0.05% Tween-20 添加 PBS で 3 回洗浄した。IL-2 を視覚化するために Strep CTL-Red を加えて、60 分間インキュベーションした。その後、蒸留水でプレートを洗浄し、プレートをスキャンした(Immunospot[®] Cellular Technology Limited, Cleveland, OH)。

12. 細胞傷害性アッセイ

腫瘍移植後 4 週目に採取した TDTLN, TDPLN から FACS ariaIII sorter によって分類した CD8 陽性 T リンパ球(各 5 匹ずつ)を用いた。傷害性アッセイを cell-mediated cytotoxicity kit (Molecular Probes) を使用して行なった。ターゲット B16-F10-luc2 細胞を、DiOC18 を含む染色溶液に浸し 37°C で一晩インキュベーションした。その後、Target 細胞を 10 万個/ml に対して、Effector と target の割合が 20:1 と 5:1 となるように effector 細胞を加え、vivo で T 細胞を活性化するために concanavalin A を加えた。ヨウ化プロピジウムを含む染色液を、死細胞を同定するために加えて、5 分間室温でインキュベーションした。その後、蛍光顕微鏡で細胞傷害性 T 細胞を評価した。なお、effector 細胞のない存在下での死細胞の影響を考慮するために下記の式で補正を行なった。

修正細胞傷害率 = $[(\#G + R \text{ cells} / \#G \text{ cells})_{\text{effectors}} - (\#G + R \text{ cells} / \#G \text{ cells})_{\text{effector}}] \times 100$,
where G indicates green and G + R indicate both green and red.

13. タンパク抽出

腫瘍移植後 2 週目に Group1 から TDPLN を、Group3 から TDTLN を採取して(各 Group 7 匹ずつ)、液体窒素で瞬間凍結した。凍結保存した組織は、Micro Smash MS-100 (TOMY)

を使用して凍結破砕した後、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, Ill.)とプロテアーゼ阻害剤 (Halt Protease inhibitor Cocktail; Thermo Fisher Scientific) に溶解した。組織溶解液を13000rpm、4°Cで遠心分離して、上清を回収した。

タンパク濃度は Bicinchoninic acid 法で測定した。使用した試薬、分光光度計はそれぞれ BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific)、Nano Drop ND-1000 である。

14. Western blot analysis

タンパク抽出物をLaemmliサンプルバッファー(Bio-Rad, Hercules, Calif.)で混合し、ボーイル(5分, 95度)した。ポリアクリルアミドゲル (Any kD ミニプロテインTGXプレキャストゲル; Bio-Rad) にアプライし、200 V、40分の条件で電気泳動し分子量に応じて分離した。トランスブロットTurboブロッキングシステム (Bio-Rad) で Polyvinylidene fluoride (PVDF)膜 (トランスブロットTurboミニPVDF転写パック; Bio-Rad) に転写を行った。転写後のPVDF膜のブロッキングは5%のスキムミルクを含むTris-buffered saline Tween 20 (TBS-T)で行った。

使用した1次抗体はMECA-79抗体(Santa Cruz Biotechnology)で、4°Cで一晩、抗原抗体反応を行った。その後、Horseradish peroxidase (HRP)を標識した2次抗体(GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom)と室温で1時間反応させた。化学発光にはImmobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Bedford, Mass.) を使用し、LAS4000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)を用いて化学発光を検出した。得られたデータの解析には Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) を用いて、バンドの濃淡差を比較した。内在性コントロールとして β -actin抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, Mass.)を使用した(n=7 per group)。

15. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

13 で用意したタンパク抽出物を用いた。The CC-chemokine ligand 21 (CCL21) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて、リンパ節内の CCL21 を測定した。キットのサンプル濃度から作成したスタンダードカーブを用いて、抽出タンパクの濃度を測定した。

16.統計学的解析

2 群間の解析は Student の t 検定で統計解析した。3 群以上に関しては、一元配置分

散分析法(one-way ANOVA)で検定した後、多重比較検定(Tukey-Kramer 法)を行った。得られた結果は平均±標準誤差(standard error of the mean; SEM)で表した。 $P<0.05$ を有意差ありとした。

実験結果

1. PLN 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

第二章の実験結果から、われわれは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、膝窩に流れることを示した³⁵。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 15a)。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 15b, 15c)。

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 15d)。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(* $p<0.05$)。

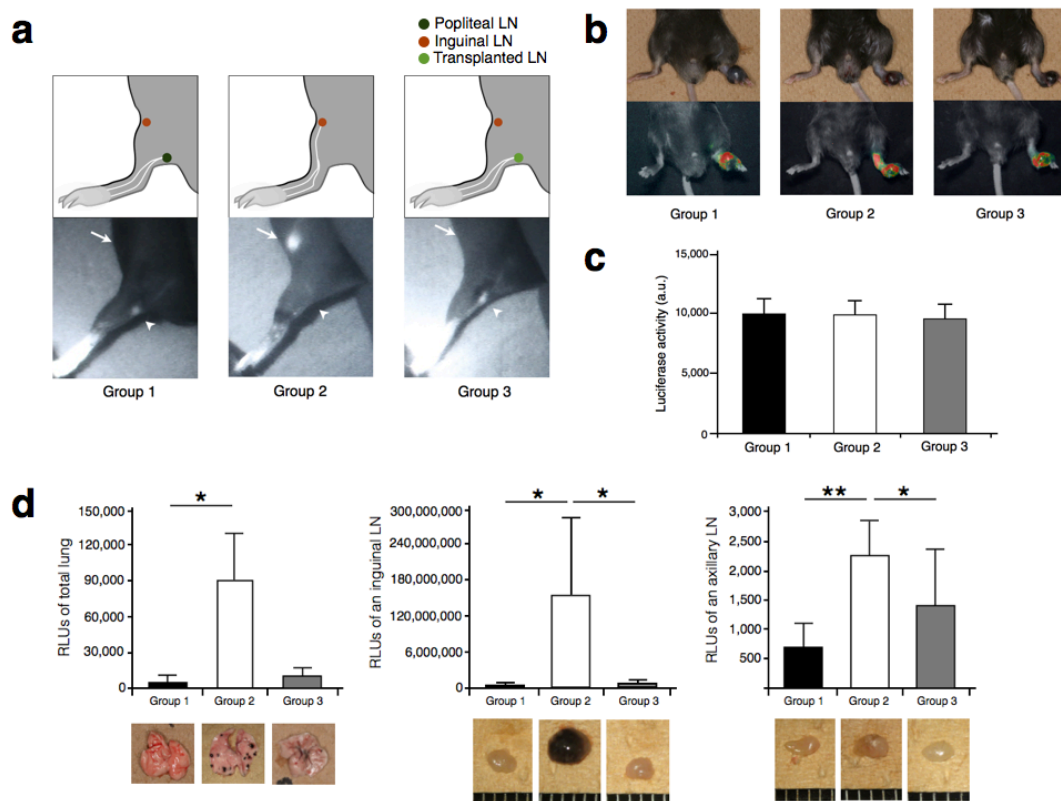


図 15. (a)各 Group でのリンパ流。膝窩リンパ節の切除によりリンパ流が鼠径リンパ節へと変化し(Group2), リンパ節移植によりリンパ流が正常化し, 膝窩に流れる(Group3)。(b)各 Group での foot pad での腫瘍量(原発腫瘍)。(c)蛍光強度による Group 間での腫瘍量の差(各 group n=12)。Group 間で有意差を認めなかった。(d)各 Group での肺転移, 鼠径リンパ節転移, 腋窩リンパ節転移の転移量の差(各 group n=12)。Group2 では肺転移, 鼠径リンパ節転移, 腋窩リンパ節転移が有意に増加した。Group3 では鼠径リンパ節転移, 腋窩リンパ節転移が有意に減少した。

2.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 16a)。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 のリン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⁴¹。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 16b, 16c)。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 16b, 16c)。

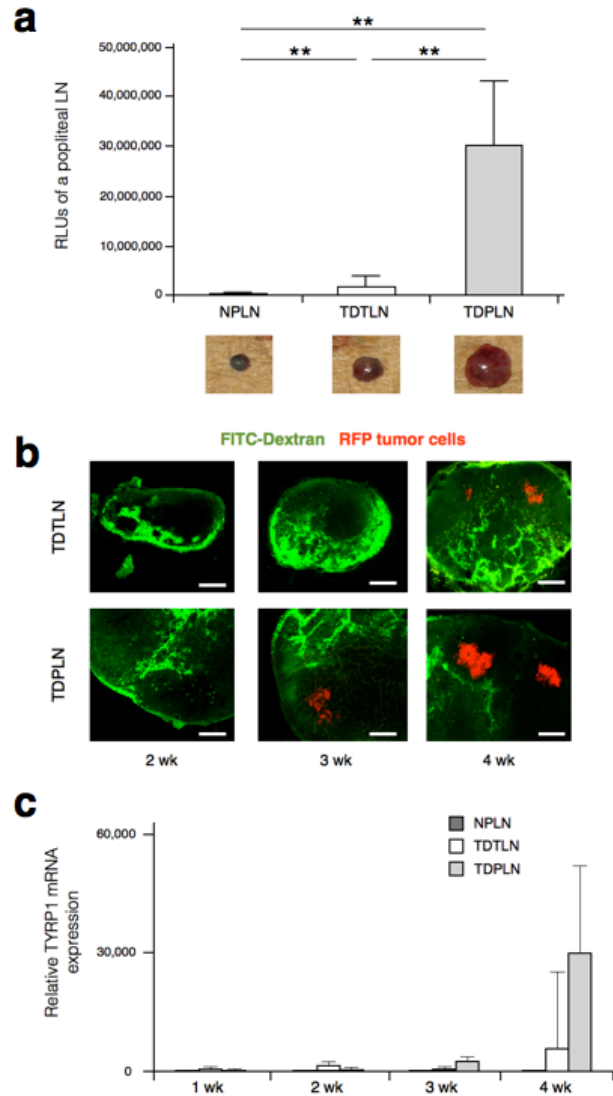


図 16. (a)各 Group でのリンパ節 NPLN, TDTLN, TDPLN の蛍光強度による腫瘍量の差。TDTLN は NPLN に比べ、有意に転移量が多く、TDPLN は TDTLN に比べ、有意に転移量が多い。(b)腫瘍移植後 2,3,4 週目の TDTLN および TDPLN のリンパ節の蛍光画像(緑 : FITC-リンパ, 赤 : RFP-腫瘍)。TDTLN では、移植後 4 週目に、リンパ節転移を認めた。TDPLN では、移植後 3 週目に、リンパ節転移を認めた。(c)腫瘍移植後 1, 2, 3, 4 週目の NPLN, TDTLN, TDPLN の Tyrp1 mRNA の転写量。3 週目以降は、TDPLN の mRNA の転写量が、TDTLN の転写量に比べ多い傾向があった。

3.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17a)。
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17b)。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17c)。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を意味したものと考えられた。

これらのリンパ球は、CD3, B220, LYVE-1での免疫組織化学染色の結果、解剖学的
にはそれぞれの領域、すなわちT細胞は傍皮質領域に、B細胞は皮質領域に、LYVE-1
は辺縁部分を中心に局在していた(図17d)。

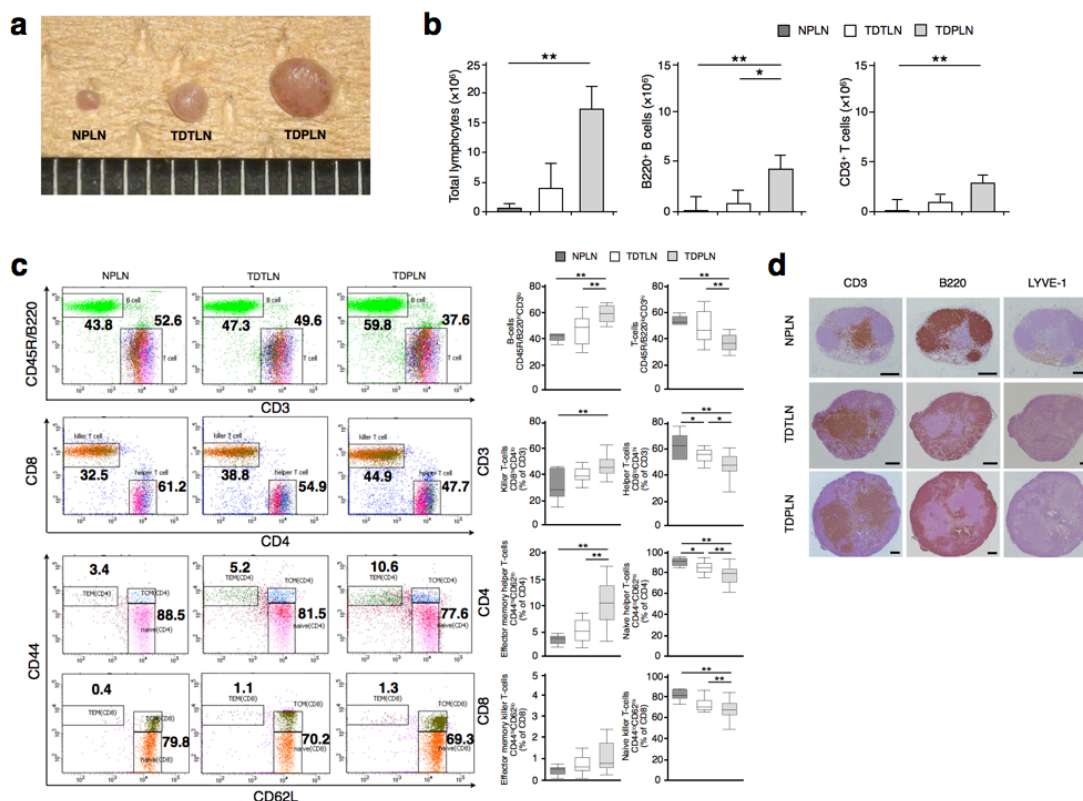


図 17. (a)メラノーマ細胞移植後 4 週目の NPLN, TDTLN, TDPLN の肉眼的所見。NPLN は 1mm, TDTLN は 1.5mm, TDPLN は 3mm であった。(b)NPLN, TDTLN, TDPLN の全リンパ球数, T リンパ球数, B リンパ球数。(c) Fluorescence-activated cell sorting(FACS)でのリンパ節内のリンパ球数の割合(NPLN, TDTLN, TDPLN)。B220^{hi}CD3^{lo} B-cells と B220^{lo}CD3^{hi} T-cells (1 段落目), CD8^{hi}CD4^{lo} killer T-cells と CD8^{lo}CD4^{hi} helper T-cells (2 段落目), CD44^{lo}CD62L^{hi} naïve T-cells と CD44^{hi}CD62L^{lo} effector/memory CD4⁺ helper T-cells (3 段落目), and CD44^{lo}CD62L^{hi} naïve T-cells と CD44^{hi}CD62L^{lo} effector/memory CD8⁺ killer T-cells (4 段落目)。Numbers in dot-plot quadrants represent percentages. Data are presented as box-and-whisker plots (n = 18 per group). *P < 0.05 and **P < 0.01 (two-tailed two-sample unequal variance Student's *t*-test)。B 細胞の割合の増加が TDTLN と TDPLN で確認された(TDPLN>TDTLN)。TDTLN および TDPLN の T 細胞の割合は NPLN に比べ減少した。TDTLN および TDPLN における helper T 細胞と killer T 細胞の割合も変化した。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た。(d) NPLN, TDTLN, TDPLN の免疫組織化学染色(LYVE-1, CD3, B220)。いずれのリンパ節においてもリンパ管内皮, T 細胞, B 細胞をそれぞれの領域に認めた。

4. 移植リンパ節は CD4 T 細胞の活性化を通じて機能する

腫瘍抗原認識後に TDTLN および TDPLN の両方の免疫反応によって産生される IFN- γ , IL-2, IL-4 を RT-PCR で測定した。CD4 陽性の type1 helper T 細胞は IFN- γ , IL-2 などの type 1 サイトカインを, CD4 陽性 type2 helper T 細胞は IL-4 などのサイトカインを分泌する^{42,43}。そしてこれらのサイトカインの分泌増加は, センチネルリンパ節内ではメラノーマフリーの状態で起こると言われている^{41,44}。それゆえ, 前述の結果に基づき, 腫瘍がリンパ節には到達していない時期(図 16b,c)の腫瘍移植後 2 週目のリンパ節を採取した。IFN- γ は NPLN よりも TDTLN でより分泌されていた(図 18a)。IL-4 もまた同様であった。対照的に IL-2 は TDTLN および TDPLN で NPLN ほど分泌されなかった。

IL-2 に関しては, TDTLN および TDPLN における細胞レベルでの分泌を確認するために ELISpot アッセイを行なった(図 18b)。NPLN, TDTLN, TDPLN のいずれもが T 細胞の刺激がない状態ではほとんど IL-2 を分泌しなかった。Concanavalin A を加えると TDTLN (23.8 ± 3.2 spot-forming cells per 10^5 cells)では, NPLN (5.6 ± 1.7 spot-forming cells per 10^5 cells)に比べリンパ球がより IL-2 を分泌した。そして TDPLN (128.7 ± 70.2 spot-forming cells per 10^5 cells; $n = 5$)ではより多くの IL-2 産生リンパ球を認めた。またメラノーマ細胞を加えることで NPLN, TDTLN, TDPLN はそれぞれ, IL-2 を (43.4 ± 9.2 spot-forming cells per 10^5 cells in TDTLNs, 12.4 ± 1.5 spot-forming cells per 10^5 cells in NPLNs, and 174.3 ± 84.0 spot-forming cells per 10^5 cells in TDPLNs)。

濾胞性ヘルパー T 細胞は B 細胞を補助する特殊な機能を備えたリンパ球の一つであり, CD4 陽性 T 細胞の一つである。IL-21 がその機能を果たすのに重要な役割を担っている^{45,46}。今回移植リンパ節の CD4 陽性 T 細胞の機能を調べるに際して, 濾胞性ヘルパー T 細胞にも着目し検証した。IL-21 について, mRNA レベルでは NPLN よりも TDTLN, TDPLN でより IL-21 が分泌されていた(図 18c)(統計学的有意差はなし)が, 実際のリンパ節内では, FACS での分析の結果, 興味深いことに濾胞性ヘルパー T 細胞は同定されなかった(図 18d)。

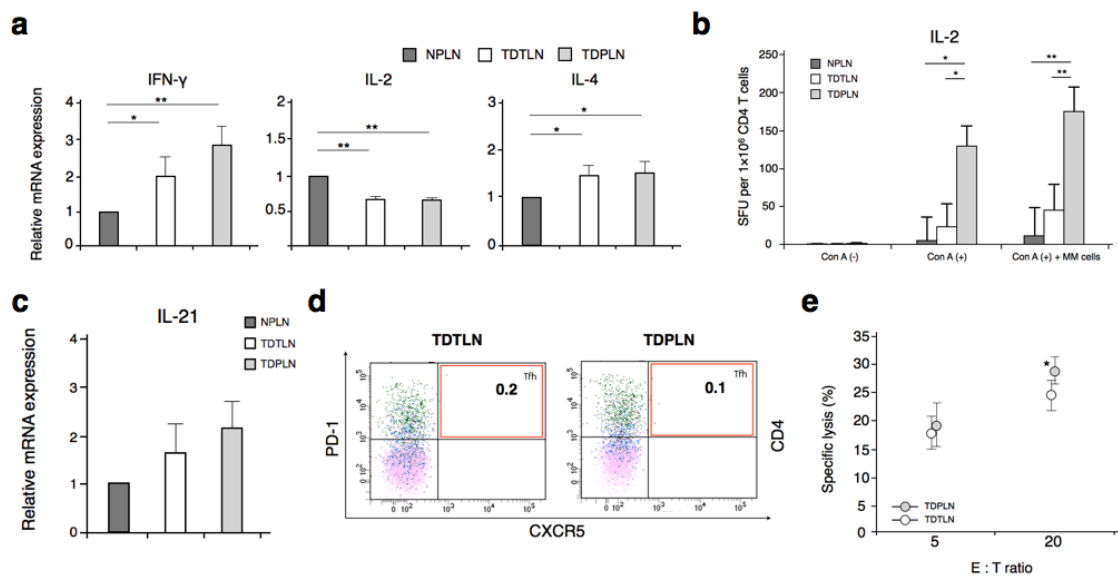


図 18. (a) 腫瘍移植後 2 週目の NPLN, TDTLN, TDPLN の IFN- γ , IL-2, IL-4 mRNA の転写量。IFN- γ , IL-2, IL-4 は NPLN に比べ TDTLN, TDPLN で有意により多く転写された(TDPLN>TDTLN)。 (b)ELISPOT 法による NPLN, TDTLN, TDPLN における IL-2 分泌細胞の数。ConA の存在下では, NPLN に比べ TDTLN,TDPLN で IL-2 分泌細胞の数が有意に多かった(TDPLN>TDTLN)。 (c) 腫瘍移植後 2 週目の NPLN, TDTLN, TDPLN の IL-21 mRNA の転写量。 (d)FACS での PD-1^{hi}CXCR5^{hi} CD4⁺ follicular helper T-cells の割合。TDTLN,TDPLN の両方で, 濾胞性ヘルパーT 細胞は同定されなかった。 (e) 腫瘍移植後 28 日目での TDTLN および TDPLN 由来 CD8 陽性 T 細胞の傷害性アッセイ(各 5 匹ずつ)。T 細胞の増加に伴い, メラノーマ細胞はより多く傷害された。

5.移植リンパ節は CD8 T 細胞の活性化を通じて機能する

T 細胞の抗腫瘍効果を分析するためのもっとも直接的な方法は腫瘍傷害性を持つ CD8 陽性 T 細胞を直接腫瘍に加え, その傷害率を求める方法である。メラノーマは腫瘍特異的ではない, tyrosinase, MART-1/MelanA, gp100 などの組織特異的なメラノサイトの抗原を有するため in vitro で腫瘍の傷害性を同定することが可能である⁴⁷。CD8 陽性 killer T 細胞は, 通常であれば必要とされる付加的なシグナルの入力がなくとも直接腫瘍を破壊することが可能である⁴⁸。そこで, 細胞傷害性 T 細胞の反応を調べるために, メラノーマ細胞移植後 28 日目に TDTLN および TDPLN を採取し, これらのリンパ節に含まれる CD8 陽性 killer T 細胞がメラノーマに対して溶解性を有するかどうかについて検証した。死細胞は赤の核を有する緑色の細胞として描出され, 生細胞は均一な緑色の細胞として描出される(図 19)。

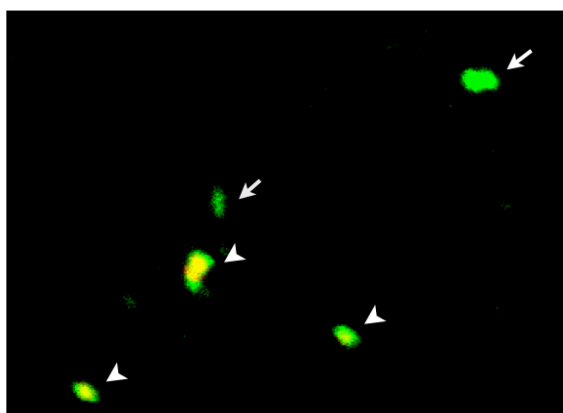


図 19. 蛍光顕微鏡による死細胞(arrowhead)と生細胞(arrow)。死細胞は赤の核を有する緑色の細胞として描出され、生細胞は均一な緑色の細胞として描出される。

TDTLN 由来の CD8 陽性 T 細胞は TDPLN 由来のものと同様に、メラノーマに対して、細胞傷害性を有していた。傷害性の程度については、effector:target=20:1 では TDTLN と TDPLN の間で有意な差を認めた(図 18e)。

6. 移植リンパ節内の High Endothelial Venule(HEV)は獲得免疫系において機能を有する

生体内では、T 細胞の全身の循環はリンパ節内で血液からリンパへと HEV を介してリンパ球の移行が起こることで可能となる⁴⁹。HEV は特殊な構造をもつ血管そのものであり、虚血によって傷害を受ける。CCL21 は HEV の管腔の表面に発現するケモカインレセプターでありリンパ節内で、T 細胞の移行において重要な役割を果たす。移植リンパ節は一時的な血流不全状態となり、HEV が部分的に傷害されることが予想される。そこで、免疫組織化学染色とウエスタンブロッティングで MECA79 を評価し、NPLN, TDTLN, TDPLN の HEV について評価した。また ELISA で CCL21 について評価した。

MECA79 の免疫組織化学染色により、TDTLN および TDPLN の傍皮質領域に HEV が確認された。通常は、腫瘍細胞がリンパ節に到達する前の段階の premetastatic state では HEV はリモデリングを受けてその内腔が拡張するが、興味深いことに、TDTLN の HEV はその内腔が TDPLN と比較すると拡張していなかった(図 20a)。

ウエスタンブロッティングおよび ELISA で HEV の定量化を試みた。NPLN に比べ、TDTLN では HEV の発現は強かった(図 20b)。しかし、CCL21 は逆に発現が弱いという結果であった(図 20c)。TDPLN における HEV は NPL に比べ、premetastatic state という状態を反映し、強く発現しており、また CCL21 もまたより強く発現していた。

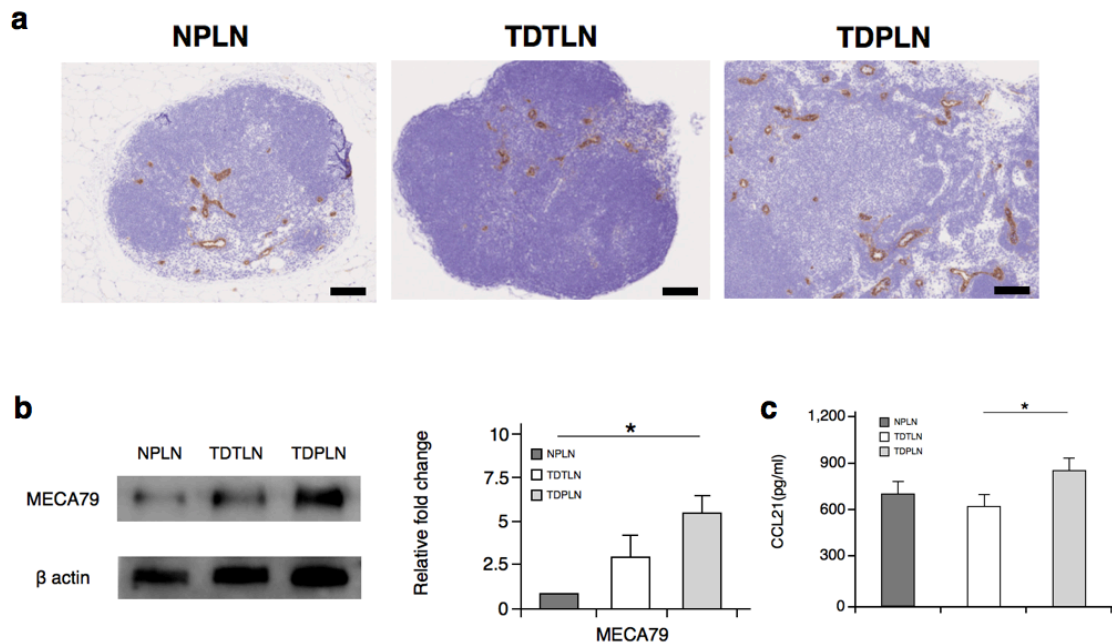


図 20. TDTLN は HEV を有するが、その発現は限定的である。(a)NPLN, TDTLN, TDPLN の MECA79 での免疫組織化学染色。Scale bar 100 μ m。(b)NPLN, TDTLN, TDPLN の MECA79 のウエスタンブロッティング* $P < 0.05$ (two-way analysis of variance with Tukey–Kramer post-hoc test)。TPLN に比べ、TDPLN ではより多くの MECA79 が発現していた。(c)CCL21 の ELISA(各 10 個ずつ) * $P < 0.05$ (two-way analysis of variance with Tukey–Kramer post-hoc test)。TDPLN では TDTLN に比べ CCL21 が多く発現していた。NPLN, naïve popliteal lymph node; TDPLN, tumor-draining popliteal lymph node; TDTLN, tumor-draining transplanted lymph node.

考察

SLN は腫瘍の転移に対して生体を腫瘍から守る重要なリンパ組織であり、抗腫瘍免疫において中心的な役割を果たすと考えられている。SLN は腫瘍抗原を認識した抗原提示細胞がリンパ球を活性化するために抗原提示を行う場所である。T 細胞の活性化は抗原特異的な樹状細胞によるナイーブ T 細胞へのプライミングに依存する⁵⁰。ナイーブ T 細胞の活性化は、一般的にリンパ節や脾臓のような限定された二次リンパ組織内で起こると考えられており⁵¹、それゆえ SLN は腫瘍抗原に出会う免疫系にとってのもっとも最初の場所であると考えられている⁴¹。マウス foot pad の皮下に移植された B16-F10 メラノーマ細胞は、リンパドレナージの経路に位置する膝窩リンパ節、すなわち SLN の腫大を引き起こす⁵²。われわれが本実験において、膝窩リンパ節に着目した点はここにある。

われわれは本実験において、SLN を切除したマウスでは肺転移、リンパ節転移が増悪し、リンパ節を移植することでそれが抑制されることを示した。2 群間での転移量の差の理由の一つは、われわれが第二章で示したリンパドレナージパターンの変化³⁵にあると考えられた。自己の切除された膝窩リンパ節を元に戻したマウスは、膝窩リンパ節を切除したマウスと異なり、通常のリンパドレナージパターンを示した。このリンパドレナージの回復が転移量の抑制につながったと考えられた。しかしながら、通常の腫瘍が流れ込む膝窩リンパ節(tumor draining popliteal lymph node:TDPLN)と腫瘍が流れ込む移植リンパ節(tumor draining transplanted lymph node:TDTLN)とでは転移量の差は有意差を持って異なっていた。そこでわれわれは、免疫系における腫瘍の転移抑制に関して、リンパドレナージは大きな働きを持つものの、それ以外に、リンパ節そのものの機能の差も影響を与えているのではないかという仮説を立て検証した。

腫瘍存在下では、腫瘍が流れ込むリンパ節(Tumor draining lymph node: TDLN)では T 細胞⁵² および B 細胞⁵³ の増加を認める。腫瘍から膝窩リンパ節へのリンパ流を経由してリンパ節へと流れ込む腫瘍や抗原提示細胞由来の溶解性物質によって、腫瘍に対する免疫反応が、惹起されるからである⁵⁴。免疫組織化学染色では、獲得免疫反応後のリンパ節内の細胞の構成は T 細胞、B 細胞、リンパ管内皮のいずれもが TDPLN と同様に TDTLN においても保たれていた。しかし、リンパ節そのもののサイズは TDPLN と TDTLN では異なり、TDTLN は TDPLN に比べて小さかった。この肉眼的結果を反映して、実際のリンパ節内のリンパ球数も TDTLN は TDPLN に比べて少なかった。

リンパ球数の違いが腫瘍抑制効果につながることは予想されるが、実際に働く B 細胞、T 細胞に着目してその機能について詳細に検討した。CD4 陽性 helper T 細胞はリンパ球の増加に必要であり、その他の抗原特異的免疫細胞の活性化を促す。CD4 陽性 type I T helper 細胞は IFN γ 、TNF α などの type I サイトカインを分泌する。そしてこ

これらのサイトカインは、抗原提示細胞の活性化をへて、CD8 陽性 T 細胞の反応を刺激する。また CD4 陽性 type2 T helper 細胞は IL-4, IL-5, IL-13 などの type II サイトカインを分泌し、抗原提示細胞の活性化を制限し、体液性免疫の効果を高める^{42,43}。われわれは FACS 分析により、TDPLN のみならず TDTLN においても、CD4 helper T 細胞と CD8 killer T 細胞を含むリンパ球の割合の変化が認められたことを示した。すなわち、TDTLN においても各種サイトカインが分泌され、それによって helper T 細胞や killer T 細胞が活性化され、抗腫瘍免疫効果をもたらしたと考えられた。

本研究では、type I サイトカインとして、IFN- γ , IL-2 を、type II サイトカインとして IL-4 に着目した。RT-PCR の結果、TDPLN のみならず TDTLN においても IFN- γ および IL-4 の mRNA の遺伝子発現が亢進していた。この結果は、腫瘍存在下において、IFN- γ と IL-4 の分泌が促進された可能性を示す。その一方で、IL-2 の発現は亢進していなかった。IL-2 は免疫応答の初期において非常に重要な働きを担うため、抑制されているとは考えにくく、この結果は、内在性に活性化された T 細胞が IFN- γ もしくは IL-2 の両方ではなく、どちらか一方のみを産生するという、threshold phenomenon によって説明される。この現象は、細胞の増加の際に個々の細胞に影響を与え、初期にはサイトカインの反応をシグナリングするにはどのレベルで T 細胞レセプターが発現させるかを調節するが、また細胞によってどの程度のサイトカインが合成させるかも決定する⁵⁵。そのため本モデルの条件では IFN- γ の発現レベルが高く、一方で IL-2 の発現レベルが低いという結果になったと考えられた。そこで実際に、IL-2 を分泌するリンパ球をこの threshold phenomenon から外れた環境下で、測定したところ、TDTLN での CD4 T リンパ球は確かに IL-2 を分泌していることが ELISpot アッセイによって確認された。以上から、TDTLN においても、CD4 陽性 T 細胞を介した type I, type II サイトカインの分泌が確認されリンパ球は抗腫瘍効果を示した。さらに細胞傷害性アッセイにより、CD8 陽性 T 細胞を介したリンパ球の抗腫瘍効果も示された。以上の実験結果から、TDTLN は TDPLN と同様に腫瘍の存在下で SLN として、腫瘍免疫の最前線として機能していることが示された。

今回、CD4 陽性 T 細胞をさらに別の観点から、すなわち、濾胞性ヘルパー T 細胞の見地からも検証した。濾胞性ヘルパー T 細胞は、B 細胞の活性化に必須の細胞であり、胚中心の形成をコントロールし、体液性免疫の活性化を促す³⁹。IL-21 は濾胞性ヘルパー T 細胞によって活発に分泌されているが、これはマウスでも人間でも同様であると考えられている⁵⁶。IL-21 の分泌と濾胞性ヘルパー T 細胞の増加をまた本実験系において評価したが、IL-21 は TDTLN では NPLN に比べ分泌が亢進していた。一方で、濾胞性ヘルパー T 細胞は TDPLN および TDTLN の両方において同定されなかった。そしてこの結果は腫瘍移植後のリンパ節採取の時期に関係していなかった。リンパ節内でもリンパ濾胞が形成されているが実際のリンパ節内で濾胞性ヘルパー T 細胞が同定され

たなかった理由については今後検証が必要である。

TDTLN は TDPLN と同様に抗腫瘍効果を有する、しかし機能については差があることを述べてきたが、そもそものその違いはどこに由来するのであろうか。この問いに対する回答を示すべく、われわれは、リンパ節内における高内皮静脈(High Endothelial venule: HEV)に着目した。HEV はリンパ節やリンパ組織に発現する特殊な脈管構造である。リンパ組織形成は、ケモカインファミリーのサブセットによって促進されるが、リンパ組織に恒常的に発現するケモカインが特に重要な役割を担う。CCL21 や CCL19 は HEV に発現し、二次リンパ組織のケモカインと言われ、ナイーブ T 細胞の誘導や二次リンパ組織の T 細胞領域への樹状細胞の誘導に必要であると考えられている^{57,58}。特に CCL21 は血流に乗ったナイーブ T 細胞がリンパ節に入る際の分子レベルでのゲートキーパーとして重要であり、HEV の管腔に発現し、HEV を介したリンパ球の移動を調整する⁵⁹。特に動物モデルで、SLN において premetastatic state での HEV のリモデリングがおこると言われている⁶⁰。そして腫瘍のリンパ節転移の前にリンパ節内では HEV の内皮が増加し、このことが HEV のリモデリングと関連している。本研究では、この変化は腫瘍移植後 14 日目での TDPLN で、ウェスタンブロッティングおよび CCL21 の ELISA の結果によって確認された。HEV の内腔は TDPLN では拡張していたものの、TDTLN では拡張していなかった。これはリンパ節移植という一時的な乏血流状態によっておこった変化であると考えられた。そして TDTLN の拡張しなかった HEV が HEV を介したリンパ節内へのリンパ球の移行(リンパ球トラフィッキング)を TDPLN の HEV ほどサポートしなかったものと考えられた。実際に TDTLN は NPLN に比べ、HEV の発現は亢進していたが、CCL21 の発現は少なかった。これは一時的な乏血流状態によってもたらされた結果であると思われた。以上から、TDTLN は TDPLN に比べ、一時的な乏血流状態に陥った結果、HEV の発現が低下しており、リンパ節内へのリンパ球の移行が効率的に進まず、獲得免疫反応において差が生じたと考えられた。

以上から、リンパ節移植という外科的リンパ系再構築法を行うことで、リンパドレナージパターンが正常化し、また移植リンパ節そのものも抗腫瘍効果を有していた、すなわちリンパ節局所免疫能が回復したことが証明された。

総括および結論

【本研究から得られた新知見】

- ・ 頭頂部、後頭部原発皮膚癌のリンパドレナージパターンは後頭リンパ節から Level Vへと流れる傾向を示した。また後耳介リンパ節からは Level II-IVへと流れる傾向を示した。
- ・ 後頭リンパ節などの小さな SLN を同定する際には triple technique に加え、ICG を用いた蛍光リンパ管造影検査が有用であった。
- ・ マウスモデルにおいて膝窩リンパ節切除によりリンパドレナージパターンが変化し、リンパ節移植によりそのパターンが正常化した。
- ・ マウスでは FITC-dextran を用いることで容易に、リアルタイムに近いリンパの情報を得ることが可能であった。
- ・ メラノーマはリンパドレナージパターンにそって遠隔転移した。SLN を切除することで転移の増悪を認めたが、リンパ節移植を行うことで転移増悪は抑制された。
- ・ リンパ節移植という外科的リンパ系再構築法によるリンパ節局所免疫能の回復は、リンパドレナージパターンの正常化および移植リンパ節そのものの機能によってもたらされた。
- ・ マウスメラノーマモデルを用いて、TDPLN におけるリンパ球の増加・割合の変化、Th1,Th2,Tfh に関わるサイトカイン分泌増加の可能性を明らかにした。TDTLN においても同様の所見を確認できた。
- ・ 移植リンパ節(TDTLN)の抗腫瘍効果は TDPLN に比べると差を認めた。この差の原因の一つは、TDTLN の一時的な乏血流状態による HEV のリモデリングの差であり、リンパ球トラフィッキングの機能の差につながったと推察された。

【新知見の意義】

過去の研究においては、外科的リンパ系再構築法は主にリンパ浮腫に有効であるという、主に循環系の視点からの有用性に着目したものばかりであった。リンパ節移植は外科的リンパ系再構築法の一つであるが、リンパ節自体は免疫反応の場であり、局所免疫に強く関わる。本研究により、リンパ節移植という外科的リンパ系再構築法は、免疫系の回復という観点からも有用であることが示された。これによって、近年臨床の場に登場したリンパ節移植という外科的リンパ系再構築法の有用性・可能性が広がったと考える。

【今後の展開】

リンパ浮腫に対する外科的リンパ系再構築法の有用性は近年その報告が増えてはいるものの、エビデンスの確立には至っていない。臨床研究での報告がほとんどであり、リンパ系再構築法の基礎研究は少ない。今回の研究では、non-vascularized lymph node transplantation という観点からの検証であったので、今後は血流を担保した vascularized lymph node transplantation の有用性について検証していきたい。実際の臨床で行われているリンパ節移植は、この vascularized lymph node transplantation である。リンパ節移植自体が比較的新しい方法であるために、本治療を普及させるためにも基礎的研究のデータの蓄積が必要であり、そのデータをさらに分析することで、踏み込んだ臨床研究を行うことも可能となると考えられる。

【今後の課題】

今回用いたマウスモデルは、外科的リンパ系再構築法の解析をより容易に比較検討するために、リンパ節を切除して戻すという、非常に単純なものとした。そして、実際のリンパドレナージパターンの解析を比較するために下肢の領域をリンパ節移植の場所として選んだ。また用いたリンパ節の個数は1個のみとした。

一方で、臨床においては、外科的リンパ系再構築法を施行するにあたり、リンパ節移植として、血管柄付き遊離複合組織移植という形での2次リンパ組織移植術が行われている。この複合組織移植の中には複数個のリンパ節が含まれ、また採取する場所も、移植する場所も様々である。

本研究は、経過を含めて完全に人を模倣したものではない。外科的リンパ系再構築法の研究をさらに進める上で、今後、どのような条件のリンパ組織(リンパ節の個数を含めて)を、どの場所から採取し、そしてどの場所へ移植するのが最も良いのかについて検証する必要がある。また血流の有無によってもたらされる効果についても十分に検証する必要があると考える。

謝辞

本研究の全てに渡ってご指導、ご協力、ご援助をいただいた北海道大学大学院医学研究院機能再生医学講座形成外科学分野・山本有平教授、古川洋志准教授、小山明彦講師・診療准教授、舟山恵美講師、村尾尚規助教、同教室員の皆様、および北海道大学歯学部歯学研究科・林利彦准教授に深く感謝申し上げます。

(順不同)

引用文献

- 1 Morton, D. L., Thompson, J. F., Cochran, A. J., Mozzillo, N., Nieweg, O. E., Roses, D. F., Hoekstra, H. J., Karakousis, C. P., Puleo, C. A., Coventry, B. J., Kashani-Sabet, M., Smithers, B. M., Paul, E., Kraybill, W. G., McKinnon, J. G., Wang, H. J., Elashoff, R., Faries, M. B. & Group, M. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 599-609(2014).
- 2 Landi, G., Polverelli, M., Moscatelli, G., Morelli, R., Landi, C., Fiscelli, O. & Erbazzi, A. Sentinel lymph node biopsy in patients with primary cutaneous melanoma: study of 455 cases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **14**, 35-45(2000).
- 3 Hayashi, T., Furukawa, H., Oyama, A., Funayama, E., Saito, A. & Yamamoto, Y. Dominant lymph drainage in the facial region: evaluation of lymph nodes of facial melanoma patients. *Int J Clin Oncol* **17**, 330-335(2012).
- 4 Pan, W. R., Suami, H. & Taylor, G. I. Lymphatic drainage of the superficial tissues of the head and neck: anatomical study and clinical implications. *Plast. Reconstr. Surg.* **121**, 1614-1624; discussion 1625-1616(2008).
- 5 Suami, H., Taylor, G. I. & Pan, W. R. A new radiographic cadaver injection technique for investigating the lymphatic system. *Plast. Reconstr. Surg.* **115**, 2007-2013(2005).
- 6 Pan, W. R., Le Roux, C. M. & Briggs, C. A. Variations in the lymphatic drainage pattern of the head and neck: further anatomic studies and clinical implications. *Plast. Reconstr. Surg.* **127**, 611-620(2011).
- 7 Plukker, J. T., Vermey, A., Roodenburg, J. L. & Oldhoff, J. Posterolateral neck dissection: technique and results. *Br. J. Surg.* **80**, 1127-1129(1993).
- 8 Diaz, E. M., Jr., Austin, J. R., Burke, L. I. & Goepfert, H. The posterolateral neck dissection. Technique and results. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **122**, 477-480(1996).
- 9 Veenstra, H. J., Klop, W. M., Lohuis, P. J., Nieweg, O. E., van Velthuisen, M. L. & Balm, A. J. Cadaver study on the location of suboccipital lymph nodes: Guidance for suboccipital node dissection. *Head Neck* **36**, 682-686(2014).
- 10 Hayashi, T., Furukawa, H., Oyama, A., Funayama, E., Saito, A., Yamao, T.

- & Yamamoto, Y. Sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green in cutaneous head and neck/lip mucosa melanomas. *Head Neck* **34**, 758-761(2011)..
- 11 Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., Eggermont, A. M., Flaherty, K. T., Gimotty, P. A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. C., Jr., Morton, D. L., Ross, M. I., Sober, A. J. & Sondak, V. K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6199-6206(2009).
 - 12 Tammela, T. & Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140**, 460-476(2010).
 - 13 Oashi, K., Furukawa, H., Nishihara, H., Ozaki, M., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Kuge, Y. & Yamamoto, Y. Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 537-544(2013).
 - 14 Ito, R. & Suami, H. Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plast. Reconstr. Surg.* **134**, 548-556(2014).
 - 15 Chang, D. W. Lymphaticovenular bypass for lymphedema management in breast cancer patients: a prospective study. *Plast. Reconstr. Surg.* **126**, 752-758(2010).
 - 16 Campisi, C., Bellini, C., Campisi, C., Accogli, S., Bonioli, E. & Boccardo, F. Microsurgery for lymphedema: clinical research and long-term results. *Microsurgery* **30**, 256-260(2010).
 - 17 Becker, C., Assouad, J., Riquet, M. & Hidden, G. Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann. Surg.* **243**, 313-315(2006).
 - 18 Cheng, M. H., Chen, S. C., Henry, S. L., Tan, B. K., Lin, M. C. & Huang, J. J. Vascularized groin lymph node flap transfer for postmastectomy upper limb lymphedema: flap anatomy, recipient sites, and outcomes. *Plast. Reconstr. Surg.* **131**, 1286-1298(2013).
 - 19 Tobbia, D., Semple, J., Baker, A., Dumont, D. & Johnston, M. Experimental assessment of autologous lymph node transplantation as treatment of postsurgical lymphedema. *Plast. Reconstr. Surg.* **124**, 777-786(2009).
 - 20 Aschen, S. Z., Farias-Eisner, G., Cuzzzone, D. A., Albano, N. J., Ghanta, S., Weitman, E. S., Ortega, S. & Mehrara, B. J. Lymph node transplantation

- results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plast. Reconstr. Surg.* **133**, 301-310(2014).
- 21 Cochran, A. J., Huang, R. R., Lee, J., Itakura, E., Leong, S. P. & Essner, R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol* **6**, 659-670(2006).
 - 22 Kwon, S., Agollah, G. D., Wu, G. & Sevic-Muraca, E. M. Spatio-temporal changes of lymphatic contractility and drainage patterns following lymphadenectomy in mice. *PLoS one* **9**, e106034(2014).
 - 23 Tammela, T., Saaristo, A., Holopainen, T., Lyytikka, J., Kotronen, A., Pitkonen, M., Abo-Ramadan, U., Yla-Herttuala, S., Petrova, T. V. & Alitalo, K. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat. Med.* **13**, 1458-1466(2007).
 - 24 Blum, K. S., Proulx, S. T., Luciani, P., Leroux, J. C. & Detmar, M. Dynamics of lymphatic regeneration and flow patterns after lymph node dissection. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 81-86(2013).
 - 25 Mendez, U., Brown, E. M., Ongstad, E. L., Slis, J. R. & Goldman, J. Functional recovery of fluid drainage precedes lymphangiogenesis in acute murine foreleg lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H2250-2256(2012).
 - 26 Saaristo, A. M., Niemi, T. S., Viitanen, T. P., Tervala, T. V., Hartiala, P. & Suominen, E. A. Microvascular breast reconstruction and lymph node transfer for postmastectomy lymphedema patients. *Ann. Surg.* **255**, 468-473(2012).
 - 27 Granzow, J. W., Soderberg, J. M., Kaji, A. H. & Dauphine, C. Review of current surgical treatments for lymphedema. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 1195-1201(2014).
 - 28 Shioya, R., Furukawa, H., Murao, N., Hayashi, T., Oyama, A., Funayama, E., Yamamoto, Y. & Saito, N. Prevention of Lymphedematous Change in the Mouse Hindlimb by Nonvascularized Lymph Node Transplantation. *Ann. Plast. Surg.* **76**, 442-445(2016).
 - 29 Joseph, W. J., Aschen, S., Ghanta, S., Cuzzone, D., Albano, N., Gardenier, J., Savetsky, I., Torrisi, J. & Mehrara, B. J. Sterile inflammation after lymph node transfer improves lymphatic function and regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* **134**, 60-68(2014).

- 30 Boardman, K. C. & Swartz, M. A. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. *Circ. Res.* **92**, 801-808(2003).
- 31 Rutkowski, J. M., Boardman, K. C. & Swartz, M. A. Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1402-1410(2006).
- 32 Randolph, G. J., Angeli, V. & Swartz, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* **5**, 617-628(2005).
- 33 Alitalo, K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat. Med.* **17**, 1371-1380(2011).
- 34 Kimura, T., Sugaya, M., Oka, T., Blauvelt, A., Okochi, H. & Sato, S. Lymphatic dysfunction attenuates tumor immunity through impaired antigen presentation. *Oncotarget* **6**, 18081-18093(2015).
- 35 Maeda, T., Yamamoto, Y., Iwasaki, D., Hayashi, T., Funayama, E., Oyama, A., Murao, N. & Furukawa, H. Lymphatic Reconnection and Restoration of Lymphatic Flow by Nonvascularized Lymph Node Transplantation: Real-Time Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran. *Lymphat Res Biol*(2017).
- 36 Giavazzi, R. & Decio, A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma. *Methods Mol. Biol.* **1070**, 131-140(2014).
- 37 Christensen, J., Vonwil, D. & Shastri, V. P. Non-Invasive In Vivo Imaging and Quantification of Tumor Growth and Metastasis in Rats Using Cells Expressing Far-Red Fluorescence Protein. *PloS one* **10**, e0132725(2015).
- 38 El Hajj, P., Journe, F., Wiedig, M., Laios, I., Sales, F., Galibert, M. D., Van Kempen, L. C., Spatz, A., Badran, B., Larsimont, D., Awada, A. & Ghanem, G. Tyrosinase-related protein 1 mRNA expression in lymph node metastases predicts overall survival in high-risk melanoma patients. *Br. J. Cancer* **108**, 1641-1647(2013).
- 39 Qi, H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* **16**, 612-625(2016).
- 40 Jonsson, C. A. & Carlsten, H. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibition in vitro suppresses lymphocyte proliferation and the production of immunoglobulins, autoantibodies and cytokines in splenocytes from MRLlpr/lpr mice. *Clin. Exp. Immunol.* **124**, 486-491(2001).

- 41 Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. & Arihiro, K. Immunobiology of the sentinel lymph node and its potential role for antitumour immunity. *Lancet Oncol* **7**, 1006-1016(2006).
- 42 Sasada, T. & Suekane, S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance. *Immunotherapy* **3**, 1235-1251(2011).
- 43 Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **16**, 433-448(2016).
- 44 Leong, S. P., Peng, M., Zhou, Y. M., Vaquerano, J. E. & Chang, J. W. Cytokine profiles of sentinel lymph nodes draining the primary melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* **9**, 82-87(2002).
- 45 Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., Wang, Y. H., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q. & Dong, C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* **29**, 138-149(2008).
- 46 Linterman, M. A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R. R., Srivastava, M., Hogan, J. J., Verma, N. K., Smyth, M. J., Rigby, R. J. & Vinuesa, C. G. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* **207**, 353-363(2010).
- 47 Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 337-365(1994).
- 48 Viola, A. & Lanzavecchia, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* **273**, 104-106(1996).
- 49 von Andrian, U. H. & Mackay, C. R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1020-1034(2000).
- 50 Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 47-64(2001).
- 51 Itano, A. A. & Jenkins, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* **4**, 733-739(2003).
- 52 Harrell, M. I., Iritani, B. M. & Ruddell, A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am. J. Pathol.* **170**, 774-786(2007).
- 53 Ganti, S. N., Albershardt, T. C., Iritani, B. M. & Ruddell, A. Regulatory B cells preferentially accumulate in tumor-draining lymph nodes and

- promote tumor growth. *Sci Rep* **5**, 12255(2015).
- 54 Swartz, M. A. Immunomodulatory roles of lymphatic vessels in cancer progression. *Cancer Immunol Res* **2**, 701-707(2014).
- 55 Itoh, Y. & Germain, R. N. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 757-766(1997).
- 56 Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621-663(2011).
- 57 Loetscher, P., Moser, B. & Baggiolini, M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv. Immunol.* **74**, 127-180(2000).
- 58 Takada, K. & Jameson, S. C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* **9**, 823-832(2009).
- 59 Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D. & Williams, L. T. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 258-263(1998).
- 60 Qian, C. N., Berghuis, B., Tsarfaty, G., Bruch, M., Kort, E. J., Ditlev, J., Tsarfaty, I., Hudson, E., Jackson, D. G., Petillo, D., Chen, J., Resau, J. H. & Teh, B. T. Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 10365-10376(2006).