



Title	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の形態および機能に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	石川, 耕資
Description	配架番号 : 2437
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13423号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74233
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kosuke_Ishikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 石 川 耕 資

学 位 論 文 題 名

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の形態および機能に関する研究
(Studies on morphology and function of transferred lymph nodes
in a mouse model of vascularized lymph node transfer)

【背景と目的】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。ナイーブリンパ球は静脈から HEV の細胞間隙を通過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。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。そこで、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。

【材料と方法】第一章において、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 週目に後肢足蹠にインドシアニンググリーン (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。

第二章において、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 μm^2 以上の総 HEV, そのうち内腔 80 μm^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 検定を用いて、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】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。第一章において、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。

第二章において、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。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、リンパ節における総 HEV 数/ mm^2 および拡張 HEV 数/ mm^2 は、Group 1 が対側の単径リンパ節よりも有意に多く、リンパ節における拡張 HEV 数/総 HEV 数は、Group 1 が Group 2 および Group 3 よりも有意に多かった。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。

【考察】第一章において、マウス血管柄付きリンパ節移植モデルを作製するための詳細な解剖、その術式について検討した。単径リンパ節が 3~4 個あるラットと比べ、マウスの単径リンパ節は 1 つであり、膝窩リンパ節摘出部に移植すると 1:1 での単純な比較が可能である。本モデルは、有茎のため血管吻合が不要であり、手技に依存しにくい簡便なモデルである。移植した単径リンパ節が輸入リンパ管再疎通により、膝窩リンパ節に近い大きさ、リンパ球の構成にリモデリングが起きた可能性が考えられた。皮質における明瞭な濾胞構造は、輸入リンパ管からリンパ節内へ到達した抗原や抗原提示細胞に対する B 細胞応答が起きている可能性を示唆する所見と考えられた。マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける機能的リンパ系再構築には、移植リンパ節がレシピエントのリンパ管と再疎通することも重要な要素であると考えられた。

第二章において、血流のあるリンパ節移植の方が、血流のないリンパ節移植に比べ、より多くの機能的な拡張 HEV を保持することを示した。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も有用である可能性が示唆された。しかし、リンパ節における B 細胞, T 細胞, 樹状細胞は、多群間の比較で有意差は認めなかった。移植リンパ節の免疫細胞を評価するためには、抗原の注射や腫瘍細胞の移植などによる免疫感作が必要であると考えられた。

【結論】第一章において、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た。

第二章において、血流のあるリンパ節移植の方が、血流のないリンパ節移植に比べ、移植リンパ節内の機能的な拡張 HEV の割合が高いことを示した。