



Title	マウス血管柄付リンパ節移植モデルにおける悪性黒色腫の動態と制御に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	草島, 英梨香
Description	配架番号 : 2666
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14945号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85752
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KUSAJIMA_Erika_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 草 島 英 梨 香

学 位 論 文 題 名

マウス血管柄付リンパ節移植モデルにおける悪性黒色腫の動態と制御に関する研究
(Studies on the dynamics and regulation of malignant melanoma using a mouse model
of vascularized lymph node transfer)

【背景と目的】

術後リンパ浮腫に代表されるリンパ系機能不全は、生体における癌制御機構への悪影響が懸念される。近年、重症リンパ浮腫に対する新たな手術治療として、健常部位からリンパ節組織群を移植する血管柄付リンパ節移植 (vascularized lymph node transfer; VLNT) の臨床的有用性が報告されている。VLNT は移植リンパ節を足場に局所のリンパ系ネットワークの再構築を促すことが知られ、リンパ浮腫の改善のみならず免疫能を改善させる効果も注目されているが、癌動態への影響を検討した報告は限られる。

そこで本研究では、マウスモデルを用いて VLNT が癌動態に及ぼす影響と移植リンパ節における腫瘍免疫能を評価することを目的とした。第一章では、リンパ節郭清 (lymph node dissection; LND) 群で増悪する癌の増殖・転移を VLNT によって抑制しうるかを検証した。特に VLNT 後の輸入リンパ管の再疎通の有無に着目し、腫瘍制御能に差が出るかを評価した。第二章では、マウス VLNT モデルから派生させた血管柄が無いリンパ節移植 (nonVLNT) モデルを作製し、移植リンパ節の血管柄の存在が腫瘍制御能に影響するかを評価した。

【材料と方法】

全ての実験で 8 週齢雄の C57BL/6N マウスを用いた。第一章において VLNT モデルは過去報告に準じ、左鼠径リンパ節を血管柄付で挙上し、左膝窩リンパ節摘出部に移行する手技によって作製した。また膝窩に皮膚切開のみを加えたコントロール群と、膝窩リンパ節郭清を施行した LND 群を作製した。全群で術後 3 週目にインドシアニンググリーン蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流評価を行い、VLNT 群は移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通の有無で VLNT(lr+; with lymphatic reconnection)群と VLNT(lr-; without lymphatic reconnection)群に最終群分けした。まずパイロット実験では、術後 3 週目以降 12 週目までの後肢リンパ流評価を行った。続いて本実験として、術後 4 週目に左足底にマウス悪性黒色腫細胞 B16F10-luc2 を 4×10^5 個移植し、経時的な腫瘍体積の測定と、ルシフェラーゼアッセイ法による肺およびリンパ節転移の定量評価を行った。また腫瘍移植後、転移成立前の移植リンパ節を摘出し、Hematoxylin and eosin 染色と免疫組織化学染色によるリンパ節の観察と免疫細胞の分布・割合の評価を行った。

第二章において、VLNT モデルの派生として移植リンパ節への血管柄を切離した nonVLNT モデルを作製した。術後 3 週目に後肢リンパ流を評価し、移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通の有無で nonVLNT(lr+)群と nonVLNT(lr-)群に最終群分けした。第一章と同様に術後 4 週目に左足底にマウス悪性黒色腫細胞を移植し、肺・リンパ節転移の定量評価と、転移成立前の移植リンパ節の組織学的評価を行い、第一章で得られた結果と比較した。

腫瘍細胞は指数関数的な増殖を示すため、転移巣の定量評価において各値に自然対数変換処理をした後に統計解析を行った。原発巣体積、肺転移巣の定量評価、リンパ節における免疫細胞の評価には Dunnett's 検定を用いた。リンパ節転移巣の定量評価には Steel-Dwass 検定を用いた。両側 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】

第一章において、パイロット実験では VLNT 群のうち 62.5% に移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通を認めた。また術後 3 週目に確認された輸入リンパ管再疎通の有無やリンパ流うっ滞の所見は術後 8 週目にも持続していることを確認した。術後 12 週ではリンパ流の傾向に個体差が大きかった。本実験において、コントロール群、VLNT(lr+)群、VLNT(lr-)群では LND 群と比較し腫瘍体積が小さい傾向にあったが、有意差はなかった。転移巣評価では、腫瘍移植後 4 週目で LND 群で肺転移、遠隔リンパ節転移を多く認めたが、VLNT(lr+)群ではコントロール群と同様に肺転移、遠隔リンパ節転移を有意に抑制した。一方で VLNT(lr-)群では明らかな転移抑制はみられなかった。また VLNT(lr+)群の移植リンパ節にはコントロール群の膝窩リンパ節と同程度の転移を認めたのに対し、VLNT(lr-)群では移植リンパ節への転移を認めず、上位リンパ節や通常転移しない腋窩リンパ節への転移を多く認めた。腫瘍移植後 5 週目では結果に明らかな有意差はなかった。腫瘍移植後 4 日目の移植リンパ節の免疫細胞評価では、VLNT(lr+)群で腫瘍移植によって樹状細胞の割合が有意に増加していた一方で、VLNT(lr-)群では増加していなかった。一方で T 細胞および B 細胞の割合は全群で腫瘍移植によって増加している傾向がみられたが、有意差はなかった。

第二章において、術後 3 週目の後肢リンパ流評価では 57.7% に移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通を認めた。nonVLNT(lr+)群では肺転移を抑制する傾向にあったが有意差を認めず、VLNT(lr+)群と比較すると転移量は多い傾向にあった。リンパ節転移の評価では、nonVLNT(lr+)群と nonVLNT(lr-)群ともに移植リンパ節とその上位リンパ節への転移を認めた。移植リンパ節の組織学的評価では、リンパ節に壊死などの所見を認めなかったが、第一章の結果と異なり輸入リンパ管再疎通のある群でも免疫細胞の増加を認めなかった。

【考察】

第一章において、VLNT 後の輸入リンパ管再疎通の有無で肺や腋窩リンパ節などの遠隔転移の抑制効果に差が出た。また輸入リンパ管再疎通の起こらなかった群では局所リンパ系が正常に再構築されず、通常と異なるリンパ流路で転移が起きたと考えられた。VLNT によってリンパ系ネットワークが再構築されることで、局所における免疫細胞の輸送や活性化が可能となり、移植リンパ節において樹状細胞を介した腫瘍免疫応答が起こったものと考えられた。

第二章において、血管柄が無いリンパ節移植でもリンパ節は生着し、局所リンパ系を再構築できた。しかし輸入リンパ管再疎通があった nonVLNT(lr+)群で転移を抑制する傾向がみられたものの、その抑制効果は VLNT(lr+)群よりも乏しかった。移植リンパ節の一時的な乏血により免疫細胞の輸送が滞り、腫瘍免疫能が低下したことが推察された。

【結論】

VLNT によって移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通が起こることで、局所のリンパ系が再構築され、癌の遠隔転移が抑制された。移植リンパ節における腫瘍免疫能の発揮には輸入リンパ管の再疎通と血管柄の存在が重要と考えられた。