



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14945">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14945</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85887">https://hdl.handle.net/2115/85887</a>
Type	doctoral thesis
File Information	KUSAJIMA_Erika.pdf



# 学 位 論 文

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)

2 0 2 2 年 3 月

北 海 道 大 学

草 島 英 梨 香

Erika KUSAJIMA

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第一章 リンパ節移植による局所リンパ系再構築と腫瘍制御能の検証	
緒言	9 頁
方法	10 頁
結果	20 頁
考察	35 頁
第二章 移植リンパ節の血管柄の有無と腫瘍制御能の検証	
緒言	40 頁
方法	42 頁
結果	43 頁
考察	50 頁
総括および結論	52 頁
謝辞	54 頁
利益相反	55 頁
引用文献	56 頁

## 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投稿中である。

1. Erika Guilpain Kusajima, Taku Maeda, Kosuke Ishikawa, Takahiro Miura, Masayuki Osawa, Yuhei Yamamoto, Ryo Takagi, Emi Funayama  
Restoration of normal anatomy with vascularized lymph node transfer limits distant metastases  
*Journal of Surgical Research* (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Erika Kusajima, Kosuke Ishikawa, Taku Maeda, Yuhei Yamamoto  
Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in mice model  
International Society of Lymphology (ISL) 27th World Congress 2019、2019年9月25日・Buenos Aires
2. 草島英梨香、前田 拓、石川耕資、舟山恵美、林 利彦、大澤昌之、村尾尚規、山本有平  
血管柄付リンパ節移植はがん転移を抑制するか-マウスモデルを用いた検証  
第44回日本リンパ学会総会、2020年9月12日・さいたま
3. 草島英梨香、前田 拓、石川耕資、舟山恵美、林 利彦、大澤昌之、村尾尚規、山本有平  
血管柄付リンパ節移植ががん転移に及ぼす影響の検証-マウスモデルを用いて  
第29回日本形成外科学会基礎学術集会、2020年10月8日・横浜

## 要旨

### 【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  $4 \times 10^5$  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(1r+)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(1r+)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。

## 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。

DBF	dermal backflow
HE	hematoxylin and eosin
HEV	high endothelial venules
ICG	indocyanine green
LND	lymph node dissection
PBS	phosphate-buffered saline
PDE	photodynamic eye
RLU	relative light unit
TBS	tris-buffered saline
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLNT	vascularized lymph node transfer
VLNT(lr+)	vascularized lymph node transfer with lymphatic reconnection
VLNT(lr-)	vascularized lymph node transfer without lymphatic reconnection

## 緒言

### 1. 背景

#### 【リンパ系と二次性リンパ系機能不全】

リンパ系は全身に張り巡らされたリンパ管やリンパ節によって構成され、末梢組織から組織液や高分子物質を回収しリンパとして血管系へ輸送し循環させる役割を有する。このネットワーク機構は同時に抗原や免疫細胞を免疫組織へ輸送する役割も担い、リンパ系と血管系の2つの脈管系により統合された免疫機構を構築している(Alitalo et al., 2005; Tammela et al., 2007)。

癌の予後を決める重要な因子は転移であるが、なかでも悪性黒色腫や乳がんでは比較的早期からリンパ管やリンパ節に浸潤し転移することが知られる。悪性黒色腫などの上皮性癌では80%がリンパ系を介して転移すると推定されており、このためリンパ行性転移は根治的治療の標的と考えられている(Leong et al., 2011; Chandrasekaran and King, 2014)。しかし一方で所属リンパ節郭清や術後放射線照射などの治療介入は局所リンパ系のネットワークを損傷し破綻させるリスクを有する。乳がんなどの進行期癌の約24-56%では治療によって二次性リンパ浮腫などのリンパ系機能不全を引き起こすことが報告されている(Kim et al., 2013; Rockson, 2018)。この傾向は本邦を含む先進国で特に顕著で、患者数は年々増加している(Azhar et al., 2020; Murdaca et al., 2012)。

リンパ系機能不全はリンパの間質への貯留によるリンパ浮腫に留まらず、線維化などの皮膚軟部組織変化や慢性炎症・代謝障害を引き起こし、全身的な免疫抑制を誘発する可能性が知られる。その結果新たな癌の発生母地となったり、繰り返す感染症や慢性皮膚疾患の礎となることが報告されている(Saito et al., 2013; Schiffman and Berger, 2007; Oliveira Gda et al., 2012; Ruocco et al., 2002)。また動物実験においてもリンパ系機能不全の状態が腫瘍細胞の増殖能、遊走能を上昇させることが報告されている(Rofstad et al., 2002; Zhu et al., 2013; Oashi et al., 2013; Kimura et al., 2015)。つまり癌治療の合併症としてリンパ系機能不全が起こることで、本来生体が担う癌の制御機構に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。

#### 【血管柄付リンパ節移植】

近年、破綻した局所リンパ系の解剖学的再構築、あるいは機能的回復を目指した治療法が検討されている(Baumeister et al., 1981; Tammela et al., 2007)。なかでも重症リンパ浮腫に対する新たな手術治療として、リンパ節群を血管柄付で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(Akita et al., 2015)。これは腋窩などの所属リンパ節郭清により局所リンパ系が破綻した部位に、他の健常部位から1個～数個のリンパ節群を血管柄付で移植し、顕微鏡下に血管吻合する術式である(図1: Hassani et al., 2020)。VLNTは移植リンパ節群が周囲組織からのリンパ管の再生を促すことで、損傷されたリンパ系構造を再構築させる役割が期待されている。また同時に、移植されたリンパ節内の微小血管構造である高内皮細静脈(high endothelial venules; HEV)がリンパ静脈シャントとして働くことで、正常な体循環系にリンパを灌流させると考えられている(Ito and Suami, 2014; Cheng et al., 2013)。

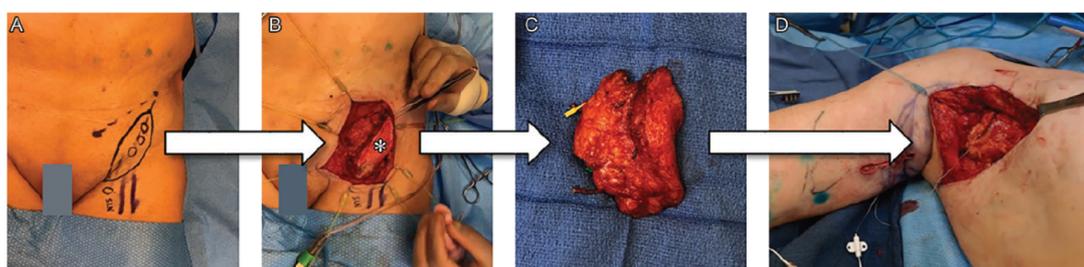


図1. VLNT 施行の例(術中写真) 左鼠径から血管柄付リンパ節群を一塊に採取し、右腋窩に移植する。右上肢リンパ浮腫の改善を目的としている。(Hassani et al., 2020)より引用

乳癌術後の上肢二次性リンパ浮腫に対しVLNTを施行した症例の検討で、92%の症例で長期的に浮腫の改善が認められるなど、その高い有効性が報告されている(Becker et al., 2006)。またリンパ浮腫患者で頻発する蜂窩織炎の発症率がVLNT後に低下したという報告(Nguyen et al., 2017)もあり免疫系への関与も考慮されてはいるが、治療報告は一部の施設に限られ、実験的エビデンスの裏付けは限定的である。

## 2. 目的

本研究では、リンパ系破綻に伴う癌の増殖能・転移能の増大をVLNTによって抑制することが可能かどうか検証することを目的とした。特に、リンパ系ネットワークを構成しリンパ節の機能に影響を及ぼすと予想される輸入リンパ管の再疎通と移植リンパ節の血管柄の存在について着目した。研究内容を二章に分けて、第一章ではVLNTを施行後に移植リンパ節へ輸入リンパ管の再疎通が起こるかどうかで癌動態への影響が異なるか検証した。第二章では移植リンパ節の血管柄の存在が腫瘍制御能にどう影響するか検証した。

癌種の中でも悪性黒色腫は高率にリンパ行性に転移し、根治的治療として原発巣切除、所属リンパ節郭清をしても皮内や皮下のリンパ管に腫瘍細胞が残存し、後の浸潤転移につながる恐れがある(図 2: Biswas et al., 2017) (図 3 : Tammela et al., 2011)。癌治療の合併症として起こる二次性リンパ浮腫の治療法の一つである VLNT だが、悪性黒色腫のリンパ行性転移や遠隔転移に対する影響を検証することは腫瘍外科学の観点から重要であると考えた。

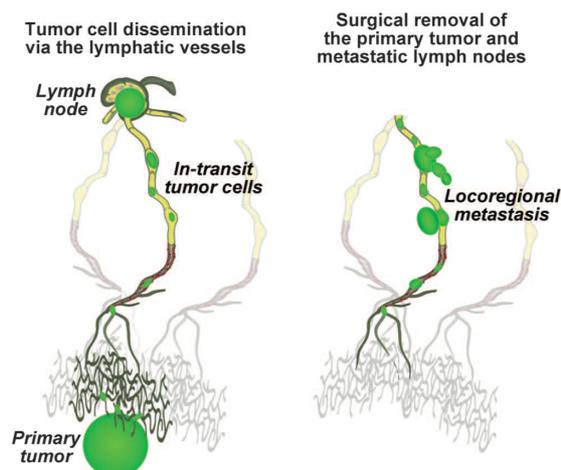


図 2. 腫瘍によるリンパ行性転移の模式図 リンパ管内に残存した腫瘍細胞は再発の要因となる。(Biswas et al., 2017)より引用改変。



図 3. 悪性黒色腫は原発巣から所属リンパ節までの皮膚・皮下に特徴的なリンパ行性転移 (In-transit metastasis) をする。(Tammela et al., 2011)より引用。

## 第一章

# リンパ節移植による局所リンパ系再構築と腫瘍制御能の検証

## 緒言

### 1. 背景

VLNT は局所のリンパ系ネットワークを物理的に再構築することで循環を促す効果が期待されている(Ito and Suami, 2014)。ただし手術侵襲や術後の癒痕形成等の影響により、移植リンパ節と周囲リンパ管の再疎通は“Spontaneous lymphatic reconnection”と形容されるように確率的に高くはない(Aschen et al., 2014)。リンパ節とリンパ管の再疎通率が高い程リンパの回収がより促されることが予想されることから、再疎通率を改善させるために Vascular endothelial growth factor (VEGF) -C や VEGF-D の遺伝子導入などの試みが近年検証されている(Lahteenvuoto et al., 2011; Tammela et al., 2007)。また、輸入リンパ管からのリンパ流はリンパ節の形態や免疫細胞の恒常性維持に重要とも報告されている(Randolph et al., 2005)。

本研究では、2019年に当教室が開発したマウス VLNT モデルを用いる。本モデルは VLNT の術後 3 週で輸入リンパ管の再疎通の有無が明らかとなり、その再疎通率は 64.0%と報告されている(Ishikawa et al., 2019a)。本モデルを用いることで、リンパ節への輸入リンパ管の再疎通の有無で群分けを行い、VLNT による癌制御効果と移植リンパ節の腫瘍免疫能を検証できると考えた。

### 2. 目的

マウスモデルを用いて、VLNT が癌動態に及ぼす影響を検証した。特に、輸入リンパ管の再疎通の有無によって、影響に差が出るかを検証した。

既報に準じてモデル作製手技を行うが、術後 4 週目より後の後肢リンパ流は既報で評価されていないため、まずパイロット実験でインドシアニンググリーン (indocyanine green; ICG) 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の時間経過に伴う変化を観察し、本実験における癌動態評価のための適切な時期を検討した。本実験では悪性黒色腫を移植した後の原発巣・転移巣の定量的評価を行うとともに、転移成立前の移植リンパ節における免疫細胞の変化から腫瘍免疫能を評価した。

## 方法

### 1. 動物実験計画

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 18 年環境省告示第 88 号）、その他関係法令等に基づき、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」（平成 19 年 4 月 1 日海大達第 61 号）、「国立大学法人北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規程」（平成 17 年 3 月 28 日海大達第 40 号）に従って、動物実験計画「外科的リンパ系再構築法によるネットワーク回復を循環系・免疫系の観点から検証する」（承認番号 20-0030）の一研究として行った。

### 2. 動物実験施設

本研究は、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて行った。マウスの飼育は、小動物飼育室（3 階小動物飼育実験エリア）にて 12 時間間隔の人工蛍光管理、標準飲食管理下に行った。動物実験は、共同生体試料解析室 2（3 階解析実験エリア）にて行った。

### 3. 使用動物・機器・試薬

6 週齢の C57BL/6N マウス（ブリーダー：Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan；販売：Sankyo Labo Service Corporation, Inc., Sapporo, Japan）の雄を購入した。馴化のため入舎後 2 週間の予備飼育期間を設け、8 週齢で実験に用いた。

全ての処置・手術は、実験動物麻酔装置（Laboratory Animal Anesthesia System; Shinano Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan; code SN-487）を用いて全身麻酔下に行った。麻酔の導入および維持にはイソフルラン（Forane<sup>®</sup> Inhalant Liquid; AbbVie Inc., Tokyo, Japan; code B506）2.5-3.0%吸入を用いた。手術は手術用顕微鏡（S100/OPMI<sup>®</sup> pico; Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen, Germany）を用いて、4 倍または 10 倍の視野にて手術用器具を用いて行った。

## 4. パイロット実験

### モデル作製手技

膝窩リンパ節に手術操作を加えないコントロール群、鼠径リンパ節を血管柄付で膝窩に移植する VLNT 群、膝窩リンパ節を郭清する LND (lymph node dissection: リンパ節郭清) 群の 3 群を作製した。実際の作製手技の詳細は以下の通りである。

術前処置としてサージカルクリッパー (3M Surgical Clipper; 3M Health Care, Borken, Germany; code 9667L and 9660) および除毛フォーム (Ask Hair Remove; Manet Co., Tokyo, Japan) を用いてマウス下半身を除毛した。リンパ節およびリンパ管を可視化するため、執刀直前にマウスの左足底に 2%パテントブルー (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 溶液 5 $\mu$ l を皮下注射した。

コントロール群は、マウスを腹臥位として左膝窩部に 5mm 長の皮膚切開を加え、膝窩周囲を皮下剥離した後皮膚縫合した。他群と条件を統一するために左鼠径部に 10mm 程度の皮膚切開を加え、上外側に皮下直下で剥離し、鼠径脂肪組織内に染色された左鼠径リンパ節を同定し摘出した。

VLNT 群は、過去に当教室が報告した方法に準じた(Ishikawa et al., 2019a)。本術式ではリンパ節群を血管柄をつけたまま挙上し移行することができ、血管吻合の必要なく VLNT モデルを作製することができる。すなわちマウスを腹臥位としてコントロール群と同様に左膝窩を皮膚切開し、大腿二頭筋と内側ハムストリングスの間にパテントブルーで染色された膝窩リンパ節を同定し摘出した。続いてマウスを仰臥位とし、コントロール群と同様に左鼠径を皮膚切開・皮下剥離し鼠径リンパ節を同定した。鼠径リンパ節の頭側縁で腸腰動脈を切断し、大腿動脈から鼠径脂肪組織内を上行する浅腹壁動脈を血管柄とする鼠径リンパ節脂肪弁を挙上した。左鼠径から左膝窩に至る大腿内側を皮下剥離して皮下トンネルを作製し、鼠径リンパ節脂肪弁を膝窩に移行した。マウスを仰臥位に戻し、鼠径リンパ節を膝窩のリンパ節摘出部に嵌め込み、鼠径リンパ節周囲の脂肪弁を 10-0 ナイロン糸 (Keisei Medical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan; code 14V33-10N) 3 針で大腿二頭筋に縫合した (次頁図 4)。

LND 群は、同様の手技で左膝窩リンパ節を同定しこれと周囲の脂肪組織を郭清した。左鼠径リンパ節も摘出した。

全ての皮膚縫合は 5-0 ナイロン糸 (Crownjun Nylon Suture, Polyamide Monofilament Non-absorbable; Kono Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan; code NA085) を用いた。

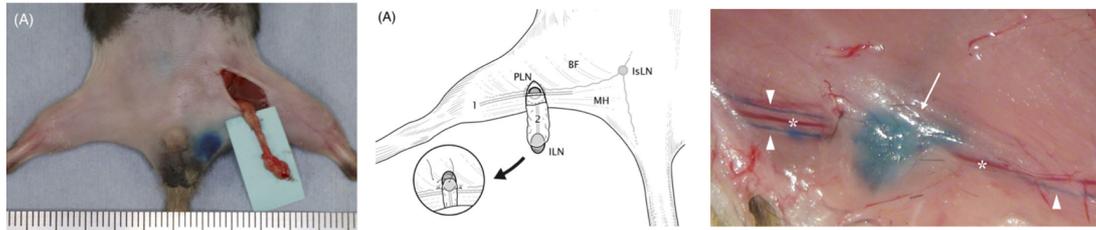


図 4. VLNT モデルの作製 (Ishikawa et al., 2019a)より引用改変

左図:仰臥位で鼠径リンパ節脂肪弁を挙上した 中図:腹臥位で膝窩リンパ節摘出部に鼠径リンパ節脂肪弁を移行する模式図 右図:摘出直前の膝窩リンパ節リンパ管(矢印頭)と膝窩リンパ節(矢印)はパテントブルーの染色性により青く視認される。

### ICG 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の評価

モデル作製手術後 3、8、12 週目に ICG 蛍光リンパ管造影によりマウス後肢のリンパ流を評価した。検査前に前述の方法でマウス下半身を除毛した。マウス後肢の両側足底に近赤外蛍光物質である ICG (Diagnogreen® for Injection 25 mg; Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan; 2.5 mg/mL in phosphate-buffered saline) を 5 $\mu$ L 皮下注射した。10~15 分程放置した後、赤外観察カメラシステム (Photodynamic Eye; PDE; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Shizuoka, Japan; code C9830) を用いて、後肢全体の蛍光画像を取得した。PDE は赤外発光ダイオードから発する 760 nm の近赤外光によって、血管・リンパ管内で主にリポタンパクと結合した ICG を励起し、発せられた 820 nm 以上の近赤外蛍光をハンディタイプのカメラユニットにより検出することで、モニタ上で ICG をリアルタイムに可視化する医療用機器である (Ishikawa et al., 2013; Marshall et al., 2010)。PDE はアシストアームシステム (ASSISTO® Holders and Clamp Sockets; GEOMED® Medizin-Technik GmbH & Co., Tuttlingen, Germany; code CI 120-40 and CI 310-50, respectively) によって、マウスの 15~25 cm 上方に固定して用いた。取得した蛍光画像において、左膝窩の明瞭な点状蛍光像の有無やリンパうっ滞の所見である皮膚リンパ流逆流 (dermal backflow; DBF) パターンの有無、リンパ側副路の有無を評価した。

VLNT による移植リンパ節に輸入リンパ管の再疎通が起こると、術側膝窩に明瞭な点状蛍光像が認められることが既報で報告されている (Ishikawa et al., 2019a)。VLNT 群のうちこの点状蛍光像があるものを輸入リンパ管の再疎通がある VLNT(lr+) (VLNT with lymphatic reconnection) 群とし、点状蛍光像がないものを輸入リンパ管の再疎通がない VLNT(lr-) (VLNT without lymphatic reconnection) 群とした。

## 5. 本実験

### 5.1 概要

本実験の概要図を図5に示す。手術介入した各群の後肢リンパ流を術後3週で評価し、VLNT群において移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通の有無で最終的にVLNT(lr+)群とVLNT(lr-)群に分け、術後4週で左足底に悪性黒色腫細胞を移植した。腫瘍移植後の経時的な腫瘍体積の変化と肺・リンパ節における転移量を評価した。また腫瘍移植後、転移成立前の移植リンパ節における免疫細胞の分布・割合を組織学的に評価した。

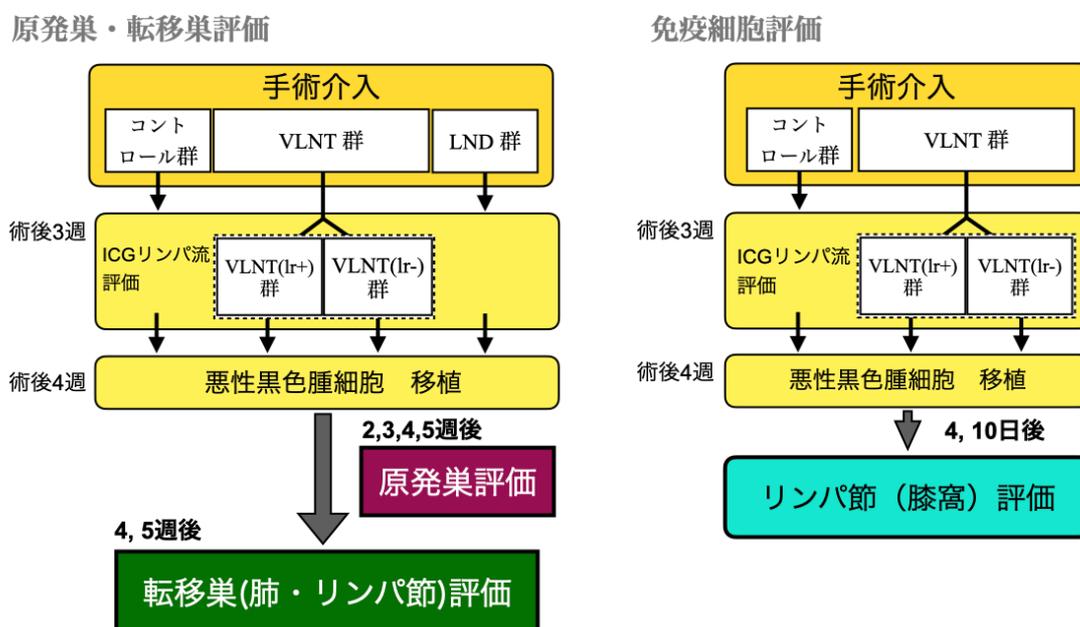


図5. 本実験の概要図

### 5.2 モデル作製手技

パイロット実験と同様の手技で、左鼠径リンパ節を摘出し左膝窩に皮膚切開のみ加えたコントロール群、左鼠径リンパ節を血管柄付で左膝窩リンパ節摘出部に移植するVLNT群、左鼠径リンパ節を摘出し左膝窩リンパ節群を郭清するLND群の3群を作製した。

### 5.3 ICG 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流評価と最終群分け

パイロット実験と同様の手技で、ICGとPDEを用いて術後3週目にマウス後肢全体の蛍光画像を取得した。最終的な群分けとして、VLNT群のうち左膝窩に点状蛍光像が観察された個体をVLNT(lr+)群とし、観察されなかった個体をVLNT(lr-)群とした。

#### 5.4 ルシフェラーゼ安定発現マウス悪性黒色腫細胞の維持と調整

C57/BL6N マウスに同系で移植できるマウス悪性黒色腫細胞 B16F10 株のうち、転移巣の定量評価のため、ルシフェラーゼを安定的に発現する B16F10-luc2 悪性黒色腫細胞 (B16F10 luc2 Mouse Melanoma Cells; Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, U.S.) を使用した。B16F10-luc2 細胞は、レンチウイルスベクターによって蛍光遺伝子である firefly luciferase 遺伝子 (luc2) を B16F10 細胞に遺伝子導入することで作製される。腫瘍細胞はインキュベーター内で 5% fetal bovine serum、1% Penicillin-Streptomycin solution を添加した RPMI-1640 培地 (RPMI-1640 Medium with L-glutamine and sodium bicarbonate, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。100mm dish で培養し、サブコンフルエントに増殖した癌細胞を Trypsin-EDTA solution (0.25%, phenol red; Gibco, Eggenstein, Germany) を用いて剥離した後、培地を加え細胞液を 1500rpm、5 分間遠心した。遠心後、細胞を氷冷 phosphate-buffered saline (PBS, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>不含) に再浮遊した。Trypan Blue Solution (0.4%; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.) を用いて細胞数と細胞生存能力 (cell viability) を算定し、細胞密度が 8×10<sup>6</sup> 個/ml、細胞生存能力が 95%以上である細胞浮遊液を調製した。マウスの左足底に 4×10<sup>5</sup> 個 (0.05ml) の腫瘍細胞を 27G 針付ツベルクリンシリンジを用いて皮下注射し移植した。腫瘍移植の時期は、各群において術後 4 週目とした。

#### 5.5 原発巣の腫瘍体積評価

腫瘍移植後 2 週目、3 週目、4 週目、5 週目に、左足底の腫瘍体積を計測した (図 6)。腫瘍体積は縦×横×高さ×1/2 の計算式で概算した(Oashi et al., 2013)。

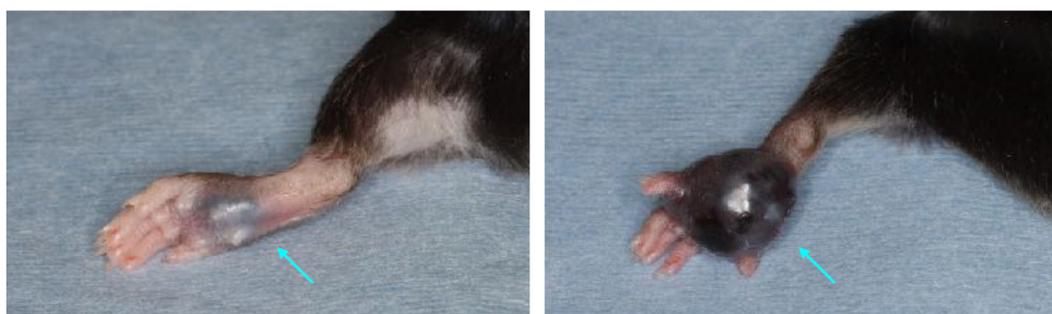


図 6. 腫瘍移植後 2 週目(左)と 4 週目(右)の原発巣(矢印)

## 5.6 肺転移巣評価

B16F10 は肺転移の好発株であることから、肺の腫瘍細胞の定量評価を行い癌遠隔転移の指標とした。各群のマウスを、腫瘍移植後 4 週、5 週の時点で安楽死させ、開胸し両肺を摘出した。直ちに氷温の PBS で洗浄し、付着血液を除去した肺を液体窒素で瞬間凍結してから  $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザーで保存した。以下のルシフェラーゼアッセイ法により肺の腫瘍細胞量を定量評価した。

凍結肺は、細胞破碎装置 Micro Smash MS-100 (TOMY) を使用して破碎した後、Cell Culture Lysis 5X Reagent (Luciferase Assay System; Promega, Wisconsin, U.S.) を  $800\mu\text{l}$  添加し 10 秒間ボルテックス処理した後静置し溶解した。細胞溶解液を  $13,000\text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 3 分間遠心して上清を採取した。上清に Luciferin (Luciferase Assay Reagent; Promega, Wisconsin, U.S.) を  $100\mu\text{l}$  添加して直ちに生じる生物発光強度 (relative light unit; RLU) をルミノメーター GloMax® 20/20 Luminometer (Promega, Wisconsin, U.S.) によって検出し定量化した。既報において luciferase の濃度と RLU との間に直線的な相関関係があることが確認されている(Oashi et al., 2013)。過去の実験において腫瘍を移植していないマウスの肺の RLU 値は平均  $512.5$  ( $n=3$ , 範囲  $383-682$ ) であったことから、Cut-off 値  $700$  以上を肺転移陽性と定義した。

## 5.7 リンパ節転移巣評価

解剖学的にマウスの足底からのリンパ流は通常膝窩リンパ節に流入し、次いで坐骨リンパ節、腰部リンパ節へと流れる。またこれとは異なり、腹部・外陰部などの体幹からのリンパ流は鼠径リンパ節に流入し、次いで腋窩リンパ節へと流れる(Kawashima et al., 1964)。つまり通常足底に癌細胞を移植した場合、同部から直接リンパが流入するリンパ節、すなわちセンチネルリンパ節は同側の膝窩リンパ節となる。膝窩リンパ節の上位リンパ節として腰部リンパ節を、また通常マウス後肢からのリンパ流を受けない遠隔リンパ節として腋窩リンパ節を転移巣評価に用いることとした(次頁図 7)。

各群のマウスを腫瘍移植後 4 週、5 週の時点で安楽死させ剖検し、左膝窩領域リンパ節(コントロール群では膝窩リンパ節、VLNT 手術群では移植リンパ節)、左腰部リンパ節、左腋窩リンパ節を摘出した。直ちに氷温の PBS で洗浄し、液体窒素で瞬間凍結してから  $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザーで保存した。肺と同様の手技でリンパ節を破碎し、Cell Culture Lysis 5X Reagent (Luciferase Assay System; Promega, Wisconsin, U.S.) を  $100\mu\text{l}$  添加し溶解・遠心して上清を採取した。上清に Luciferin (Luciferase Assay Reagent; Promega, Wisconsin, U.S.) を  $20\mu\text{l}$  添加して直ぐの RLU を検出した。過去の実験において腫瘍を移植していない

マウスのリンパ節の RLU 値は平均 103.5 (n=3, 範囲 82-121)であったことから、Cut-off 値 130 以上をリンパ節転移陽性と定義した。

- ① PLN, popliteal lymph node
- ② LLN, lumbar lymph node
- ③ ALN, axillary lymph node

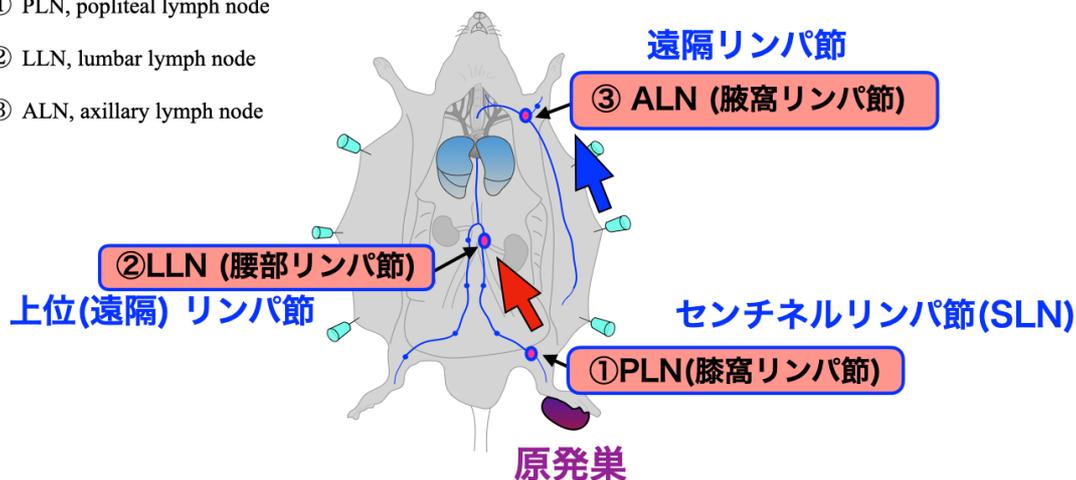


図 7. マウスの解剖学的リンパ流の模式図 足底からのリンパは通常膝窩に流入する。その上位に腰部リンパ節が位置し、腋窩リンパ節には通常足底からのリンパは流入しない。

## 5.8 リンパ節における組織学的検討

### 検体採取

腫瘍移植後 4 日目、10 日目のマウスを安楽死させ、コントロール群では左膝窩リンパ節を、VLNT(lr+)群および VLNT(lr-)群では左膝窩の移植リンパ節を摘出した。また腫瘍移植後 4 日目に安楽死させた各群のマウスで右膝窩リンパ節を摘出した。腫瘍を移植していないマウスの naïve リンパ節の評価のため、生理食塩水を左足底に注射し 4 日経過したマウスの左膝窩リンパ節を摘出した。摘出したリンパ節はそれぞれ 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., code 163-20145) に浸漬して固定した。

### パラフィン包埋・薄切

リンパ節を固定後 48 時間以内に、自動包埋装置 (Excelsior™ ES, Thermo Fisher Scientific) を用いてパラフィン包埋組織標本を作製した。アルコール (80% 30 分、95% 45 分、100% 60 分・60 分・75 分・90 分・120 分) で脱水、キシレン (60 分・90 分・90 分) で透徹、パラフィン (60 分・90 分・90 分) で包埋した。

滑走式マイクロトーム (Retorotome; Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Asaka, Saitama, Japan; code REM-710) を用いてパラフィン包埋組織標本を切片厚 4

μm に薄切し、以下の手順で Hematoxylin and eosin (HE) 染色および免疫組織化学染色を行った。

## HE 染色

キシレン I・II (2 層各 5 分)、エタノール (100%, 95%, 80%, 70% 各 3 分) で脱パラフィン後、流水水洗した。ティシュー・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd.; code 8653) に 7 分浸し、流水水洗 (色だし) を 10 分行った。1%塩酸 70%エタノールで分別を 30 秒行い、流水水洗後、1%エオシン Y 液 (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan; code 3200-2) に 2 分浸した。1~2 秒水洗後、エタノール (70% 20 秒) で分別、エタノール (100% 1 分、100% 3 分、100% 3 分) で脱水、キシレン I・II・III (3 層各 5 分) で透徹した。標本用封入剤 NEW M・X (Matsunami Glass Industry, Ltd., Kishiwada, Osaka, Japan; code FX00500) を用いて封入した。

## 免疫組織化学染色 (CD11c)

タンパク分解酵素プロテイナーゼ K 溶液 (Proteinase K, Dako, code S3004) に常温で 5 分浸した。水洗し、0.3%過酸化水素水に 10 分浸した。トリス塩酸緩衝液 (tris-buffered saline; TBS) で 2 回洗浄後、一次抗体 hamster monoclonal CD11c antibody (clone N418, GeneTex, code GTX74940, dilution 1:300) に 4°C で一晩浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 biotinylated goat anti-hamster IgG secondary antibody (Vector Laboratories, code BA-9100, dilution 1:200) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、検出試薬 VECTASTAIN® Elite® ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、チラミドシグナル増幅キット TSA® Plus Biotin Kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA; code NEL749A001) に常温で 5 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、再度検出試薬 VECTASTAIN® Elite® ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後、ティシュー・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653) に 1.5 分浸し、流水水洗 (色だし) を 10 分行った。1%塩酸 70%エタノールで分別を 30 秒行い、流水水洗後、エタノール (70% 20 秒) で分別、エタノール (100% 1 分、100% 3 分、100% 3 分) で脱水、キシレン I・II・III (3 層各 5 分) で透徹した。標本用封入剤 NEW M・X (Matsunami Glass Industry, Ltd.; code FX00500) を用いて封入した。

### 免疫組織化学染色(CD3)

抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., code 415211, dilution 1:10) を用いて 95°C 温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し、0.3% 過酸化水素水に 10 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、一次抗体 rabbit monoclonal CD3 gamma antibody (clone EPR4517; GeneTex, Irvine, CA; code GTX62682, dilution 1:1500) に常温で 60 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with HRP (Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (R), Nichirei Biosciences Inc., code 414341F) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後、ティシュー・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653) に 1.5 分浸し、流水水洗 (色だし) を 10 分行った。CD11c に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

### 免疫組織化学染色 (B220)

抗原賦活化液 pH6 クエン酸緩衝液 (Dako REAL™ Target Retrieval Solution, Dako, code S2031, dilution 1:10) を用いて 95°C 温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し、0.3% 過酸化水素水に 10 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、一次抗体 purified rat monoclonal CD45R/B220 antibody (clone RA3-6B2; Abgent, San Diego, CA, USA; code WTA1265, dilution 1:3000) に常温で 60 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary antibody (Vector Laboratories, code BA-4000, dilution 1:200) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、検出試薬 VECTASTAIN® Elite® ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後、ティシュー・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653) に 1.5 分浸し、流水水洗 (色だし) を 10 分行った。CD11c に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

### 免疫細胞の定量評価

組織スライドは、バーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer S210, Hamamats Photonics K.K., code C13239-01) を用いてスキャンした。デジタルデータは、パーソナルコンピュータ (MacBook Pro, Retina, 13-inch, Early 2015, version 10.12.6; Apple Inc., Cupertino, CA, USA) を用いて、ユーティリティアプリ

リケーション (Display Menu, version 2.2.3, Thorsten Karrer) によりディスプレイ解像度を 1280×800 ドットから 2560×1600 ドットの間で調整し、画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology (NDP) .view2 (Hamamatsu Photonics K.K., code U12388-01) 上で観察した。リンパ節全体が画角に収まる 50 倍拡大で JPEG 画像として出力した。過去の報告(Ishikawa et al., 2019b)を参考に、それぞれの免疫組織化学染色で染色された樹状細胞 (CD11c)、T 細胞 (CD3)、B 細胞 (B220) のリンパ節に占める面積の割合を画像解析ソフトウェア ImageJ (version 1.52; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて以下の方法で計測した。JPEG 画像でリンパ節の外周を“Freehand selections”で囲み、“Region of interest manager”に登録した。“Split Channels”コマンドにより、赤、緑、青の独立した画像に分割した。このうち最もコントラストのよい青画像を用いて、“Threshold”コマンドにより、CD11c は最小値 0、最大値 130、CD3 および B220 は最小値 0、最大値 140、の閾値設定で色を二値化した。Region of interest における“Analyze Particles”コマンドにより、Size 4-Infinity、Circularity 0.00-1.00 の設定で、%Area を計測した (図 8)。

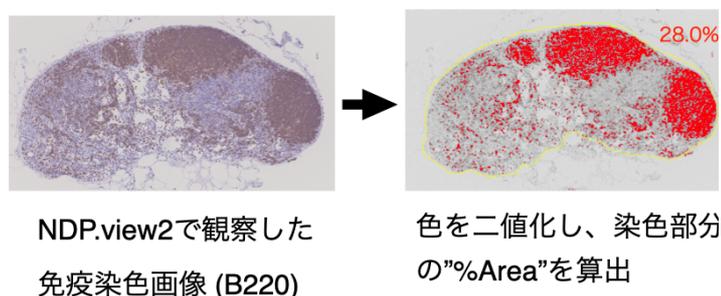


図 8. デジタルデータと ImageJ を用いた免疫細胞の定量評価の例

## 5.9 統計学的検討

統計解析には統計ソフトウェア JMP (version 14.1.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。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解析処理を行った。原発巣体積の評価、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 値<0.05 を統計学的有意水準とした。

## 結果

### 1. パイロット実験：後肢リンパ流の中長期的評価

パイロット実験には15体のマウスを使用した。観察期間中、手術手技や処置に伴う明らかな合併症はなかった。

コントロール群 (n=3) では術後3週、8週、12週のいずれの時点でも膝窩に明瞭な点状蛍光像を示し、異常リンパ管新生やDBFパターンを認めなかった。鼠径リンパ節の摘出は後肢リンパ流には影響しないことを確認した。

VLNT群 (n=8) のうち術後3週で5体 (62.5%) に術側膝窩に明瞭な点状蛍光像を認め、これらを移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通があるVLNT(lr+)群とした。これ以外の3体を移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通がないVLNT(lr-)群とした。既報ではマウスVLNTモデルにおける輸入リンパ管再疎通率は64%と報告されており、今回の結果とおおむね合致する割合で、モデル作製において技術的な問題はないと判断できた(Ishikawa et al., 2019a)。VLNT(lr+)群では膝窩の明瞭な点状蛍光像は術後12週でも確認された(図9)。術後いずれの時点でもDBFを認めなかったが、1例で術後8週で異常リンパ管新生を認め、この所見は術後12週でも同様にみられた。VLNT(lr-)群では術後3週で2例にDBFを認め、術後8週でもこの所見を認めたが、術後12週では1例にのみ認めた。異常リンパ管新生は術後8週以降2例で認めた。

LND群 (n=4) では術後3週と8週で全例にDBFを認めたが、術後12週ではうち2例でDBFパターンは改善していた。異常リンパ管新生は術後3週で2例に認め、術後8週、12週で全例に認めた(次頁図10)。

VLNT(lr+)群

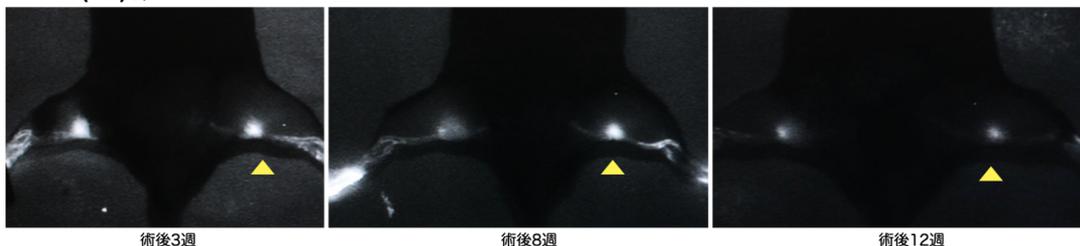
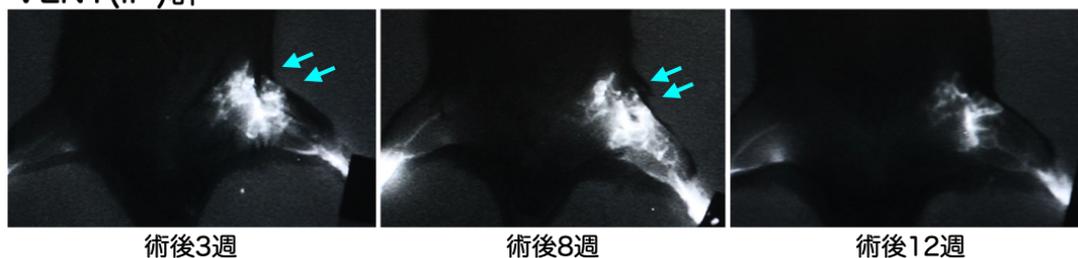


図9. VLNT(lr+)群のICG蛍光リンパ管造影 術側の膝窩に明瞭な点状蛍光像(矢印頭)を認め、DBFや異常リンパ管新生を認めない。

### VLNT(Ir-)群



### LND群

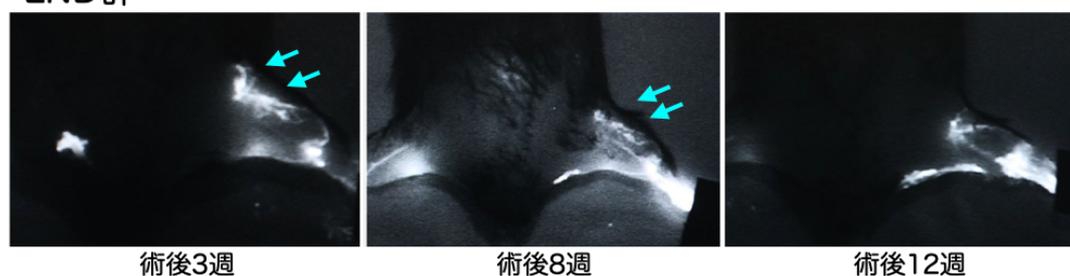


図 10. VLNT(Ir-)群および LND 群の ICG 蛍光リンパ管造影 術後 3 週、8 週で DBF と異常リンパ管新生(矢印)を認める。術後 12 週では DBF は概ね改善している。

つまり、術後 3 週目に観察された輸入リンパ管の再疎通の有無や DBF の所見は術後 8 週時点でも同様に観察されることが明らかとなった。一方で術後 12 週では DBF や異常リンパ管新生の傾向に個体差が大きかった。これらの結果より、以降の本実験においては輸入リンパ管再疎通の有無を術後 3 週目で評価し、術後 8 週目前後で癌動態を評価する計画とした。

## 2. 本実験：後肢リンパ流評価による最終群分け

本実験において、術後3週目の後肢リンパ流評価では、コントロール群ではパイロット実験と同様に全例で膝窩に明瞭な点状蛍光像を示した。VLNT手術群 60体のうち、術側膝窩に明瞭な点状蛍光像を示した36体(60.0%)をVLNT(lr+)群に分類し、それ以外の24体(40.0%)をVLNT(lr-)群に分類した。VLNT(lr+)群の3体で術側後肢に異常リンパ管新生を認めた。VLNT(lr-)群、LND群ではパイロット実験と同様に、DBFや異常リンパ管新生などの所見を認めた。

## 3. 原発巣評価

腫瘍移植後の原発巣体積の値(各群 n=5-8)を図11に示す。腫瘍移植後4週時点で、原発巣体積の平均値±標準誤差はコントロール群 405±135.3、VLNT(lr+)群 547±154.2、VLNT(lr-)群 574±85.5、LND群 1,658±409.0だった。LND群で最も体積が大きくコントロール群、VLNT(lr+)群、VLNT(lr-)群では体積が小さい傾向にあった(有意差なし)。腫瘍移植後5週時点で、原発巣体積の平均値±標準誤差はコントロール群 899±750.3、VLNT(lr+)群 2,098±1300.4、VLNT(lr-)群 1,030±1057.7、LND群 3,733±3375.8だった。一部の個体で腫瘍が自壊し形態が保たれていないものもみられた。

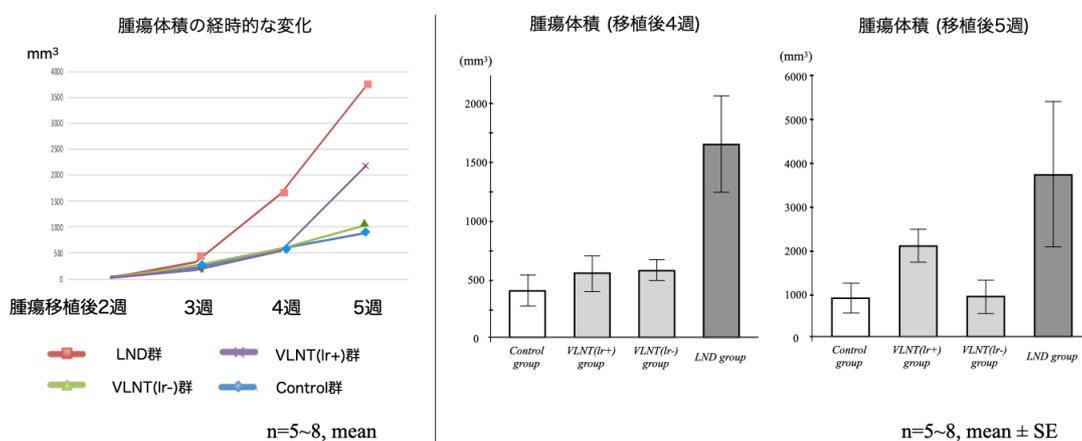


図 11. 腫瘍移植後の原発巣体積 左: 腫瘍体積の経時的な変化(平均値) 右: 腫瘍移植後 4 週、5 週の腫瘍体積(平均値±標準誤差)

#### 4. 肺転移巣評価

##### 腫瘍移植後 4 週

ルシフェラーゼアッセイ法による肺の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値はコントロール群 1,607、VLNT(lr+)群 1,463、VLNT(lr-)群 1,328,595、LND 群 2,255,699 だった。各群の自然対数変換後の RLU 値と実数値を図 12 に示す。肺転移量は LND 群で高く、コントロール群、VLNT(lr+)群では有意に低かった (いずれも  $p < 0.05$ )。一方で VLNT(lr-)群は LND 群より転移量が低い傾向にあるものの、統計学的有意差を認めなかった。肺転移陽性率は、コントロール群 12.5%、VLNT(lr+)群 22.2%、VLNT(lr-)群 42.9%、LND 群 50.0% だった。

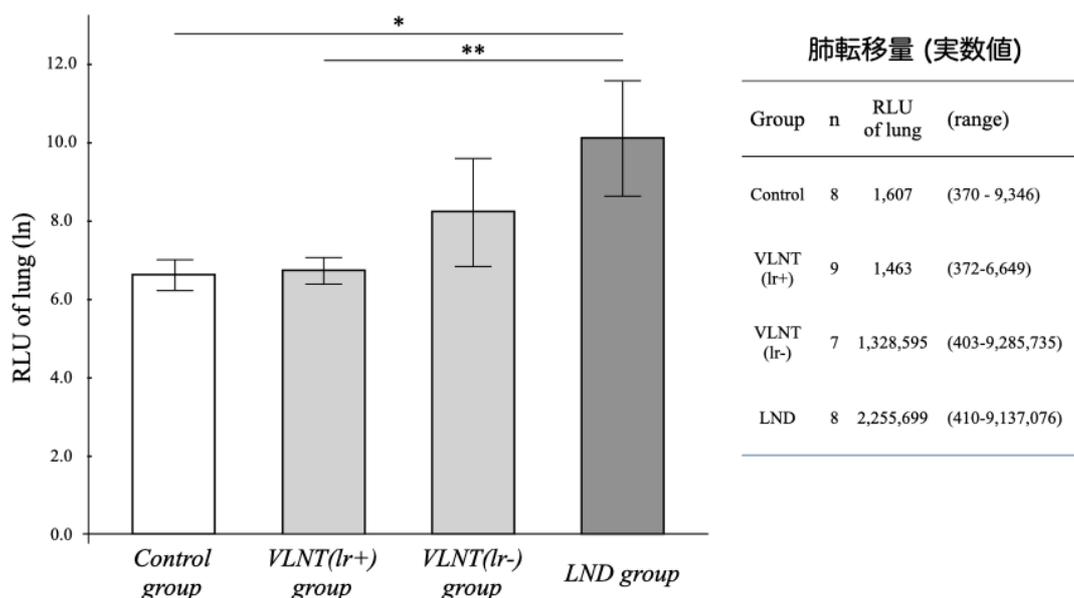


図 12. 腫瘍移植後 4 週目の肺転移量 グラフは自然対数変換後の RLU 値を示し、表は RLU 実数値を示す。\*, \*\*;  $p < 0.05$ . (Dunnett's test)

## 腫瘍移植後 5 週

ルシフェラーゼアッセイ法による肺の腫瘍細胞量（RLU 実数値）の平均値はコントロール群 147,215、VLNT(lr+)群 281,619、VLNT(lr-)群 1,349,758、LND 群 1,502,657 だった。各群の自然対数変換後の RLU 値と実数値を図 13 に示す。いずれの群間にも統計学的有意差は認めなかった。肺転移陽性率は、コントロール群 66.7%、VLNT(lr+)群 72.7%、VLNT(lr-)群 85.7%、LND 群 88.9% だった。

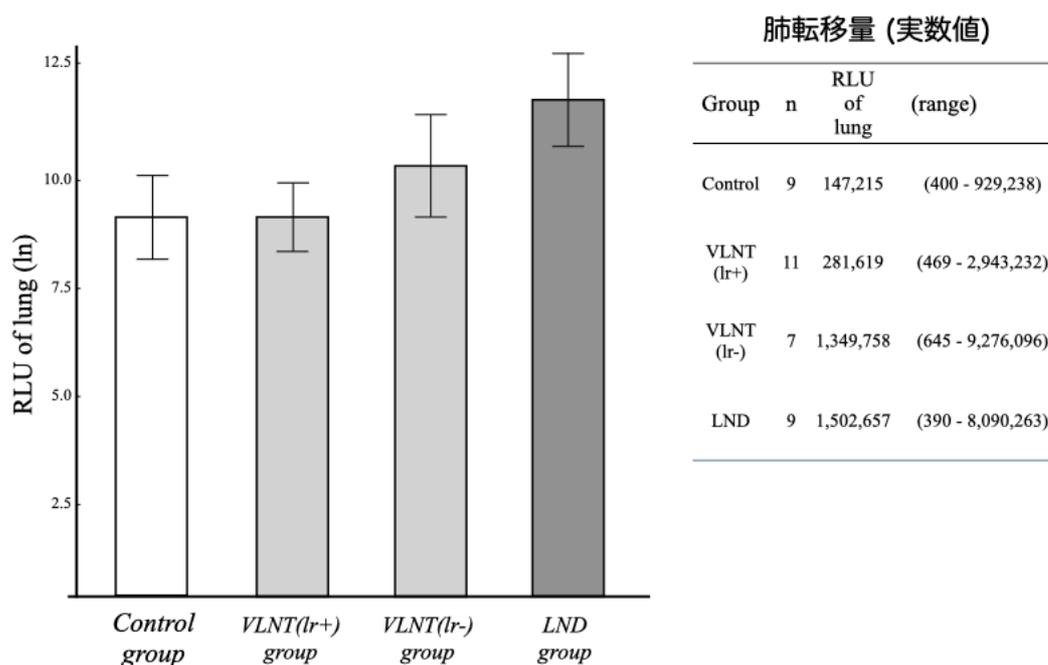


図 13. 腫瘍移植後 5 週目の肺転移量 グラフは自然対数変換後の RLU 値を示し、表は RLU 実数値を示す。

## 5. リンパ節転移巣評価

### 腫瘍移植後 4 週

膝窩領域リンパ節は手術時にこれを摘出した LND 群を除く 3 群で評価した。膝窩領域リンパ節の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値 (範囲) はコントロール群 665.4 (72-3,480)、VLNT(lr+)群 389.6 (78-1,723)、VLNT(lr-) 群 101.4 (94-115) だった。転移陽性率はコントロール群 37.5%、VLNT(lr+)群 33.3%、VLNT(lr-)群 0.0%だった。コントロール群、VLNT(lr+)群では群の 3 割程度に転移を認めるのに対し、VLNT(lr-)群では転移を認めなかった。

腰部リンパ節・腋窩リンパ節は全 4 群で評価した。腰部リンパ節の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値 (範囲) はコントロール群 138.8 (80-342)、VLNT(lr+)群 200.2 (74-1,017)、VLNT(lr-)群 1,338.1 (100-5,483)、LND 群 418.5 (66-987) だった。転移陽性率はコントロール群 12.5%、VLNT(lr+)群 11.1%、VLNT(lr-)群 42.9%、LND 群 37.5%だった。膝窩リンパ節の上位リンパ節である腰部リンパ節への転移はコントロール群、VLNT(lr+)群で少なく、VLNT(lr-)群、LND 群で多い傾向にあった。

腋窩リンパ節の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値 (範囲) はコントロール群 96.1 (86-109)、VLNT(lr+)群 177.8 (81-839)、VLNT(lr-)群 614,916.0 (103-4,300,478)、LND 群 786,742.1 (98-6,164,230) だった。転移陽性率はコントロール群 0.0%、VLNT(lr+)11.1 群%、VLNT(lr-)群 42.9%、LND 群 50.0%だった。遠隔リンパ節である腋窩リンパ節への転移はコントロール群、VLNT(lr+)群で少ない傾向があった一方で、VLNT(lr-)群、LND 群では有意に転移量が多かった。

各リンパ節の自然対数変換後の RLU 値を次頁図 14 に示す。

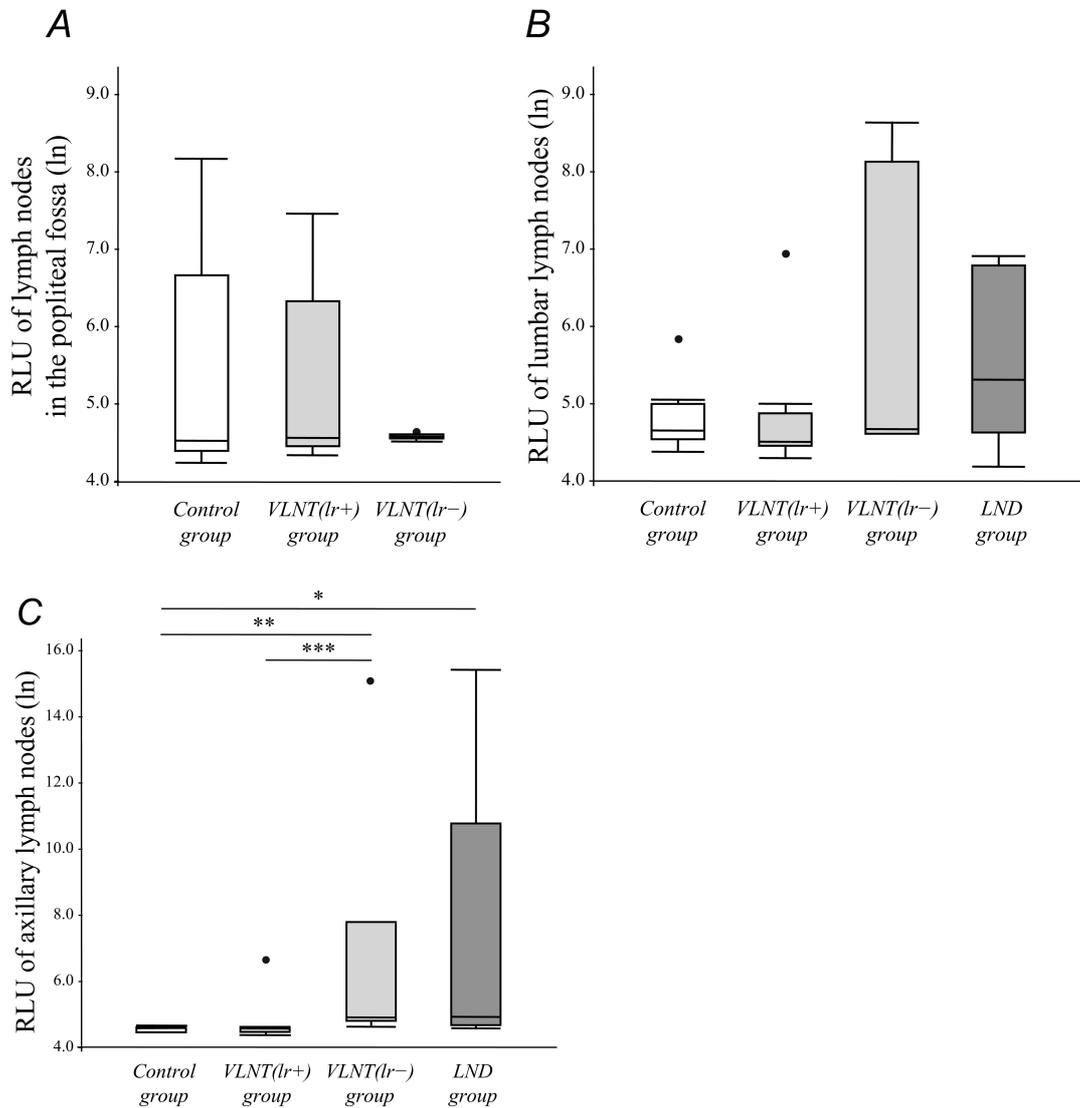


図 14. 腫瘍移植後 4 週目のリンパ節の転移量 A. 膝窩領域リンパ節 B. 腰部リンパ節 C. 腋窩リンパ節。\*, \*\*, \*\*\*;  $p < 0.05$ . (Steel-Dwass test)

### 腫瘍移植後 5 週

膝窩領域リンパ節の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値 (範囲) はコントロール群 1,444,560.9 (157-9,815,299)、VLNT(lr+)群 335,897.1 (87-3,327,540)、VLNT(lr-)群 4,811,541.7 (91-33,678,124) だった。転移陽性率はコントロール群 77.8%、VLNT(lr+)群 63.6%、VLNT(lr-)群 28.6%だった。腫瘍移植後 4 週目と比較し、VLNT(lr-)群を含む全群で転移量が増えていた。

腰部リンパ節の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値 (範囲) はコントロール群 340,871.4 (74-2,129,065)、VLNT(lr+)群 411,458.4 (98-2,304,241)、

VLNT(lr-)群 793.3 (105-2,398)、LND群 183,571.2 (76-1,577,432) だった。転移陽性率はコントロール群 44.4%、VLNT(lr+)群 54.5%、VLNT(lr-)群 57.1%、LND群 55.6%だった。

腋窩リンパ節の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値 (範囲) はコントロール群 4,499.6 (73-39,451)、VLNT(lr+)群 217.2 (69-980)、VLNT(lr-)群 589,532.4 (98-4,122,030)、LND群 146,354 (78-1,305,847) だった。転移陽性率はコントロール群 22.2%、VLNT(lr+)群 18.2%、VLNT(lr-)群 42.9%、LND群 55.6%だった。各リンパ節の自然対数変換後の RLU 値を図 15 に示す。

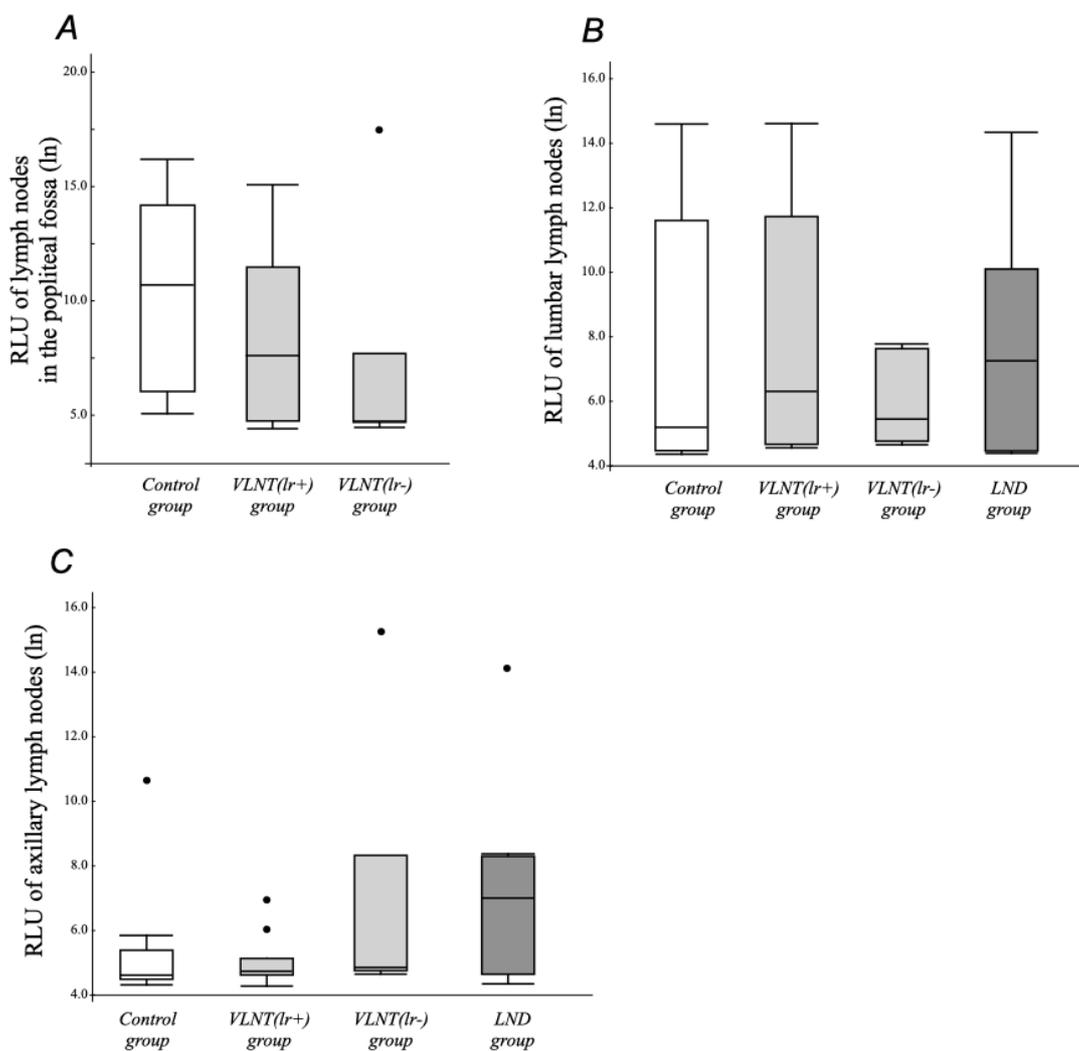


図 15. 腫瘍移植後 5 週目のリンパ節 A. 膝窩領域リンパ節 B. 腰部リンパ節 C. 腋窩リンパ節

## 6. 代表写真

腫瘍移植後4週目に転移巣評価をした VLNT(Ir-)群のうち、1例の ICG リンパ流評価写真、剖検時写真、転移巣模式図を代表例として図16に示す。

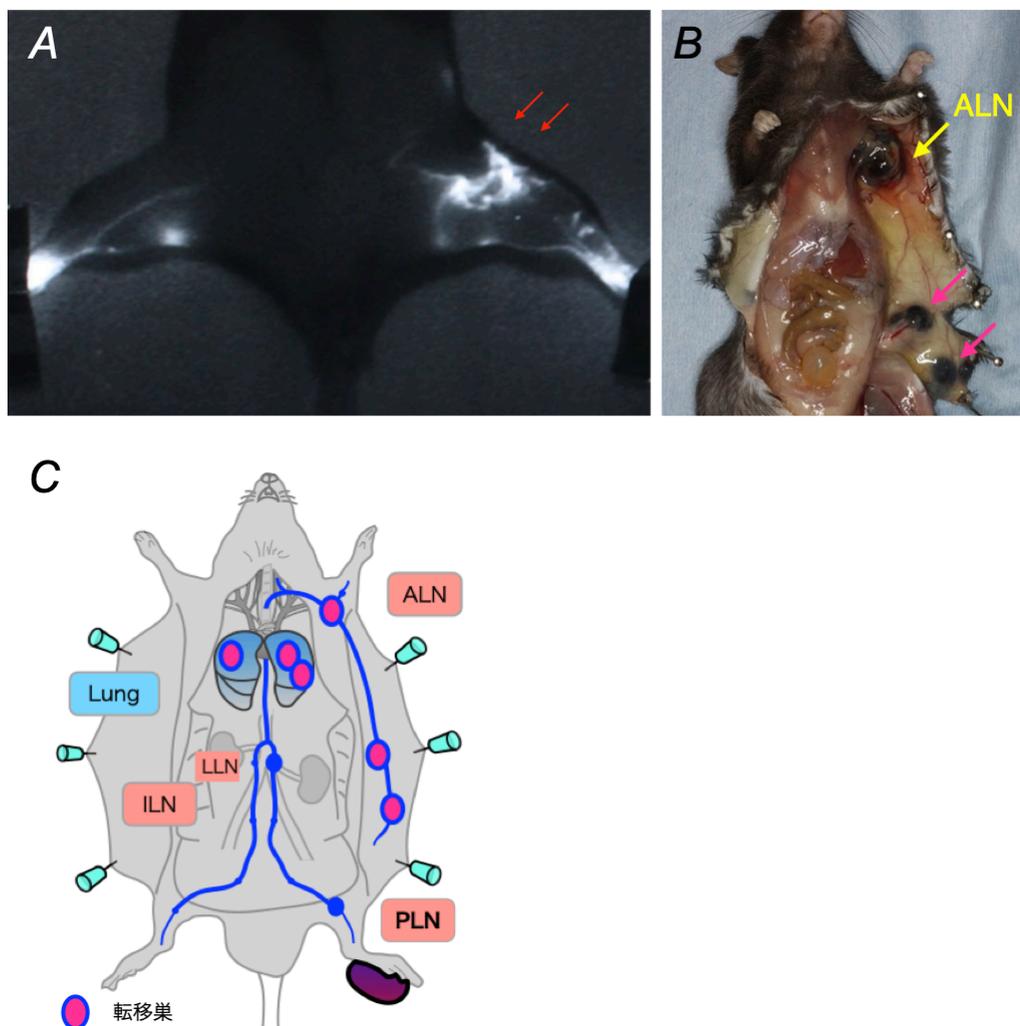


図16. VLNT(Ir-)群の一例

- 術後3週目の ICG 蛍光リンパ流評価(仰臥位)。術側後肢に異常リンパ管新生(矢印)と軽度の DBF を認めた。
- 剖検時、腋窩リンパ節(ALN; axillary lymph node)と左側腹部に多発する皮下転移巣を認めた。
- 転移巣の模式図。移植リンパ節、腰部リンパ節(LLN; lumbar lymph node)には転移を認めなかった。

## 7. 移植リンパ節の免疫細胞評価

### リンパ節の形態的評価 (HE 染色)

腫瘍を移植していないマウスの膝窩リンパ節 (n=4) およびコントロール群の膝窩リンパ節 (n=8) と同様に、VLNT(lr+)群の移植リンパ節 (n=14) ではおおむね濾胞構造は保たれ、濾胞部 (B 細胞領域) と傍皮質 (T 細胞領域) の構造区分が明瞭であった。一方で VLNT(lr-)群の移植リンパ節 (n=9) では全体的に細胞密度が高く、明らかな濾胞構造は認めなかった (図 17)。

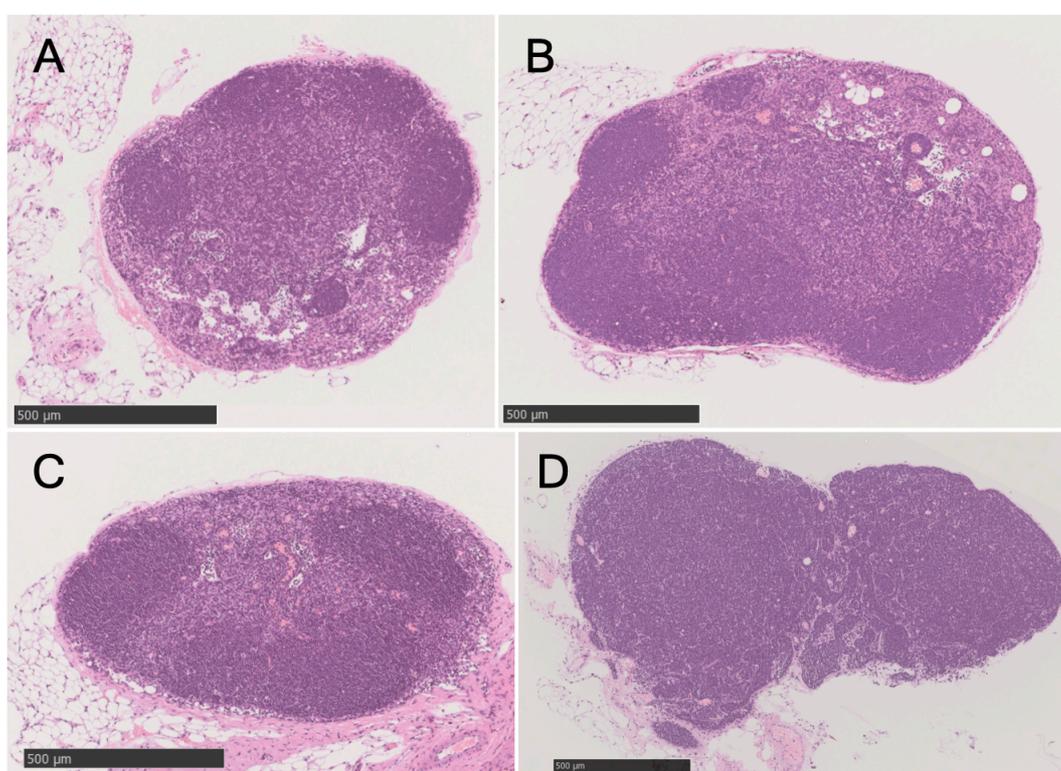


図 17. 腫瘍移植後 4 日目のリンパ節 (HE 染色)

- A. 通常膝窩リンパ節 B. コントロール群の膝窩リンパ節  
C. VLNT(lr+)群の移植リンパ節 D. VLNT(lr-)群の移植リンパ節

### 樹状細胞評価 (CD11c 染色)

CD11c に対する免疫組織化学染色で、コントロール群の膝窩リンパ節と同様に VLNT(lr+)群の移植リンパ節では樹状細胞は辺縁洞や傍皮質に散在して分布する傾向にあった。一方で VLNT(lr-)群の移植リンパ節では全体に染色性を認めず、樹状細胞は乏しかった (次頁図 18)。

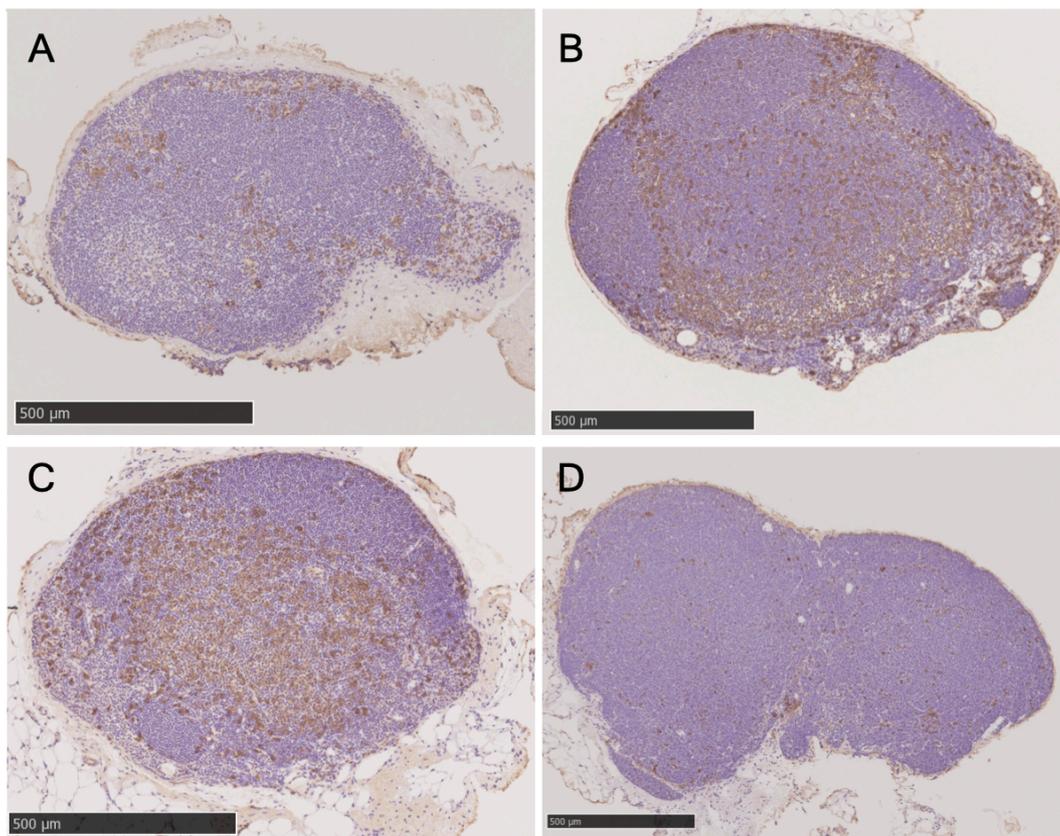


図 18. 腫瘍移植後 4 日目のリンパ節 (CD11c 染色)

A. 通常膝窩リンパ節 B. コントロール群の膝窩リンパ節

C. VLNT(lr+)群の移植リンパ節 D. VLNT(lr-)群の移植リンパ節

腫瘍を移植していないマウスの膝窩リンパ節における樹状細胞の割合は、平均 4.33 (3.67-4.82) %であった。腫瘍移植後 4 日目における各群の樹状細胞の割合は、コントロール群 平均 8.71 (7.76-9.36) %、VLNT(lr+)群 平均 8.63 (7.42-10.68) %、VLNT(lr-)群 平均 3.46 (2.11-4.50) %であった。コントロール群、VLNT(lr+)群で腫瘍移植によって樹状細胞の割合は有意に増加していた (いずれも  $p < 0.05$ )。腫瘍移植後 10 日目における各群の樹状細胞の割合は、コントロール群 平均 8.04 (5.26-10.64) %、VLNT(lr+)群 平均 7.48 (3.17-9.60) %、VLNT(lr-)群 平均 2.81 (0.47-6.02) %であり、腫瘍移植後 4 日目と同様の傾向がみられた (次頁図 19)。

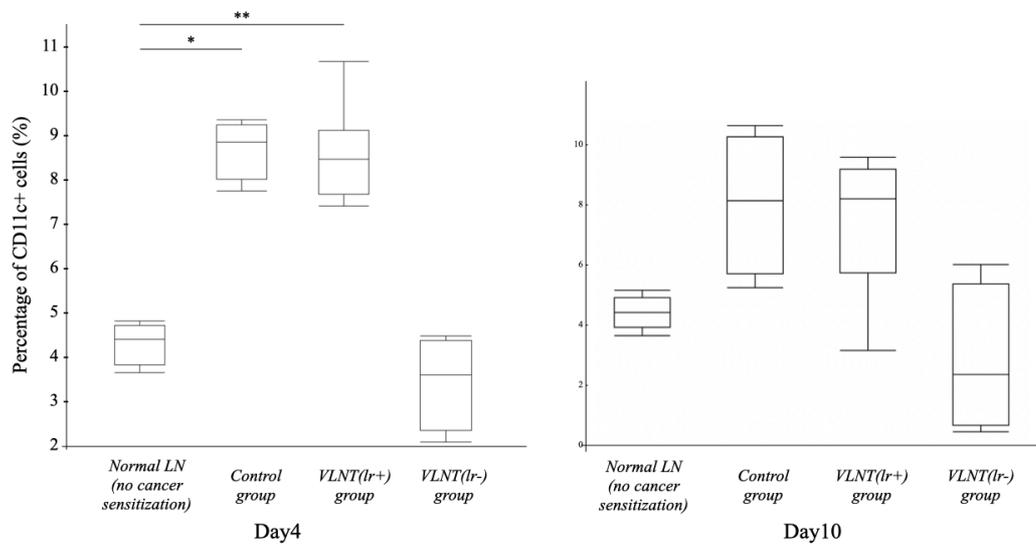


図 19. 腫瘍移植後 4 日目(左)、10 日目(右)の膝窩領域リンパ節の樹状細胞の割合  
\*, \*\*;  $p < 0.05$ . (Dunnett's test)

### T 細胞評価 (CD3 染色)

CD3 に対する免疫組織化学染色で、コントロール群の膝窩リンパ節と同様に VLNT(lr+)群の移植リンパ節では傍皮質に T 細胞が分布する傾向にあった。VLNT(lr-)群の移植リンパ節でも T 細胞を認めたが、コントロール群や VLNT(lr+)群と異なりリンパ節の全体に T 細胞が分布している傾向にあった (次頁図 20)。

腫瘍を移植していないマウスの膝窩リンパ節における T 細胞の割合は、平均 25.06 (21.40-26.79) %であった。腫瘍移植後 4 日目における各群の T 細胞の割合は、コントロール群 平均 27.48 (25.56-31.86) %、VLNT(lr+)群 平均 30.53 (26.59-33.28) %、VLNT(lr-)群 平均 31.00 (23.98-36.78) %であった。全群で腫瘍移植によって T 細胞の割合は増加している傾向にあったが有意差は認めなかった。腫瘍移植後 10 日目における各群の T 細胞の割合は、コントロール群 平均 24.90 (15.38-34.12) %、VLNT(lr+)群 平均 24.68 (17.05-37.39) %、VLNT(lr-)群 平均 25.76 (9.41-45.72) %であり、腫瘍移植後 4 日目より割合が低い傾向にあったが有意差は認めなかった (次頁図 21)。

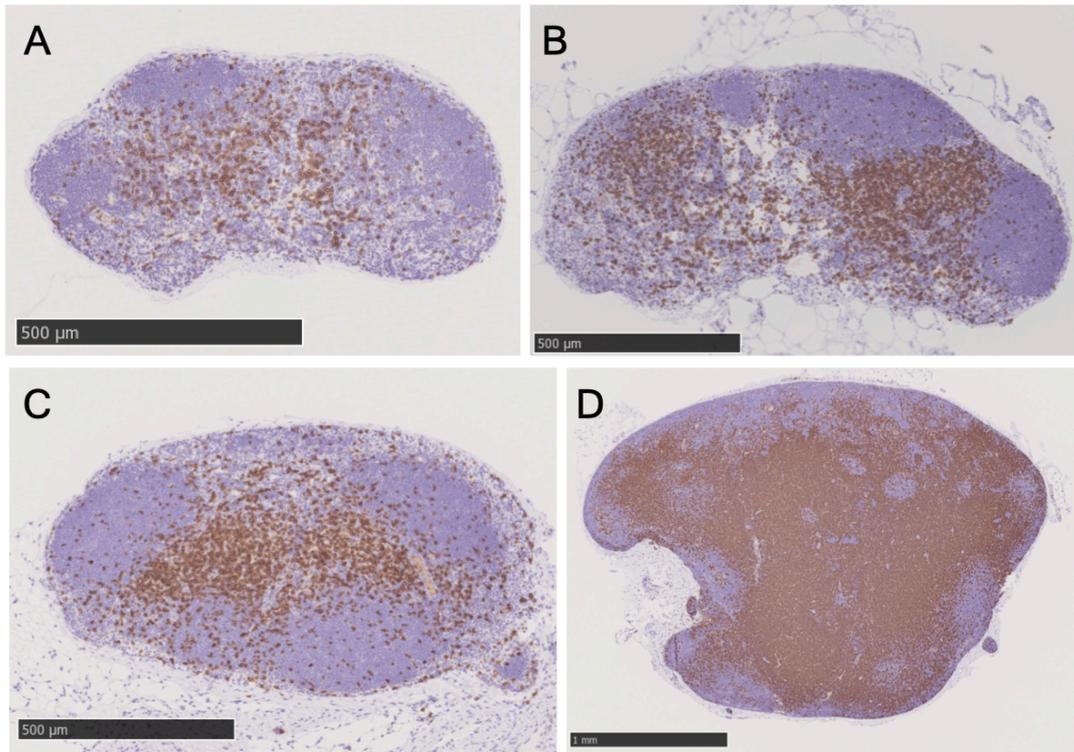


図 20. 腫瘍移植後 4 日目のリンパ節 (CD3 染色)

- A. 通常膝窩リンパ節 B. コントロール群の膝窩リンパ節  
 C. VLNT(ir+)群の移植リンパ節 D. VLNT(ir-)群の移植リンパ節

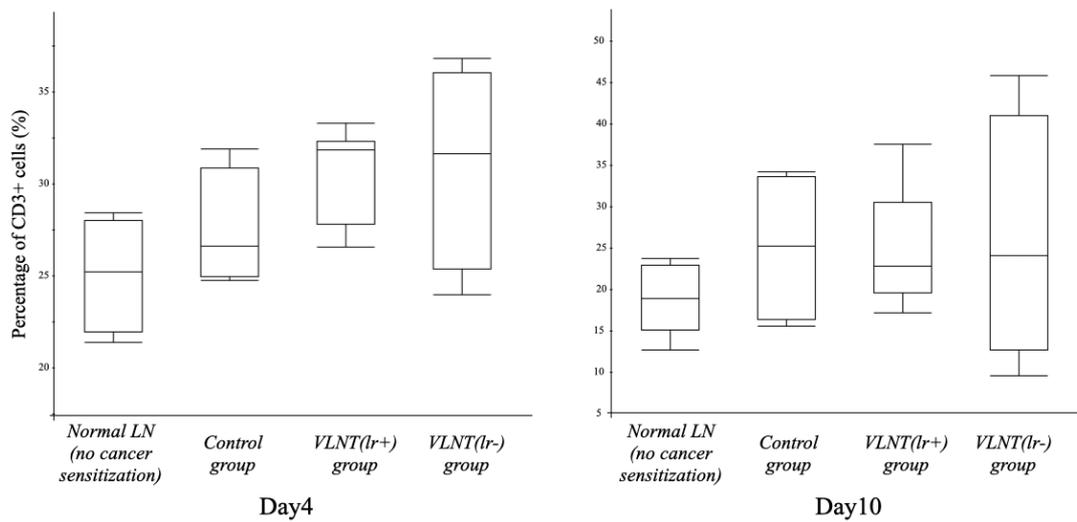


図 21. 腫瘍移植後 4 日目 (左)、10 日目 (右) の膝窩領域リンパ節の T 細胞の割合

## B 細胞評価 (B220 染色)

B220 に対する免疫組織化学染色で、コントロール群の膝窩リンパ節と同様に VLNT(lr+)群の移植リンパ節では濾胞構造を形成する B 細胞が集簇して分布する傾向にあった。VLNT(lr-)群の移植リンパ節でも染色陽性の B 細胞を認めただが、明らかな濾胞構造を認めず、リンパ節の全体に B 細胞が分布している傾向にあった (図 22)。

腫瘍を移植していないマウスの膝窩リンパ節における B 細胞の割合は、平均 26.65 (22.42-31.62) %であった。腫瘍移植後 4 日目における各群の B 細胞の割合は、コントロール群 平均 30.52 (27.33-33.23) %、VLNT(lr+)群 平均 30.81 (24.38-39.58) %、VLNT(lr-)群 平均 30.00 (24.39-33.42) %であった。全群で腫瘍移植によって B 細胞の割合は増加していたものの、有意差は認めなかった。腫瘍移植後 10 日目における各群の B 細胞の割合は、コントロール群 平均 26.0 (18.18-31.64) %、VLNT(lr+)群 平均 29.03 (22.08-39.12) %、VLNT(lr-)群 平均 16.98 (10.24-21.15) %であった。腫瘍移植後 4 日目より VLNT(lr-)群で割合が低い傾向があったが有意差はなかった (次頁図 23)。

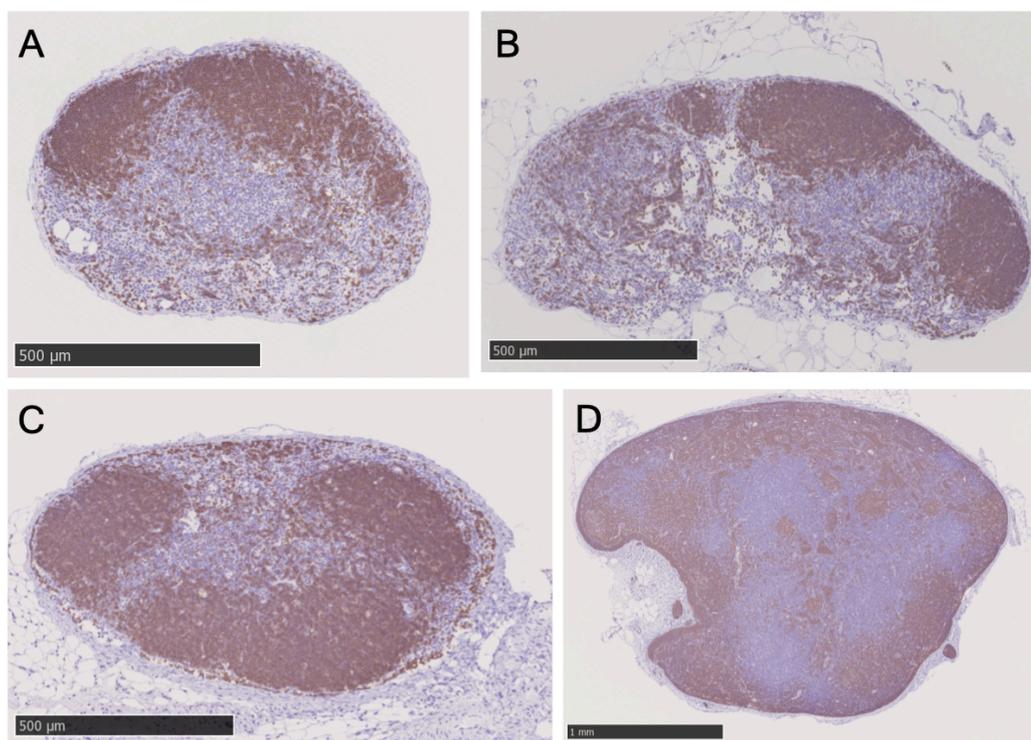


図 22. 腫瘍移植後 4 日目のリンパ節 (B220 染色)

- A. 通常膝窩リンパ節 B. コントロール群の膝窩リンパ節  
C. VLNT(lr+)群の移植リンパ節 D. VLNT(lr-)群の移植リンパ節

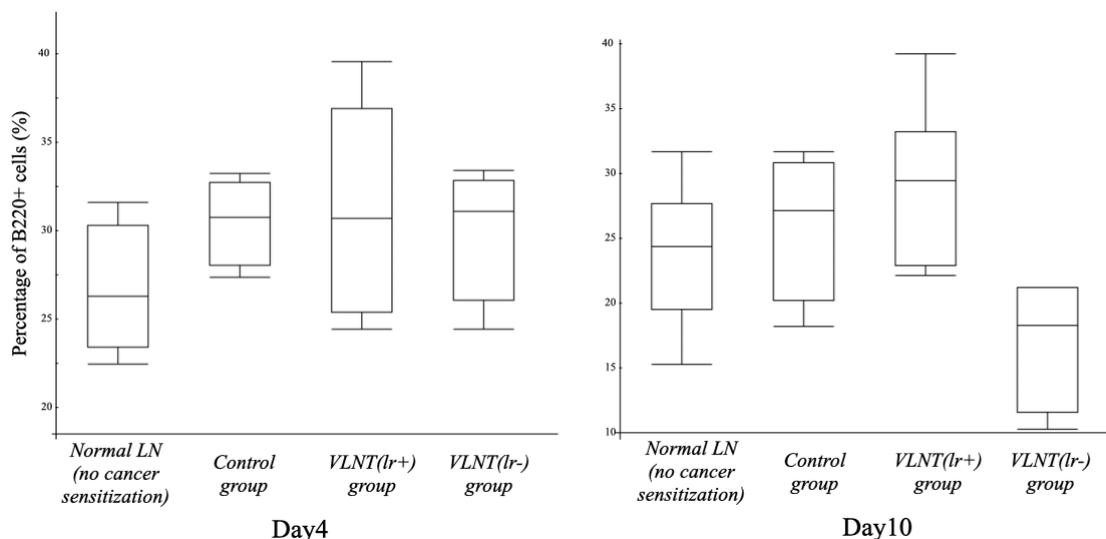


図 23. 腫瘍移植後 4 日目(左)、10 日目(右)の膝窩領域リンパ節の B 細胞の割合

## 8. 対側膝窩リンパ節の形態と免疫細胞評価

HE 染色では、いずれのリンパ節も濾胞構造が保たれ、濾胞部 (B 細胞領域) と傍皮質 (T 細胞領域) の構造区分が明瞭であった。

各群のリンパ節の免疫組織化学的染色で、樹状細胞の割合は、コントロール群 平均 6.32 (5.55-7.56) %、VLNT(lr+)群 平均 5.88 (5.69-6.07) %、VLNT(lr-)群 平均 5.59 (4.41-6.66) %であった。T 細胞の割合は、コントロール群 平均 22.36 (16.58-29.48) %、VLNT(lr+)群 平均 23.42 (14.89-31.95) %、VLNT(lr-)群 平均 23.67 (17.33-29.16) %であった。B 細胞の割合は、コントロール群 平均 26.45 (23.54-28.45) %、VLNT(lr+)群 平均 33.48 (32.62-34.35) %、VLNT(lr-)群 平均 27.99 (23.0-35.55) %であった。前項 6 で得られた腫瘍を移植していないマウスの膝窩リンパ節における免疫細胞の割合と比較したが、いずれも統計学的に有意な差を認めなかった。

## 考察

従来 VLNT の小動物モデルは少なく、VLNT と癌動態の関連についての研究はこれまで数が限られていた。本研究では 2019 年に報告されたマウス VLNT モデル(Ishikawa et al., 2019a)を用いて、リンパ節郭清により局所リンパ系を破壊させた LND モデルと比較して癌の増殖能・転移能の変化を評価した。その結果、腫瘍移植後 4 週の結果で VLNT 後に移植リンパ節に輸入リンパ管再疎通が起こった群では肺や腋窩リンパ節などの遠隔転移が有意に抑制されていることが示された。

パイロット実験では、手術介入後の後肢リンパ流を術後 12 週まで評価した。その結果、術後 3 週で輸入リンパ管の再疎通が確認できた VLNT(lr+)群では術後 8 週、術後 12 週でも再疎通が確認でき、コントロール群と同様に術後いずれの時点でもリンパのうっ滞所見を認めなかった。一方で輸入リンパ管の再疎通が得られなかった VLNT(lr-)群では術後 3 週から一部の個体でリンパのうっ滞所見を認めた。また術後 8 週以降、移植リンパ節を通らないリンパ側副路の発達などの異常リンパ管新生を認めた。これらは LND 群の所見と類似し、また既報で報告されている局所リンパ系が破壊されたマウスのリンパ流の経過と類似するものだった(Blum et al., 2013; Ishikawa et al., 2019a; Kwon et al., 2014)。つまり VLNT 後に輸入リンパ管再疎通が起きた群では後肢リンパ流を正常に再建でき、循環系の機能を回復させたことを示していた。VLNT が臨床的に有用とされる理由の一つは、移植リンパ節を足場に既存の毛細リンパ管やリンパ管内皮前駆細胞から新たなリンパ管新生が惹起され、局所のリンパネットワークの再構築が促されることが知られている(Ito and Suami, 2014; Saaristo et al., 2012; Miranda Garcés et al., 2017)。これにより間質液の回収を促進し、生理的還流に戻す循環系の改善効果が知られる(Cheng et al., 2014; Gould et al., 2018)。またパイロット実験の術後 12 週の結果で、VLNT(lr-)群と LND 群においてリンパのうっ滞所見が改善した個体もみられたことから、これらでは時間経過とともにリンパ側副路からの組織液回収が促されたものと推察された。この時点では局所リンパ系の回復状態に個体差が大きく、以降の本実験における癌動態の評価時期として適切でないと考えたため、本実験では術後 4 週に腫瘍を移植し、術後 8 週（腫瘍移植後 4 週）前後を増殖能・転移能評価の評価時期として用いることとした。

原発巣評価において、腫瘍移植後 4 週目までは LND 群で腫瘍体積が大きく、VLNT 手術介入群でコントロール群と同様に体積が小さい傾向にあった。腫瘍移植後 5 週になるとこれらの傾向はばらつきが認められ、増大した腫瘍が

一部自壊する個体もみられた。いずれの評価時点でも統計学的有意差はなく、輸入リンパ管の再疎通の有無では腫瘍体積に明らかな差は認められなかった。本実験系では足底に腫瘍があるという性格上、摩擦などの運動刺激により腫瘍が自壊するなどして個体差が生じた可能性が考えられる。過去の報告では局所リンパ系破綻モデルでは局所の組織間圧高値や低酸素などの物理環境が癌の脈管新生因子を増加させ、癌増殖能が増大することが知られている(Rofstad et al., 2002; Zhu et al., 2013)。局所リンパ系再構築に伴う物理環境の改善が癌の増殖能抑制に寄与した可能性は考慮されたが、本実験の範囲内では明らかな結果として認められなかった。

腫瘍移植後4週の結果で、VLNT(lr+)が遠隔転移を有意に抑制した一方で、VLNT(lr-)では明らかな転移抑制効果を示さなかった。またリンパ節転移の傾向として、コントロール群の膝窩リンパ節と同程度の転移がVLNT(lr+)群の移植リンパ節に認められたのに対し、VLNT(lr-)群の移植リンパ節ではほとんど転移はみられなかった。つまりVLNT(lr+)群では局所リンパ系の正常な再構築が起こり、その結果移植リンパ節が一旦失われたセンチネルリンパ節になり代わったといえる。この結果は前述のICG蛍光リンパ管造影でVLNT(lr+)群で膝窩に明瞭な蛍光像が確認できた所見とも一致する。一方でVLNT(lr-)群およびLND群では通常転移がみられない腋窩リンパ節へ転移がみられたことから、手術侵襲により一度破壊された局所リンパ系が再構築する過程において、正常と異なるリンパ流路が再構築されてしまい、本来転移するはずのない腋窩への異常なリンパネットワークをつくってしまった可能性が考えられる(Alitalo, 2011; Kwon et al., 2014; Maeda et al., 2018)。臨床的にもリンパ流路は癌の転移経路となりえ、リンパ節郭清やリンパ節生検後のリンパ流路の変化は癌の転移経路も変化させることが知られる(Alitalo, 2011)。

リンパ管によって全身に張り巡らされるリンパ系ネットワークは免疫監視機構の解剖学的枠組みを提供している。すなわち正常に機能するリンパ管は組織における抗原の分布と提示、樹状細胞などの免疫細胞の輸送と活性化の直接的な調節、そして白血球の相互作用に重要な影響を有する(Podgrabinska et al., 2009; Miteva et al., 2010; O'Melia et al., 2019)。本研究において、前転移段階である癌移植後4日目のリンパ節の評価で、VLNT(lr+)群の移植リンパ節ではコントロール群の膝窩リンパ節と同様に辺縁洞や傍皮質に樹状細胞の分布を認め、またその割合は腫瘍移植によって有意に増加していた。免疫細胞の中でも樹状細胞は早期の腫瘍免疫応答において重要な役割を有する。すなわち末梢組織で腫瘍抗原を認識した樹状細胞はケモカイン(CCR7、CCL21)の関与によって輸入リンパ管を通過してリンパ節に侵入し、T細胞などのリンパ球を活性化させ

ることで腫瘍免疫応答を促進させる(Randolph et al., 2005 ; Teoh et al., 2009 ; Cochran et al., 2006; Itano and Jenkins, 2003)。つまり本研究の結果から、VLNT(lr+)群の移植リンパ節では輸入リンパ管の再疎通が起こったことで樹状細胞が移植リンパ節に流入可能となり、抗原提示を介した腫瘍免疫応答が惹起されていた可能性が示唆された。VLNT(lr-)群で樹状細胞の増加がほぼみられなかったことも同様の背景と考えられる。

一方で樹状細胞の傾向とは異なり、T細胞およびB細胞の割合はVLNT(lr-)群を含む全群で増加傾向にあり、輸入リンパ管再疎通の有無による違いはなかった。これはリンパ球の動態が樹状細胞のそれと異なることが原因と考えられる。リンパ球は血管系とリンパ系の間を繰り返し循環することで免疫監視を行い、血中からリンパ節内のHEVを介してリンパ節の組織実質へと移行する。これらのリンパ球は抗原による感作を受けなければ速やかに輸出リンパ管からリンパ節外へ排出され、再び血液系へと戻る(Matsuno et al., 2010)。VLNT(lr-)群ではリンパ系ネットワークの再構築がなされておらず、その結果HEVからリンパ節内に流入したリンパ球が節外へ流出できずに滞留し、結果としてこれらの割合が増加していたと推察される。また全身免疫能への影響としてSLNではない対側膝窩リンパ節の免疫細胞の割合も評価したが、群間による明らかな差はなく、本研究の範囲では関与は明らかでない。

以上のことから、VLNT後に局所リンパ系ネットワークが物理的に再構築されることで免疫細胞の輸送が可能となり、新たにセンチネルリンパ節となった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惹起されることによって、生体においてVLNTによる腫瘍制御能が発揮された可能性が示唆された。

腫瘍移植後10日目の結果では、免疫細胞の割合に腫瘍移植後4日目ほどの差は現れなかった。悪性黒色腫は原発巣の腫瘍増殖に伴い免疫抑制因子を産生することが知られるが、これらの因子はリンパ管を介してリンパ節、特にセンチネルリンパ節において劇的な免疫抑制をもたらし、自らが転移しやすい環境をつくることが知られる(Cochran et al., 2001; Morton et al., 2003)。このような免疫抑制のシステムは、様々な病態生理が考慮されているが、特にセンチネルリンパ節における樹状細胞の活性抑制やT細胞の密度および成熟度に影響することが知られる(Cochran et al., 2001; Takeuchi et al., 2008)。マウス悪性黒色腫モデルにおいてどの時期でセンチネルリンパ節の免疫抑制が起こりうるかについては明らかでないが、移植後の日数で免疫細胞の結果が異なったことは、腫瘍増殖に伴う免疫抑制の可能性を考慮してもよいかもしれない。

腫瘍移植後 5 週の転移巣評価では、いずれの群でも転移が増えており、有意な結果が得られなかった。癌の増殖は個体の免疫機構による腫瘍免疫能と癌による免疫抑制のバランスによる(Chandrasekaran and King, 2014)。すなわち癌が進行し宿主の免疫能を超えて腫瘍細胞が増殖した場合、全身的な免疫抑制や血行性転移を引き起こすと考えられている。本研究において、腫瘍移植後 5 週目ではいずれの群でも腫瘍増殖が進み、群間の差の評価ができなかったものと考えられる。また VLNT(lr-)群では術後 3 週目で輸入リンパ管再疎通が得られなかったにも関わらず、腫瘍移植後 5 週で膝窩の移植リンパ節に転移がみられた。これは腫瘍リンパ管新生が起こった可能性が考えられる。ヒト悪性黒色腫をはじめ複数の癌腫において、癌原発巣では腫瘍細胞や炎症細胞により分泌される VEGF-C などの増殖因子やサイトカインにより新たなリンパ管新生を誘導することが知られる(Dadras et al., 2003; Stacker et al., 2014)。所属リンパ節における腫瘍リンパ管新生はリンパ節転移の拡大と相関し、遠隔リンパ節を含む遠隔臓器への転移を促進する(Hirakawa et al., 2005; Hirakawa et al., 2007)。これは VLNT によって輸入リンパ管再疎通が起きた移植リンパ節が遠隔転移を抑制する結果と一見矛盾するようにも感じられるが、腫瘍によるリンパ管新生と違い正常に再構築されたリンパ系では局所免疫能が保たれているものと考えられる。

本研究には限界がある。第一に、癌の動態研究としてのコストや取り扱いの簡易さ、抗体の充実などの点からマウスモデルを用いた。マウスの場合膝窩リンパ節は一つだが、ヒトでは所属リンパ節は複数存在し、リンパ流路も単一に限らず、リンパ系はより複雑である。そのため複数のリンパ節やリンパ流路への影響をより詳細に検証するためには、イヌやブタなどの大型動物モデルの評価が適当かもしれない(Chen et al., 1990; Honkonen et al., 2013)。

第二に、免疫細胞の解析は組織学的評価に限定される。今回、移植リンパ節の形態および節内における免疫細胞の分布を観察する目的で組織学的評価を選んだが、リンパ節における T 細胞のサブセットの評価や腫瘍免疫能のより詳細な解析には、フローサイトメトリー法や ELISpot アッセイなどによる検証が必要だろう。

第三に、実臨床ではリンパ系破綻が起きた患者にその治療として VLNT を行うが、本研究ではリンパ系破綻モデルと VLNT モデルを比較している。しかしマウス VLNT モデルの作製のためには膝窩リンパ節摘出と同時に鼠径リンパ節を移植する必要があるため、一旦膝窩リンパ節郭清や鼠径リンパ節摘出をした後に二期的に VLNT 手技を行うことは不可能である。またマウスでは一旦リンパ系が破綻しリンパ流うっ滞などの所見が見られても、長期的な経過

ではリンパ側副路の発達などの影響でリンパ流うっ滞が改善することが予想されるため、リンパ系破綻手技の後に VLNT を行い評価する実験系は現実的ではないと考え、本研究の実験系を計画した。

## 第二章

### 移植リンパ節の血管柄の有無と腫瘍制御能の検証

#### 緒言

##### 1. 背景

臨床において VLNT は手術用顕微鏡下に 1mm 以下の血管を吻合しリンパ節群を移植する手術手技である。これは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ためである(Shesol et al., 1979; Tourani et al., 2016)。当教室は過去にマウスで血管柄を切離した同所遊離リンパ節移植モデルを用いて、移植リンパ節における免疫細胞分布や機能、血管構造の変化を解析し、腫瘍免疫能を評価した。その結果、移植リンパ節はある程度の腫瘍免疫能を発揮するものの限定的であり、移植リンパ節に血管柄が無いことは腫瘍免疫能を低下させる可能性が示唆された(Maeda et al., 2018)。

一方で癌のリンパ行性転移と血行性転移の関わりにおいて、末梢からリンパ流に乗りリンパ節に入った癌細胞が節内のリンパ静脈シャントである HEV から体循環に入り血行性転移をきたしている可能性が報告されている(Brown et al., 2018) (図 24 : Miranda Garcés et al., 2016)。つまりリンパ節の血管柄の存在が血行性転移の足場になりうるのではないかという指摘である。

VLNT による腫瘍制御効果を期待するにあたり、血管柄の存在が腫瘍免疫能に有利に働くのか、それとも癌転移を助長させてしまうのかは重要な課題である。

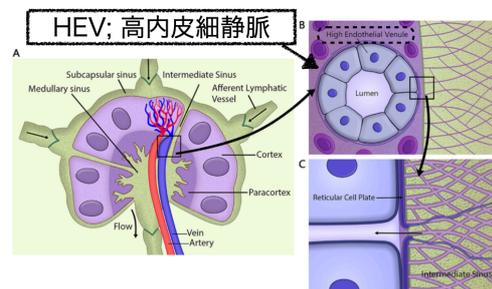


図 24. リンパ節と節内の HEV の模式図 (Miranda Garcés et al., 2016) より引用改変

##### 2. 目的

マウスリンパ節移植モデルにおいて、移植リンパ節の血管柄の有無によって腫瘍制御効果に差がでるかどうかを検証する。血管柄が無い non-Vascularized

リンパ節移植 (nonVLNT) モデルを作製して癌動態への影響と移植リンパ節における腫瘍免疫能を解析する。第一章で有意な差が得られた肺転移、リンパ節転移、および前転移段階の移植リンパ節における免疫細胞の分布・割合を本章のモデルで解析し、第一章の結果と比較する。

## 方法

### 1. モデル作製手技

当教室が 2019 年に報告した手技に準じて次の通り nonVLNT モデルを作製した(Ishikawa et al., 2019b)。第一章と同様に、8 週齢の C57BL/6N マウスを 2 週間の馴化期間の後に使用した。術前の除毛、2%パテントブルー皮下注射を行った。第一章では VLNT モデル作製手技として左鼠径リンパ節を血管柄付きで挙上したが、本章の nonVLNT モデルでは血管柄を切離し、左鼠径リンパ節組織群を同側の膝窩リンパ節摘出部に移行した。10-0 ナイロン糸 1 針で大腿二頭筋と脂肪組織を縫合しリンパ節組織群を固定した。

### 2. 後肢リンパ流評価と群分け

第一章と同様の手技で、術後 3 週目に ICG 蛍光リンパ管造影によりマウス後肢のリンパ流を評価した。移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通のあった群は nonVLNT(lr+)群、輸入リンパ管再疎通のなかった群は nonVLNT(lr-)群とした。

### 3. ルシフェラーゼ安定発現マウス悪性黒色腫細胞の維持と調整

第一章と同様に、B16F10-luc2 悪性黒色腫細胞株 (B16 F10 luc2 Mouse Melanoma Cells; Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, U.S.) を使用した。対数増殖期にある癌細胞を細胞密度が  $8 \times 10^6$  個/ml となるように PBS で細胞浮遊液を調製し、術後 4 週目にマウスの左足底に  $4 \times 10^5$  個 (0.05ml) の癌細胞を皮下注射し移植した。

### 4. 肺・リンパ節転移巣評価

第一章と同様に、肺・リンパ節 (左膝窩の移植リンパ節、左腰部リンパ節、左腋窩リンパ節) の腫瘍細胞量をルシフェラーゼアッセイ法により定量評価した。第一章において腫瘍移植後 5 週では腫瘍の増殖が進み、リンパ節移植による腫瘍制御効果の検証が困難であったため、本章では評価週数は腫瘍移植後 4 週のみとした。

### 5. 移植リンパ節における組織学的検討

腫瘍移植後 4 日目のマウスを安楽死させ、左膝窩の移植リンパ節を摘出した。第一章と同様の手技で摘出したリンパ節の固定・パラフィン包埋・組織標本作製を行い、HE 染色・CD11c 染色・CD3 染色・B220 染色を行った。組織

スライドから得られたデジタルデータを用いて樹状細胞、T細胞、B細胞のリンパ節に占める面積の割合を定量評価した。

## 7. 統計学的検討

統計解析には統計ソフトウェア JMP (version 14.1.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。腫瘍細胞は指数関数的な増殖を示すため、肺・リンパ節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解析処理を行った。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 値 <0.05 を統計学的有意水準とした。

## 結果

### 1. 後肢リンパ流評価による群分け

nonVLNT手術群 26 体のうち、術側膝窩に明瞭な点状蛍光像を示した 15 体 (57.7%) を nonVLNT(lr+)群に分類し、それ以外の 11 体 (42.3%) を nonVLNT(lr-)群に分類した。nonVLNT(lr+)群では DBF や異常リンパ管新生を認めなかった一方で、nonVLNT(lr-)群では DBF や異常リンパ管新生の所見を認めた。

### 2. 肺転移巣評価

ルシフェラーゼアッセイ法による肺の腫瘍細胞量 (RLU 実数値) の平均値は non VLNT (lr+)群 1,185,401、non VLNT(lr-)群 2,685,882 だった。各群の RLU 値を第一章の結果と併せ図 25 に示す。nonVLNT(lr+)群では LND 群と比較し肺転移量は少ない傾向にあったが有意差を認めなかった。また VLNT(lr+)群と比較し転移量は多い傾向にあったが有意差を認めなかった。nonVLNT(lr-)群では LND 群と同程度の転移傾向にあった。肺転移陽性率は、nonVLNT (lr+) 33.3%、non VLNT(lr-)群 57.1%だった。

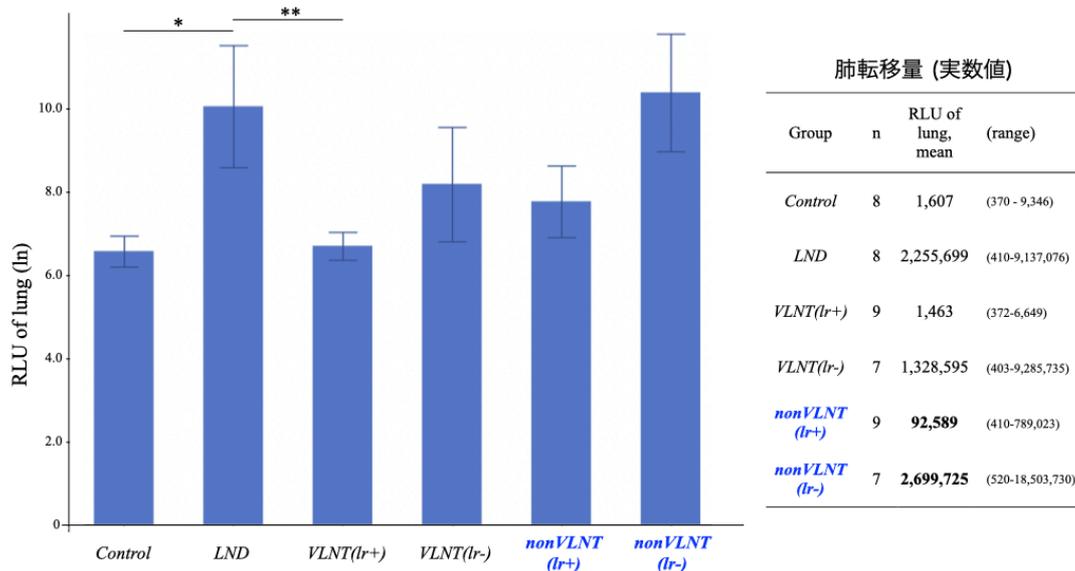


図 25. 腫瘍移植後 4 週目の肺転移量 グラフは自然対数変換後の RLU 値を示し、表は RLU 実数値を示す。\*, \*\*;  $p < 0.05$ . (Dunnett's test) 第一章の結果を含む

### 3. リンパ節転移巣評価

膝窩の移植リンパ節の腫瘍細胞量（RLU 実数値）の平均値（範囲）は、nonVLNT(lr+)群 11,713（72-103,785）、nonVLNT(lr-)群 239（78-920）だった。転移陽性率は non VLNT(lr+) 44.4%、non VLNT(lr-) 28.6%だった。第一章の結果と比較し、nonVLNT(lr+)群では VLNT(lr+)群と同程度転移を認めた。また VLNT(lr-)群では移植リンパ節に転移を認めなかったのに対し、nonVLNT(lr-)群では移植リンパ節に転移を認めた。

腰部リンパ節の腫瘍細胞量（RLU 実数値）の平均値（範囲）は、nonVLNT(lr+)群 9,660（98-81,121）、nonVLNT(lr-)群 114,965（100-798,237）だった。転移陽性率は non VLNT(lr+) 44.4%、non VLNT(lr-) 42.9%だった。nonVLNT(lr+)群、nonVLNT(lr-)群ともに VLNT(lr-)群と同程度の割合で腰部リンパ節に転移を認めた。

腋窩リンパ節の腫瘍細胞量（RLU 実数値）の平均値（範囲）は、nonVLNT(lr+)群で 187（80-934）、nonVLNT(lr-)群で 114,253（89-798,237）だった。転移陽性率は non VLNT(lr+) 11.1%、non VLNT(lr-) 42.9%だった。nonVLNT(lr+)群では VLNT(lr+)群と同様、腋窩リンパ節への転移をほぼ認めなかった。一方 nonVLNT(lr-)群では VLNT(lr-)群と同様、腋窩リンパ節への転移を認めた（図 26）。

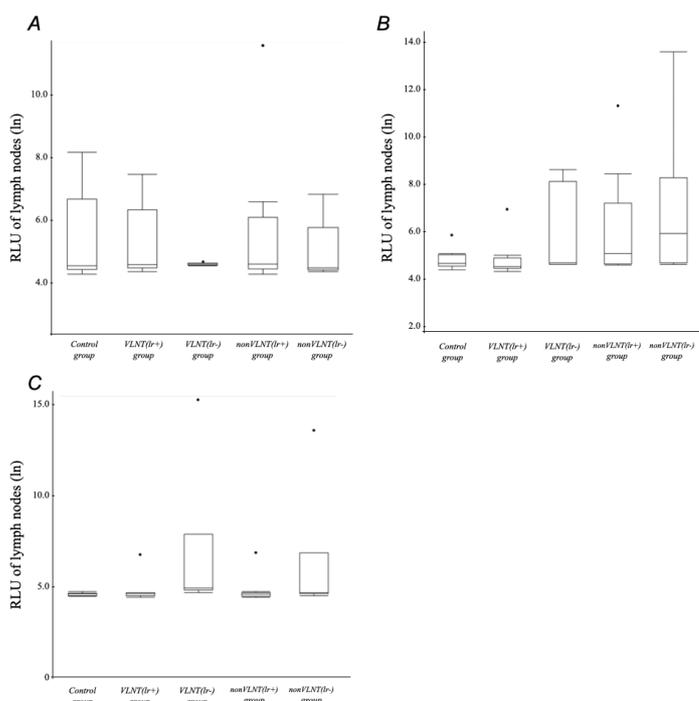


図 26. 腫瘍移植後 4 週目のリンパ節転移量 A. 膝窩領域リンパ節 B. 腰部リンパ節 C. 腋窩リンパ節 第一章の結果を含む

#### 4. 移植リンパ節の免疫細胞評価

##### リンパ節の形態的評価 (HE 染色)

nonVLNT(lr+)群の移植リンパ節 (n=5) では一部の検体で皮質領域と思われる濾胞構造を認めた。nonVLNT(lr-)群の移植リンパ節 (n=4) では全体的に細胞密度が高く、明らかな濾胞構造は認めなかった (図 27)。

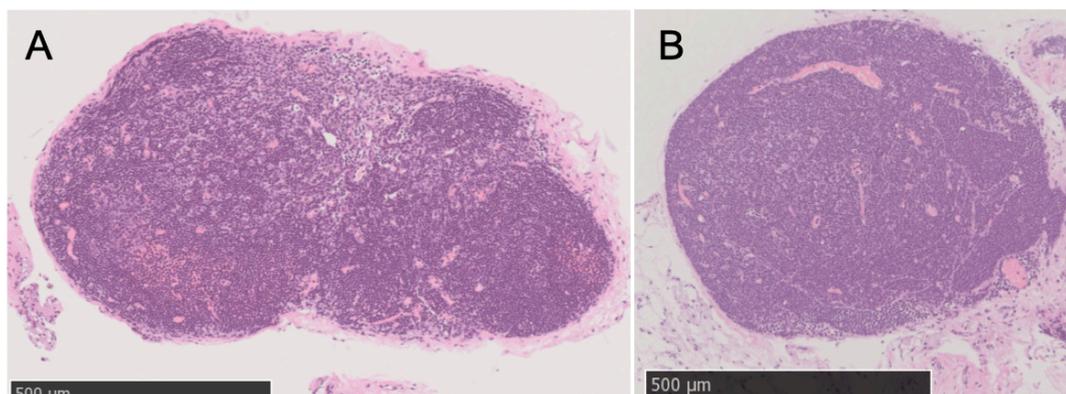


図 27. 移植リンパ節の HE 染色 A. non VLNT(lr+)群 B. non VLNT(lr-)群

##### 樹状細胞評価(CD11c 染色)

CD11c に対する免疫組織化学染色で、nonVLNT(lr+)群では散在して分布する樹状細胞を認めた。一方で nonVLNT(lr-)群では散在して分布する樹状細胞を一部の検体に認めた (図 28)。

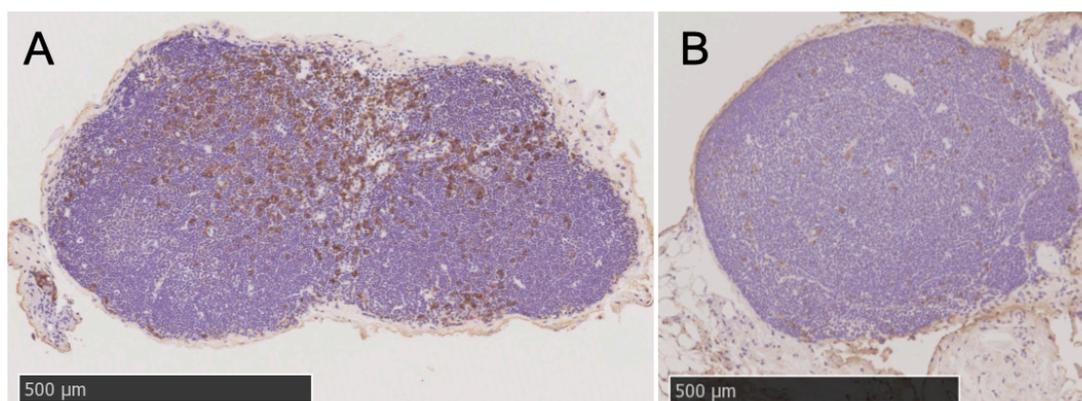


図 28. 移植リンパ節の CD11c 染色 A. non VLNT(lr+)群 B. non VLNT(lr-)群

各群の移植リンパ節の樹状細胞の割合は、nonVLNT(lr+)群は平均 5.10 (3.89-6.18) %、nonVLNT(lr-)群は平均 2.97 (1.41-4.94) %であった (次頁図 29)。各群の樹状細胞の割合に有意差を認めなかった。

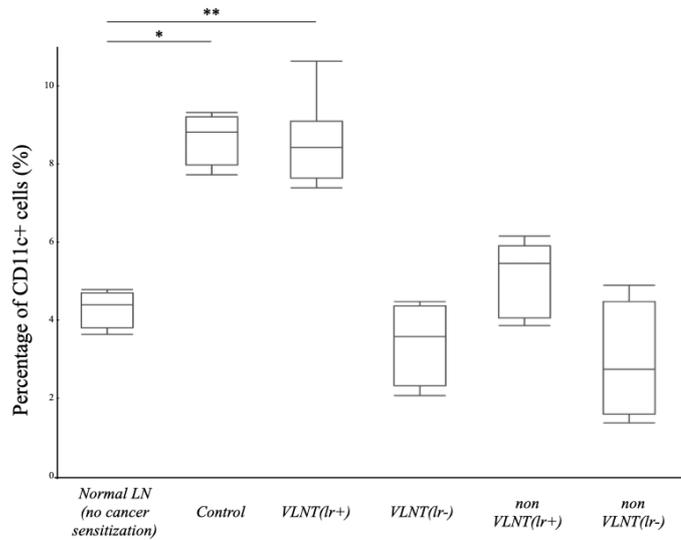


図 29. リンパ節中の樹状細胞の割合 第一章の結果を含む

\*, \*\*;  $p < 0.05$ . (Dunnett's test)

### T 細胞評価 (CD3 染色)

CD3 に対する免疫組織化学染色で、nonVLNT(lr+)群では一部の検体で主に傍皮質に分布する T 細胞を認めた。nonVLNT(lr-)群では染色陽性細胞の割合が多い検体もあったが、検体間でばらつきがあり、また T 細胞領域である傍皮質領域は明瞭ではなかった (図 30)。

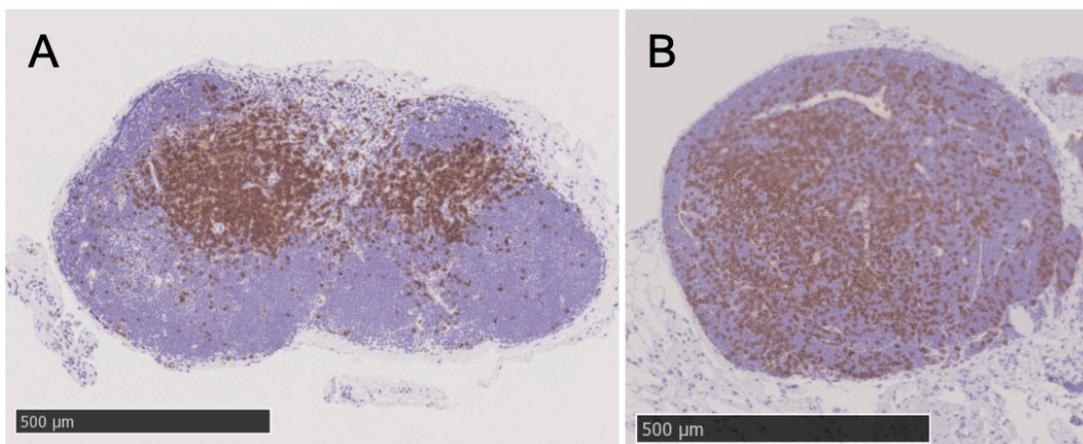


図 30. 移植リンパ節の CD3 染色 A. non VLNT(lr+)群 B. non VLNT(lr-)群

各群の移植リンパ節の T 細胞の割合は、nonVLNT(lr+)群は平均 23.89 (15.13-30.33) %、nonVLNT(lr-)群は平均 24.93 (17.18-31.35) %であった (次頁図 31)。

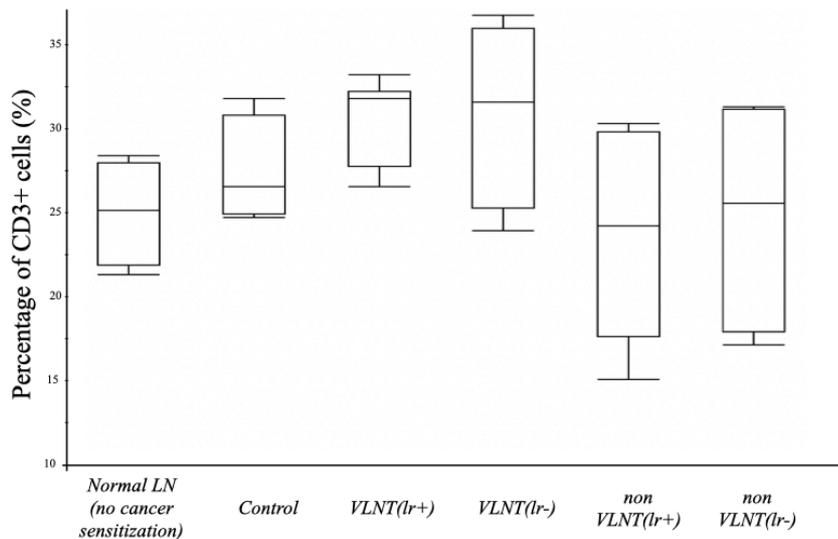


図 31. リンパ節中の T 細胞の割合 第一章の結果を含む

### B 細胞評価 (B220 染色)

B220 に対する免疫組織化学染色で、nonVLNT(lr+)群では一部の検体で濾胞構造を形成する B 細胞の集簇分布を認めた。nonVLNT(lr-)群では明らかな濾胞構造を認めず、リンパ節の全体に陽性細胞が分布している傾向にあった (図 32)。

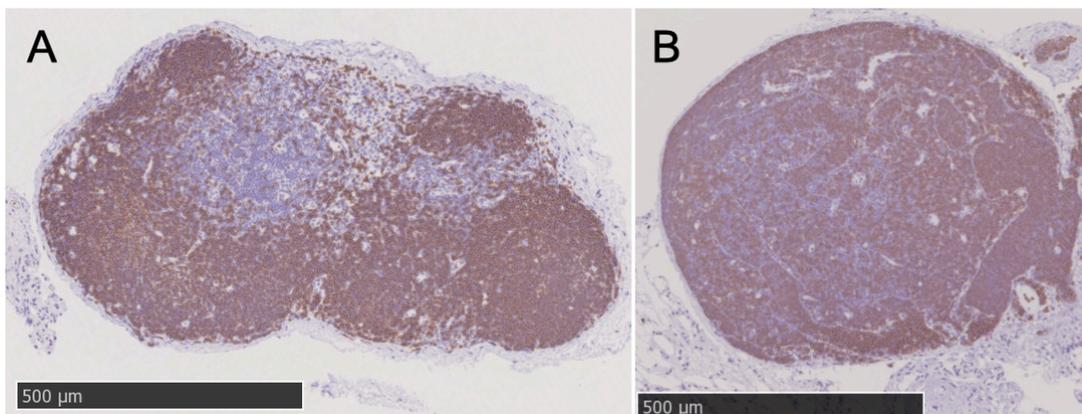


図 32. 移植リンパ節の B220 染色 A. non VLNT(lr+)群 B. non VLNT(lr-)群

各群の移植リンパ節の B 細胞の割合は、nonVLNT(lr+)群で平均 22.9 (16.58-36.29) %、nonVLNT(lr-)群で平均 24.58 (16.57-30.70) %であった (次頁図 33)。

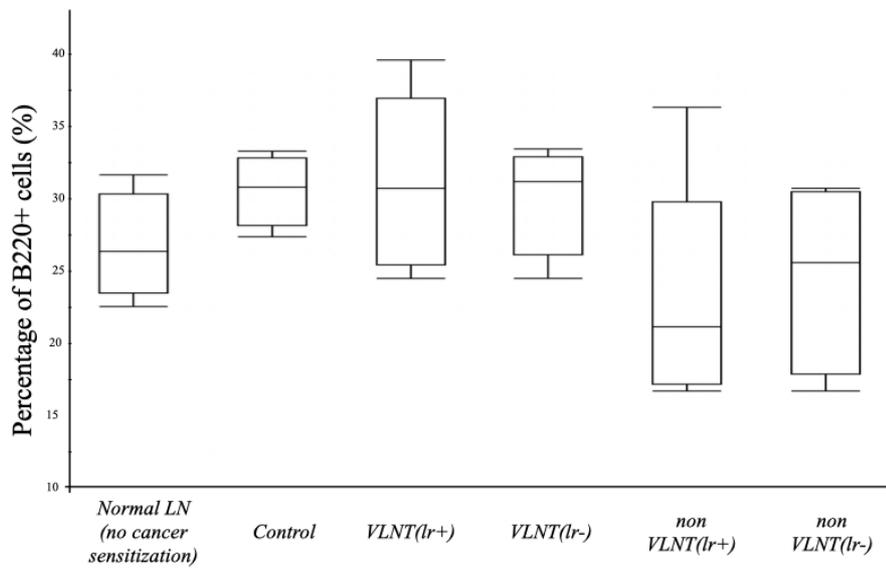


図 33. リンパ節中の B 細胞の割合 第一章の結果を含む

## 考察

リンパ節移植において、移植リンパ節の血管柄の有無によりその腫瘍免疫能を比較した報告は限られている。本章では、マウス VLNT モデルとその派生であるマウス nonVLNT モデルを用いて、移植リンパ節への血管柄の有無がリンパ節移植による腫瘍制御能の回復に及ぼす影響を検証した。本章で得られた結果はいずれも統計学的有意差がなく、今回の検討範囲においてはあくまで全体の傾向を把握する程度に留まるが、血管柄の無い nonVLNT モデルのうち輸入リンパ管再疎通が得られた nonVLNT(lr+)群ではリンパ節移植により肺転移抑制効果を示す傾向があるものの、血管柄の有る VLNT(lr+)群と比べると転移抑制効果にやや乏しい印象が得られた。また前転移段階の移植リンパ節において nonVLNT モデルでは VLNT モデルほどの免疫細胞の増加はみられず、その割合に広くばらつきがみられた。

第一章ではリンパ節移植による腫瘍制御効果の背景として、局所リンパ系の物理的な再構築が局所免疫能の向上に寄与した可能性を考察した。本章で行った腫瘍移植前の ICG 蛍光リンパ流評価では、手術群の 57.7%に移植リンパ節への輸入リンパ管の再疎通を確認した。これらの群では局所リンパ系が再構築されていたのに対し、再疎通のない群ではリンパ流うっ滞や異常リンパ管新生の所見を認めた。第一章の結果と比較しても術後の輸入リンパ管の再疎通率には大きな差がなく、本術式においてリンパ節の血管柄の有無が移植後の局所リンパ系の再構築に与える影響については特に確認できなかった。

また HE 染色による観察では、移植リンパ節の皮質に明瞭な濾胞構造が確認できるなど形態はおおむね維持されており、壊死など虚血の影響は肉眼的には認められなかった。既報ではマウスで血管柄の無いリンパ節移植を施行した後でも、多くの場合で移植リンパ節へ周囲から血管新生が起り生着が可能であるとされている。また移植後にこれらのリンパ節におけるリモデリングやリンパ管の再生が認められたことが報告されている(Tammela et al., 2007; Wolvers et al., 1999)。つまりマウスでは血管柄の無いリンパ節移植によっても局所リンパ系を物理的に再構築することは可能と考えられる。

しかし一方で、本研究のリンパ節転移の傾向をみると、移植リンパ節の上位リンパ節である腰部リンパ節への転移は同一評価週数にも関わらず VLNT(lr+)群よりも nonVLNT(lr+)群で増加していた。さらに移植リンパ節への転移については、本来リンパ管再疎通のないはずの nonVLNT(lr-)群でも、同一評価週数の VLNT(lr-)群ではみられなかった転移がすでに多くみられており、前者群では腫瘍リンパ管新生が後者群よりも進んでしまっていたものと考

えられた。これらのことから nonVLNT 群では移植リンパ節において腫瘍免疫能が低下している可能性が考えられた。また腋窩リンパ節に関しては、nonVLNT(lr+)群では VLNT(lr+)群と同様に転移がほぼなかったことから、同リンパ節への転移は局所リンパ系の物理的な再構築がうまくいかなかった場合に異常リンパ管新生が起こり新たな転移経路が形成されて生じるとする第一章の考察を支持する結果と考えられた。

移植リンパ節における腫瘍免疫能をさらに評価するため、本章でも免疫組織化学染色により免疫細胞の割合を解析した。前転移段階の移植リンパ節において、VLNT(lr+)群では樹状細胞の割合が有意に増加していたのに対し、nonVLNT(lr+)群では若干の増加傾向を認めるものの、有意差はなかった。また T 細胞および B 細胞の割合については、nonVLNT(lr+)群および nonVLNT(lr-)群では値に広くばらつきが見られた。石川らは本検討で用いたマウスモデルにおいて血管柄の無いリンパ節移植群では、血管柄の有るリンパ節移植群に比べ、節内の微小血管構造である HEV の機能が低下することを示している(Ishikawa et al., 2019b)。また前田らは血管柄の無い移植リンパ節ではコントロール群のリンパ節と比較し、HEV マーカーとして知られる MECA-79 の発現が減弱し、リンパ球や樹状細胞の遊走に重要な CCL21 の発現が有意に少ないことを示した(Maeda et al., 2018)。第一章で述べたように HEV は特異的な管腔構造がリンパ球の入り口となり、末梢組織において抗原に対する免疫応答を誘導するために重要な構造である(Girard et al., 2012; Kasprzak et al., 2013; Rosen, 2004)。CCL21 は HEV の内皮細胞で産生され、HEV におけるリンパ球の侵入誘導の他、樹状細胞に対しリンパ管内皮を通過させ、T 細胞領域への移動を誘導し免疫応答を惹起することが知られる(Takada and Jameson, 2009; Gunn et al., 1998)。以上のことから、移植リンパ節における乏血状態が HEV の機能を低下させ、その結果免疫細胞のリンパ節内への移動が減少し、腫瘍免疫能低下に影響したと推察した。

本研究には限界がある。まず、ヒトとは異なりマウスでは乏血状態で移植されたリンパ節でも多くの場合で生着する。そのため乏血による移植リンパ節の変化をより詳細に解析するためには、イヌやブタなどの大型動物モデルの評価が適切と考える。そして、今回の検討では HEV の評価を行っていない。癌によるリンパ節内の HEV の変化を詳細に把握するためには、電子顕微鏡による解析や細胞アッセイ法などを検証してもよいかもしれない。

## 総括および結論

### 本研究から得られた新知見

#### 第一章

- VLNT を施行したマウスでは、リンパ節郭清群と比較し原発巣の腫瘍体積が小さい傾向にあった。
- VLNT 後に移植リンパ節に輸入リンパ管再疎通が起きると、肺転移、遠隔リンパ節転移が有意に抑制された。
- VLNT 後に移植リンパ節に輸入リンパ管再疎通が起きると、移植リンパ節がセンチネルリンパ節に成り、リンパ節転移経路が正常化した。
- 輸入リンパ管再疎通が起きた移植リンパ節において、腫瘍移植に伴い樹状細胞の割合は有意に増加した。
- 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の有無で腫瘍移植に伴う T 細胞、B 細胞の割合の変化に明らかな差はなかった。

#### 第二章

- 血管柄の無いリンパ節移植では、VLNT と比較し、遠隔転移抑制効果に乏しかった。
- 血管柄の無いリンパ節移植では、移植リンパ節において免疫細胞の増加はみられなかった。

### 新知見の意義

これまで VLNT が癌動態に及ぼす影響について解析した臨床研究はない。本研究では、ヒト研究では困難な VLNT 後の生体における癌動態の観察と、移植リンパ節における腫瘍免疫能の評価を行った。これによりリンパ浮腫などの循環系の改善だけではない、腫瘍免疫能の改善の可能性が明らかとなった。

本研究では特に、リンパ系ネットワークを構成する輸入リンパ管とリンパ節の血管柄に着目した。その結果、VLNT 後に輸入リンパ管の再疎通が起きることと、移植リンパ節の血管柄が保たれることは、どちらも VLNT が抗腫瘍効果を発揮するために重要であることが示唆された。

癌種の中でも悪性黒色腫は高率にリンパ行性に転移し、根治的治療として原発巣切除、所属リンパ節郭清をしても皮内や皮下のリンパ管に既に進展していた場合、後の再発転移が惹起される恐れがある。本研究の結果から、リンパ節郭清によって失われた局所リンパ系ネットワークを VLNT によって再構築することで、移植リンパ節が失われたセンチネルリンパ節の役割を代替するなどして、残存腫瘍に対しても生体が腫瘍免疫能を発揮できる可能性を示した。

## 今後の展開

現在、VLNTは本邦では二次性リンパ浮腫の標準的治療とはなっておらず、中等症から重症例に対し一部の施設で施行されている。これまで浮腫改善などの循環系の機能回復効果が期待されていたが、近年では蜂窩織炎などの感染症を制御する効果など免疫系への関与も注目されつつある。今後、エビデンスが蓄積されることによって、VLNTなどのリンパ系機能不全に対する外科的治療が発展することを期待する。

また本研究のような基礎実験が進み、VLNTによる腫瘍制御の側面がより明らかとなれば、臨床において所属リンパ節郭清と併用したVLNTや、リンパ浮腫未発症例に対する予防的VLNTなど、癌治療を目的とした適応を考慮してもよいのかもしれない。

さらに今回の結果から、VLNT後の輸入リンパ管の再疎通率の向上が移植リンパ節における免疫応答をより惹起させる可能性が示唆された。現在試みられているVEGFの遺伝子導入などの治療がますます発展することを期待する。

## 今後の課題

今回マウスモデルを用いてVLNTによる生体の癌動態への影響を検証したが、ヒトではリンパ系はより複雑である。より臨床に即した観点で複数のリンパ節やリンパ流路への影響を検証するためには、イヌやブタなどの大型動物モデルの評価が必要と考えられる。

また、今回の検討の範囲では腫瘍免疫能の解析は移植リンパ節の組織学的評価に限られる。リンパ節における免疫細胞のより詳細な解析や全身免疫能への影響の検証には、フローサイトメトリーやELISpotアッセイ、細胞傷害活性、血清評価などを併用した解析が必要だろう。

マウスVLNTモデルから得られる知見は、VLNTが癌制御に果たす影響の評価に留まらない。本モデルを用いて、リンパ節およびリンパ管における癌の微小転移・進展機序の分子生物学的解明や腫瘍脈管新生の解析、あるいはセンチネルリンパ節への転移機序の解明など、検証の余地がある。

## 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 JP16H05491 の助成を受けたものである。

本研究の全般において御指導、御助言、御協力をいただいた北海道大学大学院医学研究院 形成外科学教室・山本有平教授、舟山恵美准教授、前田拓助教、石川耕資助教に心より深謝申し上げます。

旭川医科大学形成外科・林利彦教授、国家公務員共済組合連合会斗南病院形成外科・村尾尚規先生、北海道大学大学院医学研究院 形成外科学教室・大澤昌之講師ならびに医員の皆様には、リサーチカンファレンス“Monthly discussion : Research project”において定期的に御助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究期間中に北海道大学大学院医学研究院 形成外科学教室に在籍された福島県立医科大学医学部形成外科学講座・小山明彦教授ならびに愛知医科大学形成外科・古川洋志教授には、研究方法ならびに結果の解釈等について幅広く御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

統計解析において御指導、御協力をいただいた北海道大学病院医療・ヘルスサイエンス研究開発機構・高木諒特任助教に深く感謝申し上げます。

本研究の全般において温かい御支援をいただいた北海道大学大学院医学研究院 形成外科学教室・澤口恵美学術研究秘書ならびに早瀬さやか教室秘書に感謝申し上げます。

動物実験において施設の管理やマウスの飼育を行っていただいた北海道大学大学院医学研究院 附属動物実験施設・土佐紀子助教ならびにスタッフの皆様

最後に、これまで北海道大学大学院医学研究院 形成外科学教室において研究に携わってこられた全ての皆様の尽力の結果である研究環境ならびに研究成果のおかげで本研究を遂行しえました。ここに心より感謝の意を表します。

(順不同)

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

- Akita, S., Mitsukawa, N., Kuriyama, M., Kubota, Y., Hasegawa, M., Tokumoto, H., Ishigaki, T., Togawa, T., Kuyama, J., and Satoh, K. (2015). Comparison of vascularized supraclavicular lymph node transfer and lymphaticovenular anastomosis for advanced stage lower extremity lymphedema. *Ann Plast Surg* 74, 573-579.
- Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T.V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946-953.
- Alitalo, K. (2011). The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 17, 1371-1380.
- Aschen, S.Z., Farias-Eisner, G., Cuzzone, D.A., Albano, N.J., Ghanta, S., Weitman, E.S., Ortega, S., and Mehrara, B.J. (2014). Lymph node transplantation results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plast Reconstr Surg* 133, 301-310.
- Azhar, S.H., Lim, H.Y., Tan, B.K., and Angeli, V. (2020). The Unresolved Pathophysiology of Lymphedema. *Front Physiol* 11, 137.
- Baumeister, R.G., Seifert, J., and Hahn, D. (1981). Autotransplantation of lymphatic vessels. *Lancet* 1, 147.
- Becker, C., Assouad, J., Riquet, M., and Hidden, G. (2006). Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 243, 313-315.
- Biswas, B., Dabkara, D., and Ganguly, S. (2017). In-transit metastases from malignant melanoma. *Natl Med J India* 30, 297.
- Blum, K.S., Proulx, S.T., Luciani, P., Leroux, J.C., and Detmar, M. (2013). Dynamics of lymphatic regeneration and flow patterns after lymph node dissection. *Breast Cancer Res Treat* 139, 81-86.
- Brown, M., Assen, F.P., Leithner, A., Abe, J., Schachner, H., Asfour, G., Bago-Horvath, Z., Stein, J.V., Uhrin, P., Sixt, M., *et al.* (2018). Lymph node blood vessels provide exit routes for metastatic tumor cell dissemination in mice. *Science* 359, 1408-1411.
- Chandrasekaran, S., and King, M.R. (2014). Microenvironment of tumor-draining lymph nodes: opportunities for liposome-based targeted therapy. *Int J Mol Sci* 15, 20209-20239.
- Chen, H.C., O'Brien, B.M., Rogers, I.W., Pribaz, J.J., and Eaton, C.J. (1990). Lymph

- node transfer for the treatment of obstructive lymphoedema in the canine model. *Br J Plast Surg* *43*, 578-586.
- Cheng, M.H., Chen, S.C., Henry, S.L., Tan, B.K., Lin, M.C., and Huang, J.J. (2013). Vascularized groin lymph node flap transfer for postmastectomy upper limb lymphedema: flap anatomy, recipient sites, and outcomes. *Plast Reconstr Surg* *131*, 1286-1298.
- Cheng, M.H., Huang, J.J., Wu, C.W., Yang, C.Y., Lin, C.Y., Henry, S.L., and Kolios, L. (2014). The mechanism of vascularized lymph node transfer for lymphedema: natural lymphaticovenous drainage. *Plast Reconstr Surg* *133*, 192e-198e.
- Cochran, A.J., Morton, D.L., Stern, S., Lana, A.M., Essner, R., and Wen, D.R. (2001). Sentinel lymph nodes show profound downregulation of antigen-presenting cells of the paracortex: implications for tumor biology and treatment. *Mod Pathol* *14*, 604-608.
- Cochran, A.J., Huang, R.R., Lee, J., Itakura, E., Leong, S.P., and Essner, R. (2006). Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol* *6*, 659-670.
- Dadras, S.S., Paul, T., Bertoncini, J., Brown, L.F., Muzikansky, A., Jackson, D.G., Ellwanger, U., Garbe, C., Mihm, M.C., and Detmar, M. (2003). Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* *162*, 1951-1960.
- Girard, J.P., Moussion, C., and Forster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* *12*, 762-773.
- Gould, D.J., Mehrara, B.J., Neligan, P., Cheng, M.H., and Patel, K.M. (2018). Lymph node transplantation for the treatment of lymphedema. *J Surg Oncol* *118*, 736-742.
- Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). 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.
- Hassani, C., Tran, K., Palmer, S.L., and Patel, K.M. (2020). Vascularized Lymph Node Transfer: A Primer for the Radiologist. *Radiographics* *40*, 1073-1089.
- Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiyama, K., Brown, L.F., and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* *201*, 1089-1099.
- Hirakawa, S., Brown, L.F., Kodama, S., Paavonen, K., Alitalo, K., and Detmar, M. (2007). VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes

- tumor metastasis to distant sites. *Blood* 109, 1010-1017.
- Honkonen, K.M., Visuri, M.T., Tervala, T.V., Halonen, P.J., Koivisto, M., Lahtenvuo, M.T., Alitalo, K.K., Yla-Herttuala, S., and Saaristo, A.M. (2013). Lymph node transfer and perinodal lymphatic growth factor treatment for lymphedema. *Ann Surg* 257, 961-967.
- Ishikawa, K., Sasaki, S., Furukawa, H., Nagao, M., Iwasaki, D., Saito, N., and Yamamoto, Y. (2013). Preliminary experience with intraoperative near-infrared fluorescence imaging in percutaneous sclerotherapy of soft-tissue venous malformations. *Dermatol Surg* 39, 907-912.
- Ishikawa, K., Maeda, T., Funayama, E., Hayashi, T., Murao, N., Osawa, M., Furukawa, H., Oyama, A., and Yamamoto, Y. (2019a). Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: A preliminary study. *Microsurgery* 39, 247-254.
- Ishikawa, K., Funayama, E., Maeda, T., Hayashi, T., Murao, N., Osawa, M., Ito, R., Furukawa, H., Oyama, A., and Yamamoto, Y. (2019b). Changes in high endothelial venules in lymph nodes after vascularized and nonvascularized lymph node transfer in a murine autograft model. *J Surg Oncol* 119, 700-707.
- Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 4, 733-739.
- Ito, R., and Suami, H. (2014). Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plast Reconstr Surg* 134, 548-556.
- Kasprzak, A., Surdacka, A., Tomczak, M., and Konkol, M. (2013). Role of high endothelial postcapillary venules and selected adhesion molecules in periodontal diseases: a review. *J Periodontol Res* 48, 1-21.
- Kawashima, Y., Sugimura, M., Hwang, Y.C., and Kudo, N. (1964). The lymph system in mice. *Jap J Vet Res* 12, 69-78.
- Kim, M., Kim, S.W., Lee, S.U., Lee, N.K., Jung, S.Y., Kim, T.H., Lee, E.S., Kang, H.S., and Shin, K.H. (2013). A model to estimate the risk of breast cancer-related lymphedema: combinations of treatment-related factors of the number of dissected axillary nodes, adjuvant chemotherapy, and radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 86, 498-503.
- Kimura, T., Sugaya, M., Oka, T., Blauvelt, A., Okochi, H., and Sato, S. (2015). Lymphatic dysfunction attenuates tumor immunity through impaired antigen presentation. *Oncotarget* 6, 18081-18093.
- Kwon, S., Agollah, G.D., Wu, G., and Sevick-Muraca, E.M. (2014). Spatio-temporal

- changes of lymphatic contractility and drainage patterns following lymphadenectomy in mice. *PloS one* 9, e106034.
- Lahtenvuo, M., Honkonen, K., Tervala, T., Tammela, T., Suominen, E., Lahtenvuo, J., Kholova, I., Alitalo, K., Yla-Herttuala, S., and Saaristo, A. (2011). Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Circulation* 123, 613-620.
- Leong, S.P., Nakakura, E.K., Pollock, R., Choti, M.A., Morton, D.L., Henner, W.D., Lal, A., Pillai, R., Clark, O.H., and Cady, B. (2011). Unique patterns of metastases in common and rare types of malignancy. *J Surg Oncol* 103, 607-614.
- Maeda, T., Hayashi, T., Furukawa, H., Iwasaki, D., Ishikawa, K., Funayama, E., Murao, N., Osawa, M., Oyama, A., and Yamamoto, Y. (2018). Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. *Int J Cancer* 143, 1224-1235.
- Marshall, M.V., Rasmussen, J.C., Tan, I.C., Aldrich, M.B., Adams, K.E., Wang, X., Fife, C.E., Maus, E.A., Smith, L.A., and Sevick-Muraca, E.M. (2010). Near-infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update. *Open Surg Oncol J* 2, 12-25.
- Matsuno, K., Ueta, H., Shu, Z., Xue-Dong, X., Sawanobori, Y., Kitazawa, Y., Bin, Y., Yamashita, M., and Shi, C. (2010). The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Arch Histol Cytol* 73, 1-21.
- Miranda Garces, M., Mirapeix, R., Pons, G., Sadri, A., and Masia, J. (2016). A comprehensive review of the natural lymphaticovenous communications and their role in lymphedema surgery. *J Surg Oncol* 113, 374-380.
- Miranda Garces, M., Pons, G., Mirapeix, R., and Masia, J. (2017). Intratissue lymphovenous communications in the mechanism of action of vascularized lymph node transfer. *J Surg Oncol* 115, 27-31.
- Miteva, D.O., Rutkowski, J.M., Dixon, J.B., Kilarski, W., Shields, J.D., and Swartz, M.A. (2010). Transmural flow modulates cell and fluid transport functions of lymphatic endothelium. *Circ Res* 106, 920-931.
- Morton, D.L., Hoon, D.S., Cochran, A.J., Turner, R.R., Essner, R., Takeuchi, H., Wanek, L.A., Glass, E., Foshag, L.J., Hsueh, E.C., *et al.* (2003). Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: therapeutic utility and implications of nodal microanatomy and molecular staging for improving the accuracy of detection of nodal micrometastases. *Ann Surg* 238, 538-549; discussion 549-550.
- Murdaca, G., Cagnati, P., Gulli, R., Spano, F., Puppo, F., Campisi, C., and Boccardo, F.

- (2012). Current views on diagnostic approach and treatment of lymphedema. *Am J Med* 125, 134-140.
- Nguyen, A.T., Suami, H., Hanasono, M.M., Womack, V.A., Wong, F.C., and Chang, E.I. (2017). Long-term outcomes of the minimally invasive free vascularized omental lymphatic flap for the treatment of lymphedema. *J Surg Oncol* 115, 84-89.
- O'Melia, M.J., Lund, A.W., and Thomas, S.N. (2019). The Biophysics of Lymphatic Transport: Engineering Tools and Immunological Consequences. *iScience* 22, 28-43.
- Oashi, K., Furukawa, H., Nishihara, H., Ozaki, M., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Kuge, Y., and Yamamoto, Y. (2013). Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. *J Invest Dermatol* 133, 537-544.
- Oliveira Gda, P., Girao, R.J., Soares, C.T., and Mello Junior, E.J. (2012). Multiple metastatic basal cell carcinoma with concurrent metastatic pleomorphic sarcoma in chronic lymphedema area--case report. *An Bras Dermatol* 87, 899-902.
- Podgrabska, S., Kamalu, O., Mayer, L., Shimaoka, M., Snoeck, H., Randolph, G.J., and Skobe, M. (2009). Inflamed lymphatic endothelium suppresses dendritic cell maturation and function via Mac-1/ICAM-1-dependent mechanism. *J Immunol* 183, 1767-1779.
- Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5, 617-628.
- Rockson, S.G. (2018). Lymphedema after Breast Cancer Treatment. *N Engl J Med* 379, 1937-1944.
- Rofstad, E.K., Tunheim, S.H., Mathiesen, B., Graff, B.A., Halsor, E.F., Nilsen, K., and Galappathi, K. (2002). Pulmonary and lymph node metastasis is associated with primary tumor interstitial fluid pressure in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 62, 661-664.
- Rosen, S.D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22, 129-156.
- Ruocco, V., Schwartz, R.A., and Ruocco, E. (2002). Lymphedema: an immunologically vulnerable site for development of neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 47, 124-127.
- Saaristo, A.M., Niemi, T.S., Viitanen, T.P., Tervala, T.V., Hartiala, P., and Suominen, E.A. (2012). Microvascular breast reconstruction and lymph node transfer for postmastectomy lymphedema patients. *Ann Surg* 255, 468-473.

- Saito, Y., Nakagami, H., Kaneda, Y., and Morishita, R. (2013). Lymphedema and therapeutic lymphangiogenesis. *Biomed Res Int* 2013, 804675.
- Schiffman, S., and Berger, A. (2007). Stewart-Treves syndrome. *J Am Coll Surg* 204, 328.
- Shesol, B.F., Nakashima, R., Alavi, A., and Hamilton, R.W. (1979). Successful lymph node transplantation in rats, with restoration of lymphatic function. *Plast Reconstr Surg* 63, 817-823.
- Stacker, S.A., Williams, S.P., Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S.B., and Achen, M.G. (2014). Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer* 14, 159-172.
- Takada, K., and Jameson, S.C. (2009). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 9, 823-832.
- Takeuchi, H., Kitajima, M., and Kitagawa, Y. (2008). Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Sci* 99, 441-450.
- Tammela, T., Saaristo, A., Holopainen, T., Lyytikka, J., Kotronen, A., Pitkonen, M., Abo-Ramadan, U., Yla-Herttuala, S., Petrova, T.V., and Alitalo, K. (2007). Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 13, 1458-1466.
- Tammela, T., Saaristo, A., Holopainen, T., Yla-Herttuala, S., Andersson, L.C., Virolainen, S., Immonen, I., and Alitalo, K. (2011). Photodynamic ablation of lymphatic vessels and intralymphatic cancer cells prevents metastasis. *Science translational medicine* 3, 69ra11.
- Teoh, D., Johnson, L.A., Hanke, T., McMichael, A.J., and Jackson, D.G. (2009). Blocking development of a CD8+ T cell response by targeting lymphatic recruitment of APC. *J Immunol* 182, 2425-2431.
- Tourani, S.S., Taylor, G.I., and Ashton, M.W. (2016). Vascularized Lymph Node Transfer: A Review of the Current Evidence. *Plast Reconstr Surg* 137, 985-993.
- Wolvers, D.A., Coenen-de Roo, C.J., Mebius, R.E., van der Cammen, M.J., Tirion, F., Miltenburg, A.M., and Kraal, G. (1999). Intranasally induced immunological tolerance is determined by characteristics of the draining lymph nodes: studies with OVA and human cartilage gp-39. *J Immunol* 162, 1994-1998.
- Zhu, Y., Zhao, T., Itasaka, S., Zeng, L., Yeom, C.J., Hirota, K., Suzuki, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Ou, G., *et al.* (2013). Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G1-S cell cycle transition in radioresistance

of perinecrotic tumor cells. *Oncogene* 32, 2058-2068.