

修士学位論文要約（平成29年3月）

間質液圧を用いたリンパ節転移早期診断法の開発

武田 航

指導教員：小玉 哲也

Development of diagnosis methods of lymph node metastasis in early stages.

Kazu TAKEDA

Supervisor: Tetsuya KODAMA

Malignant solid tumors generally have a higher interstitial fluid pressure (IFP) than normal tissues. The IFP of the primary tumor has been shown to be an independent prognostic factor. However, the characteristics of IFP in metastatic lymph nodes are still not understood. Recently, MXH-10/Mo/lpr/lpr (MXH-10) mice exhibiting remarkable and stable lymphadenopathy, with lymph nodes enlarged to about 10 mm in diameter, have been developed for easy observation of lymph nodes and measurement of intra-lymph node IFP in our laboratory. Here we show that tumor-bearing lymph nodes display an increased IFP compared to control lymph nodes. Tumor cells were injected into the subiliac lymph node to induce metastasis in the proper-axillary lymph node via the lymphatic vessels. IFP was measured in the subiliac and proper-axillary lymph nodes. Our results show that the IFP distribution in the lymph nodes evolves upon tumor growth, and may thus be used for diagnosis or to help clarify the mechanisms of lymphatic metastasis.

1. はじめに

がんは現代の死因の多くを占めており、がん患者の実に9割が転移によって死亡する¹。特に、リンパ節転移の有無は、全臓器への遠隔転移を引き起こすことから重要な予後因子であると考えられているにも関わらず、CTやPET、MRIといった既存のイメージングモダリティの検出感度は最大短径10 mm以下であるため、リンパ節内にある腫瘍を検出することはできない^{2,3}。そのため、リンパ節転移の早期診断をおこなうには新たな診断法の開発が必要であると考えられる。間質液圧(Interstitial fluid pressure: IFP)は腫瘍内またはその近傍において通常組織よりも高くなるのが固形腫瘍の場合において報告されている^{4,5}。本研究では恒常的にリンパ節腫脹を引き起こすMXH10/Mo/lpr/lpr マウスを用いて転移誘導を引き起こし、リンパ節内におけるIFPの測定、またIFPの変化によるリンパ流の流れの変化の解析をおこなった。

2. 実験方法

2. 1. リンパ節転移マウスモデル

本研究ではヒトのリンパ節と同等な大きさである短径10mmまでにリンパ節が腫脹するMXH10/Mo/lpr/lpr マウス(14~16週齢, n = 18)を用いた^{6,7}。MXH10/Mo/lpr/lpr マウスは腸骨下リンパ節(subiliac lymph node: SiLN)から内側腋窩リンパ節(proper axillary lymph node: PALN)へリンパ管がのびており、腫瘍細胞をSiLNへ生着させることでPALNへリンパ管を介してリンパ節転移を引き

起こすことができる⁷。

2. 2. 細胞培養

マウス由来線維芽細胞 KM-Luc/GFP Cell を使用した⁷。10% FBS (Thermo fisher scientific, MA, USA), L-Glutamine-P. S. Solution 1% (Sigma-Aldrich MO, USA) を含む DMEM (Sigma-Aldrich MO, USA) を培地として用いた。5% CO₂ 培養機内温度37°Cの条件で培養した。

4. リンパ節転移誘導

PBSにより 1.0×10^6 cells/ml希釈した細胞懸濁液をマトリゲル(Basement membrane matrix, Becton, Dickinson and Co. New Jersey, USA)によって再度希釈し、最終濃度を 3.3×10^5 cells/mlにした細胞溶液を用いた。インフルラン(Abbott Japan, Tokyo, Japan)2%麻酔下においたマウスのSiLNを高周波超音波画像診断装置によるガイド下でSiLNへ60 μ Lの細胞溶液を接種し、PALNへの転移を誘導した。実験スケジュールは接種日を0日目として3, 6日目に15 mg/mLに濃度調整したルシフェリン(Promega KK, Japan)をマウスの腹腔内に200 μ L注射し、10分後に生体発光イメージングシステムIVIS(Caliper Life Science, MA, USA)を用いてLuciferase活性を30秒間計測した。

2. 3. IFPの測定

生体発光の計測後、Fig 1に示すようにマウスを同様の麻酔下において開腹してSiLN, PALNの両リンパ節を露出させた。圧力トランスデューサーを接続した21 G ニードルの先端をリンパ節の中心に挿入してIFPの計測を5分間おこない、平均値を計測値とした。IFPの測定後、マウスは麻酔下

においたまま直ちに頸椎脱臼により安楽死させた。

3. 結果

3. 1 転移誘導の評価

Fig. 2 はルシフェラーゼ活性の継時的な変化を示す。両リンパ節においてルシフェラーゼ活性は継時的に増加しており、PALN への転移は 6 日目に認められ、ルシフェラーゼ活性は有意に増加していた。

3. 2. IFP の測定

Fig. 3 は両リンパ節内における IFP の疑似継時的な変化を表す。両リンパ節内で IFP は継時的に上昇しており、6 日目には転移先である PALN で有意な上昇を認めた。

3. 3. リンパ管の形状決定

Fig. 4 は蛍光粒子がリンパ管を流れる様子をとらえたものである。弁の側面では粒子が渦巻いている様子が確認された。

4. 考察

4. 1. リンパ節転移と IFP の変化の評価

ルシフェラーゼ活性、IFP はともに継時的に増加しており、PALN において転移が確認された 6 日目には IFP の上昇が同 PALN において有意的に上昇している。これらの結果はリンパ節内の IFP が腫瘍の転移に強く関係している可能性を強く示唆し、腫瘍そのものまたは種々の微小環境の変化が転移先リンパ節の IFP を高めているのであると考えられる。また、3 日目についても IFP は増加の傾向がみられることから前転移ニッチの影響としての IFP の上昇が示唆された⁸。

5. 結論

本実験においてリンパ節転移マウスモデルである MXH10/Mo/lpr/lpr を用いた転移誘導実験に際し、転移の進行とともに上流・下流の両リンパ節内で IFP の上昇が生じていることが明らかとなった。また、IFP の上昇がニッチ形成を促すことが示唆された。以上の結果は上昇する IFP の検出がリンパ節転移の早期診断に有効な手段であることを示している。

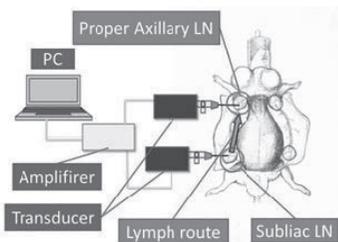


Fig.1 Schematic image of pressure measurement.

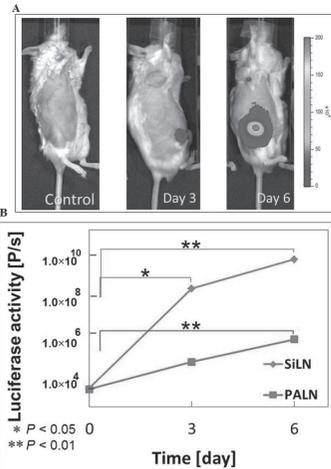


Fig.2 Temporal change in luciferase activity.

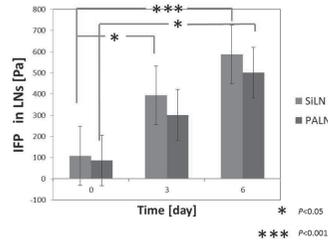


Fig.3 Temporal change in IFP in both lymph nodes.

参考文献

- (1) Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
- (2) Swartz, M. A. & Lund, A. W. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nature reviews. Cancer* 12, 210-219, doi:10.1038/nrc3186 (2012).
- (3) Nakamura, Y. et al. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *Journal of clinical pathology* 59, 77-82, doi:10.1136/jcp.2005.028779 (2006).
- (4) Boucher, Yves, Laurence T. Baxter, and Rakesh K. Jain., Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer research* 50.15: 4478-4484. (1990).
- (5) Lunt SJ, Fyles A, Hill RP and Milosevic M: Interstitial fluid pressure in tumors: therapeutic barrier and biomarker of angiogenesis. *Future Oncol.* 4:793–802. (2008).