

博士論文

腫瘍免疫におけるリンパ管の役割

—悪性黒色腫およびリンパ腫細胞における検討—

記村 貴之

目次

1) 要旨	4
2) 序文	5
3) 研究方法	10
1) 動物	
2) 細胞	
3) マウス皮膚での腫瘍形成	
4) 組織学的評価	
5) Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)	
6) Luciferase assay	
7) T cell hybridoma assay による腫瘍抗原 OVA の検出	
8) Mixed lymphocyte reaction	
9) Cytotoxicity assay	
1 0) Adoptive transfer	
1 1) 統計解析	
4) 結果	17

1) kCYC ^{+/-} マウスにおける B16 メラノーマの腫瘍形成の検討	
2) kCYC ^{+/-} マウスにおける EL-4 リンパ腫の腫瘍形成の検討	
3) 所属リンパ節の組織学的検討	
4) 所属リンパ節における腫瘍由来タンパクの検討	
5) MO4 由来抗原の抗原提示能の検討	
6) kCYC ^{+/-} マウスのリンパ球の細胞傷害活性の検討	
7) 腫瘍の大きさと細胞傷害活性の相関関係の検討	
8) adoptive transfer による腫瘍抑制の検討	
5) 考察	26
6) まとめ	31
7) 謝辞	32
8) 文献	33
9) 図表	44

1. 要旨

腫瘍免疫において、腫瘍抗原がリンパ流を介して所属リンパ節にたどりつくことは免疫の成立にとって重要なステップと考えられるが、マウスを用いた詳細な検討は行われていない。全身のリンパ灌流異常を有する $kCYC^{+/-}$ マウスを用いて腫瘍免疫の検討を行った。 $kCYC^{+/-}$ マウスの腹部に B16 メラノーマ細胞または EL-4 リンパ腫細胞を皮下注射したところ、野生型マウスに比較して腫瘍形成の促進がみられた。 $kCYC^{+/-}$ マウスでは所属リンパ節においてサイトカインの発現低下と流入腫瘍抗原および抗原提示の減少がみられた。また $kCYC^{+/-}$ マウス由来の $CD8^+$ T リンパ球は腫瘍細胞傷害活性が減弱していた。これによりリンパ節への腫瘍抗原の流入は腫瘍特異的な免疫応答に必須であると考えられた。

2. 序文

リンパ系は組織の間質液を血液循環に輸送する機能をもつ。リンパ管は末梢では盲端の毛細管として始まり、中枢では集合リンパ管を形成し、胸管を介して血液循環に繋がる。リンパ系は間質液のほかにタンパク質などの微小物質を輸送する機能も有する。組織におけるタンパク質は動脈の毛細血管から血管外に拡散し、多くはマクロファージによる変性を受けて静脈系の毛細血管あるいはリンパ管から再吸収される。ところがリンパ管の機能が障害されると間質のタンパク質濃度が高くなり、膠質浸透圧が高くなることで間質液の貯留に至ると考えられている¹。この状態はリンパ浮腫とよばれ、二次的な炎症や脂肪組織の肥厚、線維化が生じ、運動機能の障害を来たしうる。リンパ浮腫は先天的なリンパ系の奇形あるいは機能障害による原発性リンパ浮腫と、疾患あるいは医原的にリンパ管機能が障害される二次性リンパ浮腫に分類される。二次性リンパ浮腫の原因として世界的にはバンクロフト糸状虫などによるフィラリア症が最も多いとされ、9000 万人以上の罹患者がいると推定されている²。

一方、米国など先進国における二次性リンパ浮腫の原因は悪性腫瘍またはその治療によるものが多数を占める。乳癌、メラノーマ、婦人科系悪性腫瘍、リンパ腫、泌尿器科系悪性腫瘍を含む様々な悪性腫瘍の治療後にリンパ浮腫を来たすことが知られて

いるが、特に乳癌の術後あるいは放射線治療後の二次性リンパ浮腫は注目されており、上肢のリンパ浮腫の大多数を占める¹。リンパ浮腫患者では貯留した間質液に細菌感染を来とし、しばしば蜂窩織炎を繰り返す傾向がある。また慢性に経過したリンパ浮腫患者では罹患部位に脈管肉腫（Stewart-Treves 症候群）、カポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍を合併することもある³。これらの現象はリンパ管機能障害に伴った組織の免疫学的監視の減弱と関連している可能性がある。実際、リンパ系は樹状細胞などの抗原提示細胞やリンパ球をリンパ節に誘導することで、病原体や悪性腫瘍に対する免疫応答において重要な役割を果たしていると考えられている^{4,6}。輸入リンパ管を形成するリンパ管内皮細胞はケモカイン CCL21 (secondary lymphoid chemokine) や CCL27 を分泌することで、それぞれケモカイン受容体の CCR7 や CCR10 を発現している樹状細胞、T 細胞、B 細胞をリンパ管に誘導する^{7,8}。輸入リンパ管に吸収された抗原や抗原提示細胞はリンパ節に到達し、B 細胞やリンパ濾胞樹状細胞まで輸送される⁹。また近年の研究では、リンパ節に存在する間質細胞やリンパ管内皮細胞は、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞に対して cross presentation することにより末梢組織抗原に対する免疫寛容を誘導しうること¹⁰が報告されるなど、リンパ系の免疫応答に対する役割が徐々に明らかにされつつある。

メラノーマは皮膚、眼窩内組織、口腔粘膜上皮などに発生するメラノサイト

由来の悪性腫瘍である。顔面に発生するメラノーマは紫外線曝露、足底に発生するものは機械的刺激と関連性があると考えられている。メラノーマによる死亡数は増加の一途を辿っており、有色人種もその例外ではない¹¹。外科的切除が治療の原則であるが、進行期メラノーマに対する治療は困難であり、化学療法や放射線療法の効果も限定的である¹²。また様々な免疫療法が試みられているが、その有効率は未だ十分とは言えない。腫瘍関連抗原特異的な免疫の確立が困難であることの原因としては、単に腫瘍関連抗原が獲得免疫から保護されるという受動的なもののみではなく、腫瘍内微小環境において免疫寛容を誘導する能動的なプロセスが関与していることが想定されている¹³。実際、進行期の転移性メラノーマを有する患者においてメラノーマのエピトープに対する CD8⁺ T 細胞の免疫応答が減弱していることが明らかになっている^{14, 15}。

免疫系では、悪性腫瘍に対して抑制的に機能する細胞と促進的に機能する細胞が存在する¹⁶。腫瘍に対して抑制的に機能する免疫細胞は **natural killer (NK)** 細胞、樹状細胞、細胞傷害性 T 細胞が知られている。Al-Shibli らによると、腫瘍間質に浸潤した NK 細胞の密度は肺癌において良好な予後と関連する一方で、腫瘍内の NK 細胞浸潤では相関がみられなかった¹⁷。腫瘍に浸潤した樹状細胞が多いことが乳癌、非小細胞肺癌などいくつかの癌で良好な予後と相関したと報告されている^{18, 19}。またメラ

ノーマにおける解析では、**langerin** 陽性樹状細胞の浸潤数と腫瘍の厚さに逆相関がみられた²⁰。CD8⁺ T 細胞の腫瘍への浸潤が、非小細胞肺癌、直腸癌、食道癌など複数の悪性腫瘍で良好な予後に関連すると報告されており^{17, 21, 22}、この結論は **meta-analysis** でも支持されている²³。これに対して好中球、一部のマクロファージ、形質細胞様樹状細胞、**myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)**、制御性 T 細胞は腫瘍に対して促進的に機能することが知られている。好中球は様々なヒトの悪性腫瘍で浸潤していることが観察されるが、肺癌において **hepatocyte growth factor** 産生を介して腫瘍の増殖に関わる²⁴。肺腺癌、胃癌などで好中球の腫瘍への高度な浸潤は予後不良因子とされている^{25, 26}。また **M2** マクロファージは **matrix metalloproteinase 9** や血管新生に関わる増殖因子、免疫抑制性のサイトカイン分泌を介して腫瘍の増殖や転移に関わることが知られている^{18, 27-30}。悪性腫瘍に対する免疫応答は、上記のような様々な免疫細胞が腫瘍細胞と複雑な相互作用を起こした結果として生じ、腫瘍促進的な細胞が優勢であれば腫瘍が増大し、腫瘍抑制的な細胞の影響が強ければ腫瘍が縮小すると考えられている。

多くの悪性腫瘍において所属リンパ節に最初に転移したのち、全身に浸潤することは広く知られているが、腫瘍の増殖・転移に局所のリンパ管新生が関与することが近年知られるようになった。乳癌細胞において **vascular endothelial growth factor**

(VEGF)-C あるいは VEGF-D を過剰発現させると腫瘍内リンパ管新生が促進され、その結果所属リンパ節や肺への転移が増加することが報告されている³¹⁻³³。乳癌において浸潤性の細胞株と非浸潤性の細胞株を比較した研究では、浸潤性の細胞においてリンパ管形成とリンパ節転移が相関する可能性が示唆された³⁴。しかしながら、リンパ管およびリンパ流が腫瘍免疫にどのような影響を及ぼしているかについて、マウスを用いて直接検討している研究はほとんどない。共同研究者の菅谷らはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの遺伝子である *k-cyclin*^{35, 36} を vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) のプロモーターの下流に挿入してトランスジェニックマウスを作成した。この *k-cyclin* トランスジェニックマウスは全身のリンパ管の機能障害と皮膚の浮腫、乳糜胸水を呈する³⁷。組織学的に、肺のリンパ管においてリンパ球の著明な浸潤がみられたほか、肺・皮膚のリンパ管内皮細胞の一部に核の腫大が観察された。しかし、リンパ節や胸腺、脾臓を含めたそれ以外の全身の諸臓器については、肉眼的および病理組織学的に明らかな発達の異常はみられず、構造的な差異はみられなかった³⁷。本研究では、リンパ灌流が障害された *k-cyclin* トランスジェニックマウスに対して腫瘍を接種することで、リンパのダイナミックな動きが腫瘍に対する免疫応答にどのような役割を果たしているのか解析することにした。

3. 研究方法

1) 動物

C57BL/6マウスは日本SLC (Hamamatsu, Japan) より購入した。FVB/NマウスはClea Japan, Inc. (Tokyo, Japan) より購入した。*k-cyclin* トランスジェニックマウスはFVB/N マウスのVEGFR3のプロモーター領域にKaposi肉腫関連ヘルペスウイルス由来の遺伝子*k-cyclin*を導入して作成された³⁷。C57BL/6マウス由来の腫瘍細胞が拒絶されないよう*k-cyclin*トランスジェニックマウスをC57BL/6マウスと交配させ、*k-cyclin*^{+/-}のF1マウス（以降、kCYC^{+/-}と称す）を作成して実験に使用した。コントロールにはkCYC^{+/-}マウスの同腹のkCYC^{-/-}マウス（以降、野生型マウスと称す）を使用した。研究に用いたマウスはすべて7～15週齢であり、12時間の明暗サイクル、水と餌を自由に摂取できる環境にて飼育した。全ての実験プロトコールは東京大学の動物実験委員会の承認を受けた。kCYC^{+/-}マウスは以下のprimerを用いてgenotypingを行った。forward: 5'-CTT CTG GAT CCC ACG CTA TG-3', reverse: 5'-TCT GTT CGC CAC GCC AAC TT-3'。

2) 細胞

C57BL/6 マウス由来の B16/F1 メラノーマ細胞 (以下 B16 メラノーマ細胞と称する)³⁸を用い、Luciferase cDNA を retrovirus により導入されたものを実験に供した。

B16 メラノーマ細胞、EL-4 リンパ腫細胞は Dr. Sam T. Hwang (Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI)より供与された。MO4 メラノーマ細胞は B16 メラノーマ細胞に pAc-neo-OVA plasmid を用いて OVA を導入して作成された³⁹。MO4 メラノーマ細胞および、OVA を認識する T cell hybridoma である RF33.70⁴⁰ は Dr. K. Lock (University of Massachusetts Medical Center, Boston, MA) より供与された。B16 メラノーマ細胞と EL-4 リンパ腫細胞は 10% FBS, penicillin G sodium, streptomycin sulphate, amphotericin B を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いて CO2 インキュベーターで 37°C で培養した。MO4 メラノーマ細胞は 10% FBS と G418 sulphate (Calbiochem, San Diego, USA)を含む RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) を用いて培養した。細胞は週に 2 回の間隔で trypsin 処理し、継代した。

3) マウス皮膚での腫瘍形成

B16 メラノーマ細胞 5×10^5 を $100 \mu\text{l}$ の phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁し、吸入麻酔をかけた野生型マウスおよび $\text{kCYC}^{+/+}$ マウスの剃毛した左下腹部に皮下注射した。2 週間経時的に大きさを測定した。腫瘍の長径と短径を計測し、体積を $V = \pi(\text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径})/6$ で算出した。

4) 組織学的評価

B16 メラノーマ細胞を接種して 14 日後に野生型マウスおよび $\text{kCYC}^{+/+}$ マウスから所属リンパ節である左鼠径リンパ節を採取した。組織を 3.5%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋したのちヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

5) Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

B16 メラノーマ細胞を接種して 14 日後に左鼠径リンパ節を採取してホモジナイズしたのち、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出した。iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて逆転写反応を行い、cDNA にした。IL-18 のプライマーは Applied Biosystems から購入した。IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β 1、IL-2、IL-10、tyrosinase-related protein 1 (TRP1) のプライマーは Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) にてデザインした。プラ

イマーの配列を表 1 に示した。Quantitative RT-PCR は合成した cDNA に Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を加え、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて以下の条件で行った； 50℃2 分を 1 サイクル、95℃10 分間を 1 サイクル、92℃ 15 秒間を 40 サイクル、60℃1 分を 40 サイクル。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて mRNA を標準化した。GAPDH の PCR 産物と比較して、ターゲットとなる PCR 産物の相対発現量を $\Delta\Delta C_T$ method にて算出した。つまり、RNA 発現の相対値は $2^{-\Delta\Delta C_T}$ と定義され、ここで C_T は threshold cycle, つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。 $\Delta\Delta C_T = [\text{ターゲットとなる遺伝子の } C_T (\text{発現量不明のサンプル}) - \text{GAPDH の } C_T (\text{発現量不明のサンプル})] - [\text{ターゲットとなる遺伝子の } C_T (\text{キャリブレータのサンプル}) - \text{GAPDH の } C_T (\text{キャリブレータサンプル})]$ 。野生型マウスにおけるサイトカイン mRNA 発現量をキャリブレータとして使用した。それぞれのサンプルは triplicate で反応させ、平均の C_T を解析に使用した。

6) Luciferase assay

B16 メラノーマ細胞を接種して 14 日後にマウスからリンパ節と脾臓を採取した。採取した臓器は剪刀で切り刻み、Glo lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)で処

理した。遠心分離して上清を回収し、Luciferase Assay System (Promega) を用いて luciferase の活性を評価した。上清を luciferase assay reagent と混合し、蛍光の相対値を manual luminometer (Luminescencer-PSN, ATTO, Tokyo, Japan)で計測した。

7) T cell hybridoma assay による腫瘍抗原 OVA の検出

OVA を発現する MO4 メラノーマ細胞を野生型マウスおよびkCYC^{+/+}マウスに接種して 14 日後に所属リンパ節と脾臓を採取した。それぞれ細胞懸濁液を作成し、CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec, CA, USA)を用いて CD11c⁺樹状細胞を分離した。CD11c⁺樹状細胞 (2×10^4 個) を、OVA 特異的に IL-2 を産生する T cell hybridoma RF33.70 (4×10^5 個) と 96 ウェルプレートで 24 時間共培養した。Total RNA を TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 処理して抽出し、iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad)で逆転写反応を行い cDNA を作成した。IL-2 の RNA 発現を前掲の quantitative RT-PCR で評価した。

8) Mixed lymphocyte reaction

野生型 FVB/N マウスおよび k-cyclin トランスジェニックマウス(FVB/N)より両腋窩・両鼠径リンパ節を採取し、細胞懸濁液としてから CD8a⁺ T cell Isolation Kit II

(Miltenyi Biotec)を用いて CD8⁺ T 細胞を回収した。C57BL/6 マウスより両腋窩・両鼠径リンパ節を採取し、細胞懸濁液としてから CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec)を用いて CD11c⁺樹状細胞を回収した。野生型 FVB/N マウスまたは k-cyclin トランスジェニックマウス (FVB/N) 由来の CD8⁺ T 細胞 (3×10^4 個) と C57BL/6 マウス由来の CD11c⁺樹状細胞 (3×10^4 個) を 96 ウェルプレートで 24 時間共培養した。CD8⁺ T 細胞の増殖を Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche Applied Science)を用いて評価した。

9) Cytotoxicity assay

マウスリンパ球の腫瘍細胞傷害活性の測定するために、LIVE/DEAD cell-mediated cytotoxicity kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いて cytotoxicity assay を行った。B16 メラノーマ細胞を標的細胞として用いた。B16 メラノーマ細胞 5×10^5 個を野生型マウスおよび kCYC^{+/+}マウスの腹部に皮下注射し、14 日後に所属リンパ節と脾臓を採取した。これらから細胞懸濁液を作成し、effector cell とした。一部の実験ではこれらの細胞から CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を用いて CD8⁺ T 細胞を分離して effector cell とした。target cell である B16 メラノーマ細胞を DiOC₁₈ で 37°C で 20 分間染色後、effector : target (E:T) 比が 20:1, 10:1, 5:1 となるように混合し、これらを死細胞を区別するための propidium iodide と混ぜ合わせて、37°C で 2

時間培養した。マウスリンパ球の細胞傷害活性を評価するため、標的細胞のうちの死細胞の割合を BD FACSVerse (BD Biosciences) にて解析した。

10) Adoptive transfer

CD8⁺ T 細胞のドナーとして、野生型マウスおよび kCYC^{+/-}マウスに B16 メラノーマ細胞 5×10^5 個を皮下注射した。腫瘍接種の 14 日後に所属リンパ節を採取し、CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を用いて CD8⁺ T 細胞を分離した。各ドナーマウスから CD8⁺ T 細胞 (5×10^5 個) を C57BL/6 マウスに静注した。陰性コントロールとして同量の PBS を C57BL/6 マウスに静注したものを用いた。静注して 1 日後に 5×10^5 個の B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、大きさを経時的に測定した。

11) 統計解析

データは平均値+SEM を用いて表した。2 群間の比較にはマン・ホイットニーの U 検定またはカイ二乗検定を用いた。2 群間の相関関係の解析にはスピアマンの順位相関係数を用いた。P 値が 0.05 未満となるものを統計的に有意とみなした。

4. 結果

1) kCYC^{+/-}マウスにおける B16 メラノーマの腫瘍形成の検討

リンパ灌流障害が腫瘍免疫に関与するかどうかを検討するために、野生型マウス、kCYC^{+/-}マウスを用いて腫瘍接種の実験を行った。マウスの下腹部に B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、3, 7, 10, 14 日後に腫瘍の大きさを測定した。野生型マウスと kCYC^{+/-}マウスの腫瘍の大きさはそれぞれ、3 日後では $5.9 \pm 1.2 \text{ mm}^3$, $4.9 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ と有意差はみられなかったが、7 日後では $31.2 \pm 8.2 \text{ mm}^3$, $67.2 \pm 13.9 \text{ mm}^3$, 10 日後では $86.0 \pm 22.2 \text{ mm}^3$, $255.0 \pm 72.33 \text{ mm}^3$, 14 日後では $331.6 \pm 106.1 \text{ mm}^3$, $866.6 \pm 243.0 \text{ mm}^3$ と 7 日後以降では kCYC^{+/-}マウスにおいて腫瘍が有意に増大していた (図 1 a, b)。

メラノーマを含む様々な癌において、所属リンパ節（センチネルリンパ節）に転移を来たすことが癌の進展の最初のステップと考えられている⁴¹。このリンパ節は腫瘍抗原が最初に流入するリンパ節でもあり、腫瘍に対する免疫応答にも関わると考えられる。そこで腫瘍接種部の所属リンパ節におけるサイトカインの発現を検討するために、野生型マウス、kCYC^{+/-}マウスに対して下腹部に B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、14 日後に所属リンパ節である鼠径リンパ節を回収し、サイトカインの RNA 発現を quantitative RT-PCR を用いて評価した。所属リンパ節における IFN- γ , TNF- α ,

IL-2, IL-18, IL-10, TGF- β 1 の発現は野生型マウスと比較して kCYC^{+/-}マウスでは有意に減弱していた（図 2）。

このように、リンパ灌流障害を有する kCYC^{+/-}マウスにおいては、皮下に接種した腫瘍が増大しているだけでなく、所属リンパ節においてサイトカインの産生が減弱していた。このことから、リンパ流障害があることによって腫瘍に対する免疫が低下している可能性が示唆された。

2) kCYC^{+/-}マウスにおける EL-4 リンパ腫の腫瘍形成の検討

前述したリンパ流障害マウスにおける腫瘍の増大という現象が、他の腫瘍でもみられるかを確認するために、野生型マウス、kCYC^{+/-}マウスを用いてリンパ腫細胞の接種の実験を行った。マウスの下腹部に EL-4 リンパ腫細胞を皮下注射し、3, 7, 10, 14 日後に腫瘍の大きさを測定した。野生型マウスと kCYC^{+/-}マウスの腫瘍の大きさは、3 日後では肉眼的な腫瘍形成は確認できず、7 日後では $135.2 \pm 21.3 \text{ mm}^3$, $308.9 \pm 267.0 \text{ mm}^3$, 10 日後では $257.9 \pm 78.6 \text{ mm}^3$, $678.6 \pm 377.0 \text{ mm}^3$ と 2 群間に有意差はみられなかった。ところが 14 日後では $121.4 \pm 59.1 \text{ mm}^3$, $1561.9 \pm 323.1 \text{ mm}^3$ と kCYC^{+/-}マウスにおいて腫瘍が有意に大きかった（図 3）。B16 メラノーマと同様に、リンパ流障害マウスにおいて腫瘍が増大する傾向が示唆された。

B16 メラノーマの実験と同様に腫瘍接種後の所属リンパ節におけるサイトカインの発現を検討するために、野生型マウス、 $kCYC^{+/-}$ マウスに対して下腹部に EL-4 リンパ腫細胞を皮下注射し、14 日後に所属リンパ節である鼠径リンパ節を回収し、サイトカインの RNA 発現を quantitative RT-PCR を用いて評価した。所属リンパ節における $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-2, IL-18, IL-10 の発現は野生型マウスと比較して $kCYC^{+/-}$ マウスでは有意に減弱していた（図 2）。 $TGF-\beta 1$ の発現は 2 群間で差がみられなかった。

以上より、リンパ灌流障害を有する $kCYC^{+/-}$ マウスにおいて、皮下に接種した 2 系統の異なる腫瘍を接種した場合に、野生型マウスと比較して腫瘍が増大した。リンパ流の障害は、腫瘍細胞の種類に関わらず、腫瘍免疫を低下させると考えられた。

3) 所属リンパ節の組織学的検討

B16 メラノーマ細胞を皮下注射して 14 日後に所属リンパ節を回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、腫瘍の転移について評価した。野生型マウスではリンパ濾胞構造が保たれているのに対し、 $kCYC^{+/-}$ マウスでは不整な核をもつ大型の細胞がリンパ節に浸潤しており、B16 メラノーマの転移と考えられた（図 5a）。組織学的に所属リンパ節転移が確認されたマウスの割合を算出すると、 $kCYC^{+/-}$ マウスでは野生型マウスと比較して有意にリンパ節転移が少ないという結果が得られた（図 5b）。リ

リンパ灌流の障害によってリンパ節に腫瘍細胞が到達する可能性が低くなるため、リンパ節転移が少ないことが示唆された。

4) 所属リンパ節における腫瘍由来タンパクの検討

腫瘍を接種後の $kCYC^{+/-}$ マウスの所属リンパ節において腫瘍由来のタンパクあるいは RNA がどの程度発現しているかを定量するために、メラノーマを含むメラノサイト系細胞に特異的に発現している TRP1 の発現を quantitative RT-PCR を用いて評価した⁴²。前述のサイトカインの評価と同様に野生型マウス、 $kCYC^{+/-}$ マウスの下腹部に B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、14 日後に所属リンパ節を回収し、RNA を抽出した。 $kCYC^{+/-}$ マウスの所属リンパ節における TRP1 の mRNA の発現は、野生型マウスと比較して有意に低下していた（図 6a）。所属リンパ節に浸潤した B16 メラノーマ細胞が $kCYC^{+/-}$ マウスでは少ないことが示唆され、図 5 の組織学的検討と矛盾しない結果が得られた。

次に、より腫瘍細胞特異的なタンパク質を用いて定量化するために、luciferase 遺伝子を導入したメラノーマ細胞を用いた。本実験で使用した B16 メラノーマ細胞には luciferase が組み込まれているが、正常な組織の細胞は luciferase 活性を有しないため、luciferase の活性は B16 メラノーマの抗原量を反映すると考えられる。Luciferase

活性を計測したところ、 $kCYC^{+/+}$ マウスの所属リンパ節においては野生型マウスと比較して活性が低いという結果が得られた（図 6b）。これは組織学的検討および TRP1 発現による検討と矛盾しない結果と考えられた。リンパ流が障害されていると、接種された腫瘍が局所で増大すると同時に、所属リンパ節へは抗原として運ばれないことが示唆された。所属リンパ節に抗原が流入しないことと腫瘍の増大との関係を検討するため、腫瘍の大きさと所属リンパ節における luciferase 活性の相関について検討したところ、接種して 14 日後の腫瘍の大きさと所属リンパ節における luciferase 活性は負の相関があることがわかった（図 6c）。この結果から所属リンパ節に腫瘍抗原がより多く流入すると腫瘍特異的な免疫応答が惹起され、腫瘍の成長が抑制される可能性が示唆された。

5) MO4 由来抗原の抗原提示能の検討

次に所属リンパ節および脾臓における腫瘍抗原の提示を評価した。OVA を発現する B16 メラノーマである MO4 細胞を野生型および $kCYC^{+/+}$ マウスに接種し、14 日後に所属リンパ節および脾臓から $CD11c^{+}$ 樹状細胞を回収した。MO4 を接種して 14 日後の腫瘍の大きさを計測したところ、 $kCYC^{+/+}$ マウスで有意に腫瘍は増大しており（図 7a）、B16 細胞、EL-4 細胞接種の実験と同様の結果が得られた。OVA を認識して活性化し、

IL-2 を産生する T cell hybridoma の RF33.70 を、回収した樹状細胞と共培養して quantitative RT-PCR で IL-2 の産生を評価した。所属リンパ節、脾臓のいずれの樹状細胞においても、腫瘍接種していない陰性コントロールと比較して野生型マウスでは IL-2 の発現は増加がみられた（図 7b）。その一方で、**kCYC**^{+/-}マウスでは IL-2 の発現は野生型マウスより減弱しており、腫瘍を注射していないコントロールと同程度であった（図 7b）。以上より、**kCYC**^{+/-}マウスの所属リンパ節および脾臓の樹状細胞においては、腫瘍由来抗原の提示が減弱していることが示唆された。

6) **kCYC**^{+/-}マウスのリンパ球の細胞傷害活性の検討

上記の実験で所属リンパ節に流入する腫瘍抗原または腫瘍細胞が **kCYC**^{+/-}マウスでは減少するとともに、樹状細胞の抗原提示が低下していることが明らかになった。次にリンパ球の腫瘍に対する細胞傷害活性を測定するために、B16 メラノーマ細胞を標的として cytotoxicity assay を行った。まずもともとの細胞傷害性 T 細胞の反応性に差がないことを確認するために、FVB/N バックグラウンドの *k-cyclin* トランスジェニックマウスと C57BL/6 マウス由来の野生型マウスで mixed leukocyte reaction を行った。野生型 FVB/N マウス、*k-cyclin* トランスジェニックマウス (FVB/N バックグラウンド) のリンパ節から CD8⁺ T 細胞を回収し、野生型 C57BL/6 マウスのリンパ節から

CD11c⁺樹状細胞を回収し、それぞれを共培養して細胞増殖能を評価した（図 8）。

k-cyclin トランスジェニックマウスと野生型マウスで細胞増殖に有意差はみられなかった。

B16 メラノーマ細胞を野生型マウスおよび *kCYC*^{+/-}マウスに皮下注射し、14 日後に所属リンパ節および脾臓を摘出し、細胞を採取した。effector cell であるリンパ節および脾臓の細胞を、target cell である B16 メラノーマ細胞と effector : target 比が 20:1, 10:1, 5:1 となるように共培養した。リンパ球の細胞傷害活性を、target cell のうちの死細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析したところ、野生型マウスと *kCYC*^{+/-}マウスの間において、細胞障害活性に有意な差はみられなかった（図 9a）。次に、非特異的な免疫応答の影響を除くために、腫瘍接種後に回収したリンパ節および脾細胞から CD8⁺ T 細胞を分離して B16 メラノーマ細胞と培養を行い、同様の方法で細胞傷害活性を評価した（図 9b）。野生型マウスのリンパ節由来の CD8⁺ T 細胞では effector cell が増加するにつれて細胞傷害活性が増強されたのに対して、*kCYC*^{+/-}マウスのリンパ節由来の CD8⁺ T 細胞では effector の増加に従う細胞傷害活性の増強はあまりはっきりみられず、また野生型マウスと比較して細胞傷害活性は有意に減弱していた。*kCYC*^{+/-}マウス脾細胞由来の CD8⁺ T 細胞では、野生型マウス脾細胞由来の CD8⁺ T 細胞と比較すると有意な差はみられなかったものの、細胞傷害活性が若干弱い傾向であった。こ

れらより、CD8⁺細胞傷害性 T 細胞の腫瘍特異的な免疫応答の減弱が kCYC^{+/-}マウスの腫瘍増大に関与している可能性が示唆された。

7) 腫瘍の大きさと細胞傷害活性の相関関係の検討

CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が減弱していることが腫瘍の増大に寄与しているか評価するために、腫瘍の大きさと細胞傷害活性の相関関係をグラフに示した (図 10)。接種して 14 日後の腫瘍の大きさは、リンパ節由来の CD8⁺ T 細胞による target cell の死細胞の割合と負の相関がみられた。腫瘍の大きさは、脾臓由来の CD8⁺ T 細胞による死細胞の割合とも負の相関がみられた。以上より CD8⁺ T 細胞の腫瘍細胞傷害活性が低いマウスの方が、接種した腫瘍がより増大する傾向が示唆された。

8) adoptive transfer による腫瘍抑制の検討

次に、腫瘍で免疫した kCYC^{+/-}マウス由来の CD8⁺ T 細胞が別のマウスの腫瘍の成長を抑制するかについて評価した。野生型および kCYC^{+/-}マウスに B16 メラノーマ細胞を接種し、14 日後に所属リンパ節から CD8⁺ T 細胞を分離した。CD8⁺ T 細胞を C57BL/6 マウスに静注して 1 日後に B16 メラノーマ細胞を皮下注射したのち、腫瘍の大きさを経時的に計測した (図 11)。PBS のみを静注した陰性コントロールと比較し

て、野生型マウス由来の CD8⁺ T 細胞は皮下注射 10、14 日後に有意に腫瘍の増大を抑制した ($\dagger P < 0.05$, $\ddagger P < 0.01$)。これに対して kCYC^{+/-}マウス由来の CD8⁺ T 細胞では腫瘍注射 14 日後に陰性コントロールよりも有意に腫瘍形成を抑制したが ($\dagger P < 0.05$)、14 日後の腫瘍抑制の程度は野生型マウスよりも有意に弱いという結果が得られた ($*P < 0.05$)。これらの結果は腫瘍で免疫した kCYC^{+/-}マウスの CD8⁺ T 細胞の抗腫瘍免疫作用は野生型マウスと比較して減弱していることが示唆された。

5. 考察

メラノーマ、有棘細胞癌などの皮膚悪性腫瘍をはじめ、乳癌や消化管悪性腫瘍など多くの癌腫では、リンパ管を介して腫瘍がリンパ節に転移し、その後遠隔転移することが知られている。これらの担癌患者における所属リンパ節は、転移の足場になるものとしてかつては否定的に捉えられる見方があった。実際、臨床的にリンパ節転移が確認できない悪性腫瘍の症例に対する外科的治療として、予防的リンパ節郭清がなされていた。メラノーマにおいてはランダム化比較試験の結果、予防的所属リンパ節郭清 (elective regional lymph node dissection) は生存期間の延長に寄与しないことが示され、現在は予防的リンパ節郭清の有益性は否定されている⁴³⁻⁴⁶。一方でメラノーマにおける多変量解析の結果、所属リンパ節郭清における転移陽性リンパ節の割合は重要な独立予後規定因子であると報告されており⁴⁷、リンパ向性に腫瘍が転移することは病勢の進行と密接な関わりがあると考えられる。他方、腫瘍特異的な免疫については、*in vitro* で様々な研究がなされているが、リンパ灌流の障害モデルを用いて、リンパの流れの腫瘍免疫に対する影響をダイナミックに研究しているものはほとんどない。本研究ではリンパ灌流が障害されたマウスにおいて、2種類の腫瘍細胞を接種して腫瘍形成が促進されることを明らかにした(図1,3)。

また、リンパ流障害マウスにおいて、腫瘍の所属リンパ節転移が減少しているという結果が得られた（図 5）。VEGF-C や VEGF-D を強発現する癌細胞をマウスに接種すると腫瘍内のリンパ管新生がみられ、リンパ節転移および遠隔転移が増加したとする研究結果³¹⁻³³から推察すると、逆に本研究の結果のようにリンパ灌流の減少が所属リンパ節転移の抑制をもたらすとしても矛盾はしないと考えられる。

所属リンパ節におけるサイトカインを解析したところ、kCYC^{+/-}マウスにおいてサイトカインの発現が低下していることが示された（図 2, 4）。適応免疫の誘導において、naïve CD4⁺ T 細胞が抗原提示細胞によって抗原提示を受けると、活性化されてエフェクターT 細胞となり、サイトカインを産生するようになる^{48, 49}。上記の実験結果は、抗原提示が減少し T 細胞の活性化が減弱していることを反映している可能性が考えられた。そこで腫瘍抗原と抗原提示について検討したところ、リンパ流障害マウスの所属リンパ節において腫瘍抗原の流入が減少していること（図 6）、および所属リンパ節における腫瘍抗原の提示が減弱していること（図 7）が明らかになった。

上記より、kCYC^{+/-}マウスで観察された腫瘍が増大する原因として腫瘍抗原および抗原提示が減弱していることが示唆され、その結果抗腫瘍免疫の低下を来すことが推察された。そこで腫瘍に対する細胞障害活性をリンパ節および脾細胞を用いて解析したところ、kCYC^{+/-}マウス由来 CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が減弱していることを *in vitro*

および *in vivo* で明らかにした (図 9, 11)。これらの結果から、腫瘍特異的な免疫応答の成立には腫瘍由来の抗原がリンパ管を介して所属リンパ節にたどりつき、抗原提示されることが重要な役割を果たしていることが示された。

Cytotoxicity assay においてリンパ節および脾臓の細胞から CD8⁺ T 細胞を単離しない場合は、野生型マウスと *kCYC*^{+/-}マウスの腫瘍細胞傷害活性に有意差はみられなかったのに対して、CD8⁺ T 細胞を単離した場合には有意差がみられた (図 9)。リンパ組織には抗腫瘍作用をもつ NK 細胞などが存在しているが、今回の実験結果から、これらの細胞による腫瘍免疫はリンパ灌流の影響を受けないと考えられる。これらの細胞の非特異的な免疫応答の影響が大きいため、CD8⁺ T 細胞を単離しない場合は腫瘍細胞傷害活性に差がみられなかったと考えられた。本研究で用いた *kCYC*^{+/-}マウスにおける各免疫担当細胞の機能について、CD8⁺ T 細胞に関しては野生型マウスとの差がないことを確認しているが、その他の細胞については完全には検討できてはいない。しかし *k-cyclin* 遺伝子はリンパ管のみに発現していること、腫瘍接種後、単離処理を施さないリンパ節および脾臓で細胞傷害活性に差がなかったことなどから、*k-cyclin* 遺伝子が直接免疫担当細胞に影響を与えている可能性は低いと考えられる。

また Cytotoxicity assay において *kCYC*^{+/-}マウスでは、effector 細胞の細胞傷害活性がはっきりみられなかった。腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞の抗腫瘍活性については相反

する報告がいくつかなされている。B16 メラノーマ細胞がバリア形成により抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の免疫学的反応を受けない⁵⁰、あるいは腫瘍から分離された腫瘍特異的な CD8⁺ T 細胞がエフェクター機能を欠いている^{51, 52}ことが報告されている。その一方で、B16 メラノーマ細胞で刺激したのちに回収した細胞傷害性 T 細胞で抗腫瘍活性が確認されたと複数のグループから報告されている^{53, 54}。B16 メラノーマ細胞を注射して間もない段階では骨髄由来の抗原提示細胞による cross-presentation によって機能的な細胞傷害性 T 細胞が誘導される一方で、時間が経過した段階では腫瘍がリンパ節に転移して direct-presentation によって T 細胞を活性化し、その結果 T 細胞が細胞傷害活性を獲得できないとする研究結果もあり⁵⁵、抗原提示の経路や時間経過などに依存して腫瘍特異的な CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性は変化する可能性があると考えられる。Cytotoxicity assay で kCYC^{+/+}マウス由来 CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が低下していた主な原因は、抗原提示の減弱によって腫瘍特異的な CD8⁺ T 細胞の誘導が減弱していることが考えられるが、制御性 T 細胞など別の population による差も否定はできず、この点は更なる検討が必要と考えられる。

悪性腫瘍におけるリンパ管はリンパ節転移の主要な経路として認識されており、実際に所属リンパ節転移はメラノーマなどでは予後規定因子となりうる⁴⁷。しかしそれと同時に、腫瘍抑制的に機能する免疫応答の成立にもリンパ管が重要な役割を

果たしていることが本研究で明らかとなった。メラノーマにおいては悪性腫瘍に対する治療として外科的切除、化学療法、放射線治療を適宜組み合わせで行う集学的治療が主流となっている。これに加えて腫瘍特異的な免疫応答を誘導して治療を行う免疫療法が研究されているが、臨床的に有効性のある治療として確立されるにはまだ解決すべき課題が多く残っている。本研究はまず第一に、リンパ節転移のない悪性腫瘍の症例においては、原発巣のみを切除し、リンパ節を温存しておくことで、再発の際に抗腫瘍免疫応答を誘導できる可能性を示した点で重要である。また本研究で得られた知見を更に発展させることで、ケモカインに対する応答性などの違いを利用して抗原提示細胞のみを選択的に所属リンパ節に誘導する、あるいは腫瘍由来抗原のみを選択的にリンパ節に誘導し、抗原提示できればより効率的な腫瘍免疫を実現できる可能性がある。あるいは腫瘍細胞内あるいは周囲のリンパ管新生を抑制することで腫瘍の転移を抑制しつつ、腫瘍免疫を誘導することができれば免疫療法の発展に大きく貢献すると期待される。

6. まとめ

本研究ではリンパ灌流障害を有する $kCYC^{+/-}$ マウスを用いて、リンパ管の腫瘍免疫における役割について検討した。

$kCYC^{+/-}$ マウスでは野生型マウスと比較し、腹部皮下に接種した B16 メラノーマ細胞および EL-4 リンパ腫細胞の腫瘍形成の増大がみられた。また所属リンパ節におけるサイトカインの発現を検討したところ、 $kCYC^{+/-}$ マウスでは野生型マウスと比較して減少していた。

また、 $kCYC^{+/-}$ マウスにおいて腫瘍の所属リンパ節転移が減少していることに加えて、腫瘍抗原の流入が減少していること、および所属リンパ節における腫瘍抗原の提示が減弱していることを示した。上記より $kCYC^{+/-}$ マウスの腫瘍が増大する原因として腫瘍抗原および抗原提示が減弱していることが示唆された。

次に腫瘍に対する細胞障害活性を解析したところ、所属リンパ節から分離した $kCYC^{+/-}$ マウス由来 $CD8^{+}$ T 細胞の細胞傷害活性は *in vitro* および *in vivo* において減弱していた。これらの結果から、腫瘍特異的な $CD8^{+}$ T 細胞による免疫応答が腫瘍免疫では重要な機能をもち、その免疫応答の成立には腫瘍由来の抗原がリンパ管を介して所属リンパ節において抗原提示されることが重要な役割を果たしていることが示唆された。

7. 謝辞

大学院で学ぶ機会をお与え下さり、終始懇切な御指導御鞭撻を賜りました東京大学医学部皮膚科学教室、佐藤伸一教授に深謝致します。皮膚科学教室で大学院生活を送ることができた幸運に感謝しております。また、本研究に共同研究者として御指導御協力くださった東京大学医学部皮膚科学教室、菅谷誠准教授に深謝致します。

8. 文献

- [1] Warren AG, Brorson H, Borud LJ, Slavin SA: Lymphedema: a comprehensive review. *Ann Plast Surg* 2007, 59:464-72.
- [2] Szuba A, Shin WS, Strauss HW, Rockson S: The third circulation: radionuclide lymphoscintigraphy in the evaluation of lymphedema. *J Nucl Med* 2003, 44:43-57.
- [3] Ruocco V, Schwartz RA, Ruocco E: Lymphedema: an immunologically vulnerable site for development of neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 2002, 47:124-7.
- [4] Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M: Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res* 2003, 314:167-77.
- [5] Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ: Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 2005, 23:611-20.
- [6] Alitalo K: The lymphatic vasculature in disease. *Nature Medicine* 2011, 17:1371-80.
- [7] Förster R, Davalos-Missslitz AC, Rot A: CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:362-71.
- [8] Wick N, Haluza D, Gurnhofer E, Raab I, Kasimir MT, Prinz M, Steiner CW, Reinisch C,

Howorka A, Giovanoli P, Buchsbaum S, Krieger S, Tschachler E, Petzelbauer P, Kerjaschki

D: Lymphatic precollectors contain a novel, specialized subpopulation of podoplanin low, CCL27-expressing lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2008, 173:1202-9.

[9] Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, von Andrian UH, Carroll MC: Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* 2009, 30:264-76.

[10] Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH: Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* 2010, 207:681-8.

[11] Shoo BA, Kashani-Sabet M: Melanoma arising in African-, Asian-, Latino- and Native-American populations. *Semin Cutan Med Surg* 2009, 28:96-102.

[12] Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H: Biology of tumor progression in human melanocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1987, 56:461-74.

[13] Zou WP: Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5:263-74.

[14] Palmowski M, Salio M, Dunbar RP, Cerundolo V: The use of HLA class I tetramers to

design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev* 2002, 188:155-63.

[15] Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Liénard D, Cerottini JC, Cerundolo V: Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998, 188:1641-50.

[16] Gutkin DW, Shurin MR: Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother* 2013.

[17] Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT: The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 2009, 55:301-12.

[18] Dai F, Liu L, Che G, Yu N, Pu Q, Zhang S, Ma J, Ma L, You Z: The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010, 10:220.

[19] Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S: Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:7466-74.

[20] Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Rubini C, Stramazzotti D, Lo Muzio L, Biagini G,

Offidani A: In melanoma changes of immature and mature dendritic cell expression correlate with tumor thickness:an immunohistochemical study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007, 20:325-33.

[21] Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Galon J: Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011, 29:610-8.

[22] Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM: Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001, 61:3932-6.

[23] Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW: The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011, 105:93-103.

[24] Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranel J: Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* 2003, 63:1405-12.

- [25] Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, Mayaud C, Milleron B, Baud L, Cadranel J: Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol* 1998, 152:83-92.
- [26] Zhao JJ, Pan K, Wang W, Chen JG, Wu YH, Lv L, Li JJ, Chen YB, Wang DD, Pan QZ, Li XD, Xia JC: The prognostic value of tumor-infiltrating neutrophils in gastric adenocarcinoma after resection. *PLoS One* 2012, 7:e33655.
- [27] Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P: Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009, 86:1065-73.
- [28] Lewis CE, Pollard JW: Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006, 66:605-12.
- [29] Mosser DM, Edwards JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:958-69.
- [30] Pollard JW: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:71-8.
- [31] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast

cancer metastasis. *Nat Med* 2001, 7:192-8.

[32] Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001, 7:186-91.

[33] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001, 61:1786-90.

[34] Pathak AP, Artemov D, Neeman M, Bhujwala ZM: Lymph node metastasis in breast cancer xenografts is associated with increased regions of extravascular drain, lymphatic vessel area, and invasive phenotype. *Cancer Res* 2006, 66:5151-8.

[35] Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, Jung JU: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* 1997, 71:1984-91.

[36] Davis MA, Stürzl MA, Blasig C, Schreier A, Guo HG, Reitz M, Opalenik SR, Browning PJ: Expression of human herpesvirus 8-encoded cyclin D in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1868-74.

[37] Sugaya M, Watanabe T, Yang A, Starost MF, Kobayashi H, Atkins AM, Borris DL, Hanan EA, Schimel D, Bryant MA, Roberts N, Skobe M, Staskus KA, Kaldis P, Blauvelt A:

Lymphatic dysfunction in transgenic mice expressing KSHV k-cyclin under the control of the VEGFR-3 promoter. *Blood* 2005, 105:2356-63.

[38] Murakami T, Cardones AR, Finkelstein SE, Restifo NP, Klaunberg BA, Nestle FO, Castillo SS, Dennis PA, Hwang ST: Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10. *The Journal of experimental medicine* 2003, 198:1337-47.

[39] Falo LD, Kovacsovics-Bankowski M, Thompson K, Rock KL: Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med* 1995, 1:649-53.

[40] Grant EP, Rock KL: MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 1992, 148:13-8.

[41] Albrecht I, Christofori G: Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol* 2011, 55:483-94.

[42] El Hajj P, Journe F, Wiedig M, Laios I, Salès F, Galibert MD, Van Kempen LC, 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* 2013, 108:1641-7.

[43] Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd IO, Caceres E, Cascinelli N, Claudio F, Ikonopisov RL, Javorskj VV, Kirov S, Kulakowski A, Lacoub J, Lejeune F, Mechl Z,

Morabito A, Rodé I, Sergeev S, van Slooten E, Szczygiel K, Trapeznikov NN: Inefficacy of immediate node dissection in stage 1 melanoma of the limbs. *N Engl J Med* 1977, 297:627-30.

[44] Sim FH, Taylor WF, Ivins JC, Pritchard DJ, Soule EH: A prospective randomized study of the efficacy of routine elective lymphadenectomy in management of malignant melanoma. Preliminary results. *Cancer* 1978, 41:948-56.

[45] Balch CM, Soong S, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, Mihm MC, Barnhill RL, Jewell WR, Wanebo HJ, Harrison R: Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. *Ann Surg Oncol* 2000, 7:87-97.

[46] Cascinelli N, Morabito A, Santinami M, MacKie RM, Belli F: Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. WHO Melanoma Programme. *Lancet* 1998, 351:793-6.

[47] Berger AC, Fierro M, Kairys JC, Berd D, Sato T, Andrel J, Hyslop T, Mastrangelo MJ: Lymph node ratio is an important and independent prognostic factor for patients with stage III melanoma. *J Surg Oncol* 2012, 105:15-20.

- [48] Swain SL, Bradley LM, Croft M, Tonkonogy S, Atkins G, Weinberg AD, Duncan DD, Hedrick SM, Dutton RW, Huston G: Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev* 1991, 123:115-44.
- [49] Jelley-Gibbs DM, Dibble JP, Filipson S, Haynes L, Kemp RA, Swain SL: Repeated stimulation of CD4 effector T cells can limit their protective function. *Journal of Experimental Medicine* 2005, 201:1101-12.
- [50] Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM: Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 2001, 411:1058-64.
- [51] Radoja S, Saio M, Schaer D, Koneru M, Vukmanovic S, Frey AB: CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol* 2001, 167:5042-51.
- [52] Blohm U, Roth E, Brommer K, Dumrese T, Rosenthal FM, Pircher H: Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2002, 169:5522-30.
- [53] Prévost-Blondel A, Zimmermann C, Stemmer C, Kulmburg P, Rosenthal FM, Pircher H:

Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol* 1998, 161:2187-94.

[54] Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose RC, Frelinger JG, Lord EM: Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol* 2005, 174:7516-23.

[55] Hargadon KM, Brinkman CC, Sheasley-O'Neill SL, Nichols LA, Bullock TN, Engelhard VH: Incomplete differentiation of antigen-specific CD8 T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunol* 2006, 177:6081-90.

[56] Nakamura K, Ohya W, Funakoshi H, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M, Kudo T, Nakamura T: Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2006, 84:874-90.

[57] Xia D, Sanders A, Shah M, Bickerstaff A, Orosz C: Real-time polymerase chain reaction analysis reveals an evolution of cytokine mRNA production in allograft acceptor mice. *Transplantation* 2001, 72:907-14.

[58] Baluk P, Yao LC, Feng J, Romano T, Jung SS, Schreiter JL, Yan L, Shealy DJ, McDonald DM: TNF-alpha drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 2009, 119:2954-64.

- [59] Dominguez-Sola D, Vitoria GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC, Dalla-Favera R: The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* 2012, 13:1083-91.
- [60] Weigmann B, Jarman ER, Sudowe S, Bros M, Knop J, Reske-Kunz AB: Induction of regulatory T cells by leflunomide in a murine model of contact allergen sensitivity. *J Invest Dermatol* 2006, 126:1524-33.
- [61] Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST: Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:1638-43.

9. 図表

表 1 Quantitative RT-PCR の primer の配列

Target		Sequence
GAPDH ⁵⁶	forward	5'CGTG TTCCTACCCCAATGT3'
	reverse	5'TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT3'
IFN- γ ⁵⁷	forward	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'
	reverse	5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
TNF- α ⁵⁸	forward	5'CCACCACGCTCTTCTGTCTAC3'
	reverse	5'AGGGTCTGGGCCATAGAACT3'
IL-2 ⁵⁹	forward	5'-TGAGCAGGATGGAGAATTACAGG-3'
	reverse	5'-GTCCAAGTTCATCTTCTAGGCAC-3'
IL-10 ⁵⁷	forward	5'TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA3'
	reverse	5'ACAGGGGAGAAATCGATGACA3'
TGF- β 1 ⁶⁰	forward	5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3'
	reverse	5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'
TRP1 ⁶¹	forward	5'-GAAAATATGACCCTGCTGTTCGA-3'
	reverse	5'-TTGTCCTCCCGTTCCATTCA-3'

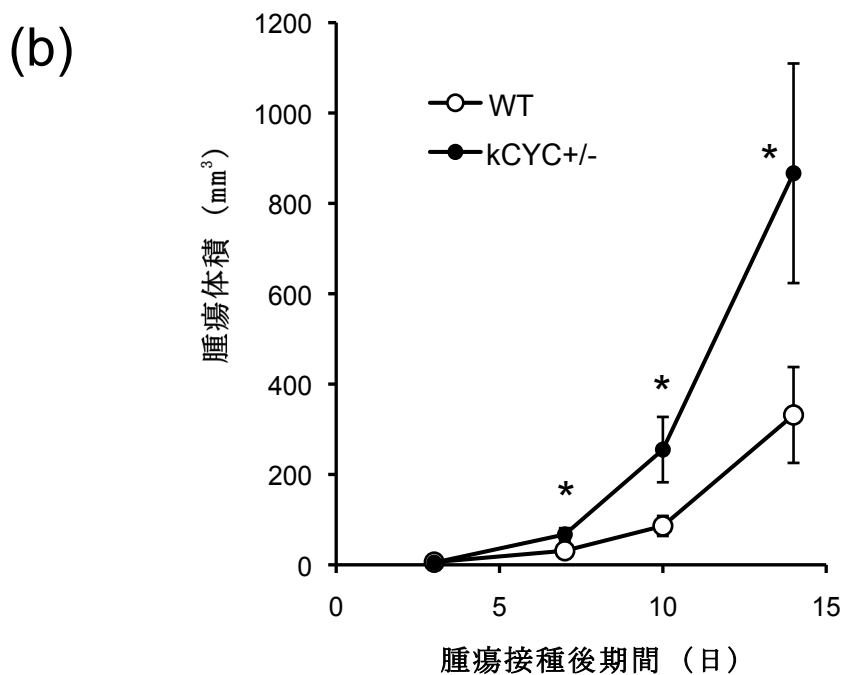
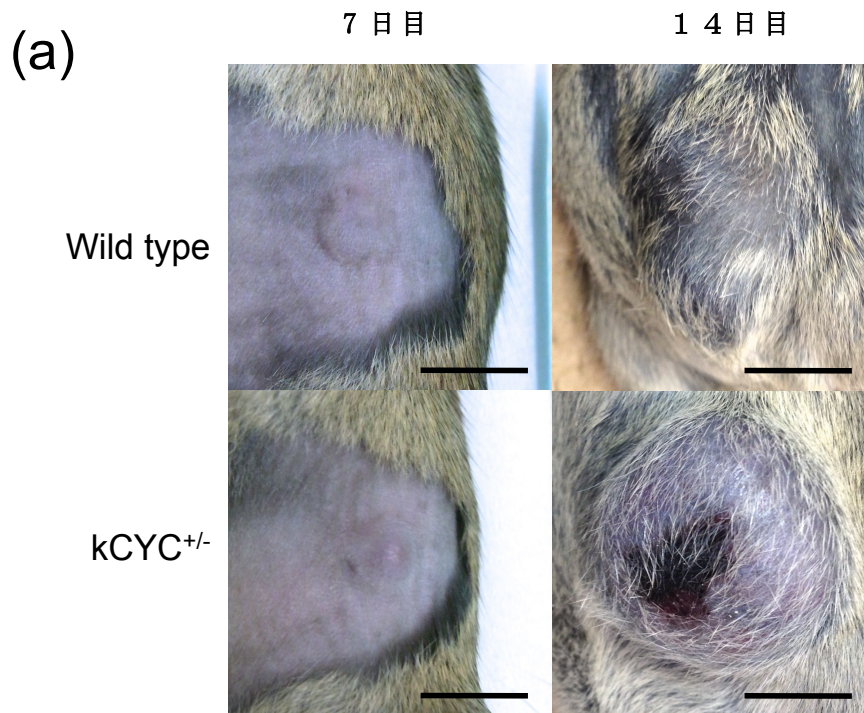


図 1 kCYC^{+/-}マウスにおける B16 メラノーマ腫瘍形成の検討

(a) 野生型マウスおよび kCYC^{+/-}マウスの左下腹部に PBS を用いて 5×10^5 cells/ $100 \mu\text{l}$ に調整した B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、7, 14 日後に形成された腫瘍を示す。(b) 野生型マウス (n=22), kCYC^{+/-}マウス (n=22) に B16 メラノーマ細胞を注射して 3, 7, 10, 14 日後に計測した腫瘍の大きさを示す (* $P < 0.01$)。データは平均値 \pm SEM を用いて表した。

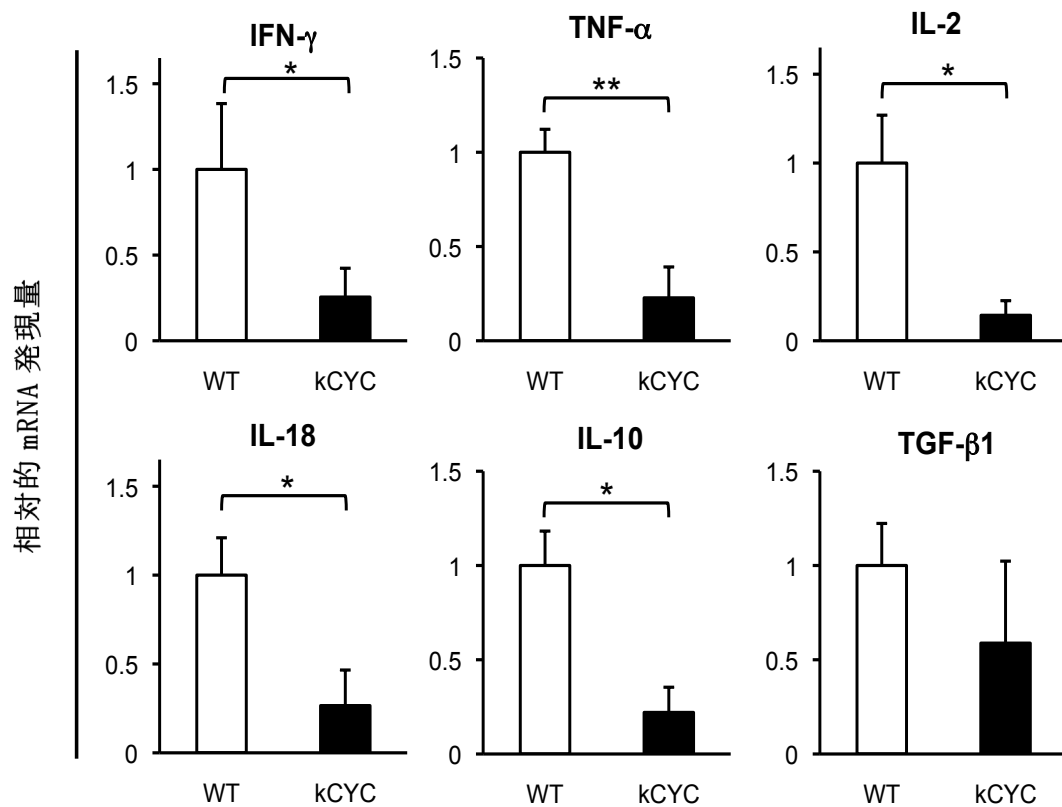


図2 kCYC^{+/-}マウスの所属リンパ節におけるサイトカインの検討

野生型マウス (n=4) および kCYC^{+/-}マウス (n=6) に対して B16 メラノーマ接種 14 日後の所属リンパ節 (左鼠径リンパ節) から RNA を抽出し、quantitative RT-PCR を用いて IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-18, IL-10, TGF- β 1 の発現量を測定した (* P < 0.05, ** P < 0.02)。データは平均値+SEM を用いて表した。

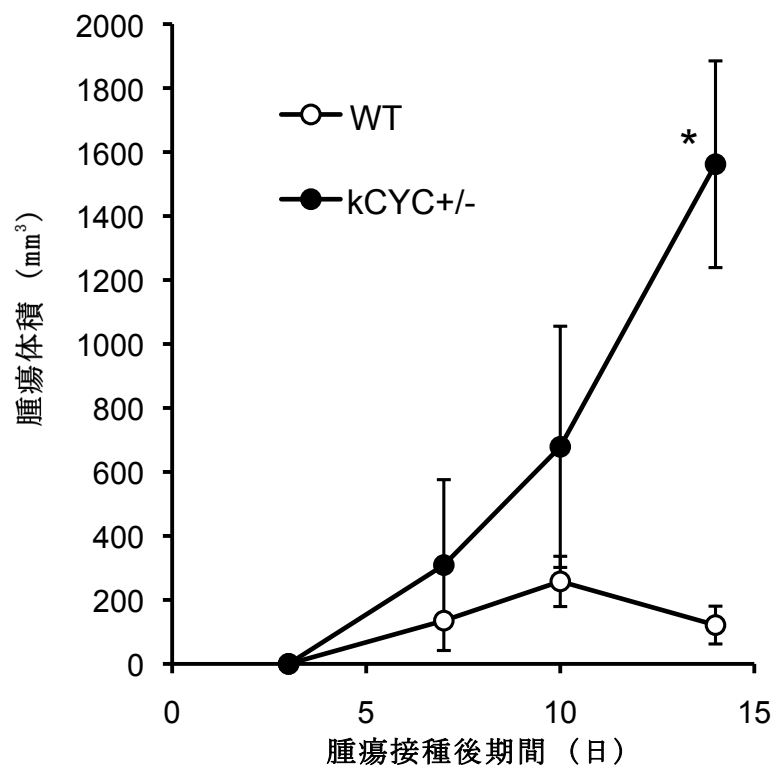


図3 kCYC^{+/-}マウスにおける EL-4 リンパ腫の腫瘍形成の検討

野生型マウス (n=4), kCYC^{+/-}マウス (n=4) に EL-4 リンパ腫細胞を皮下注射して 3,7,10,14 日後に計測した腫瘍の大きさを示す (* $P < 0.05$)。データは平均値±SEM を用いて表した。

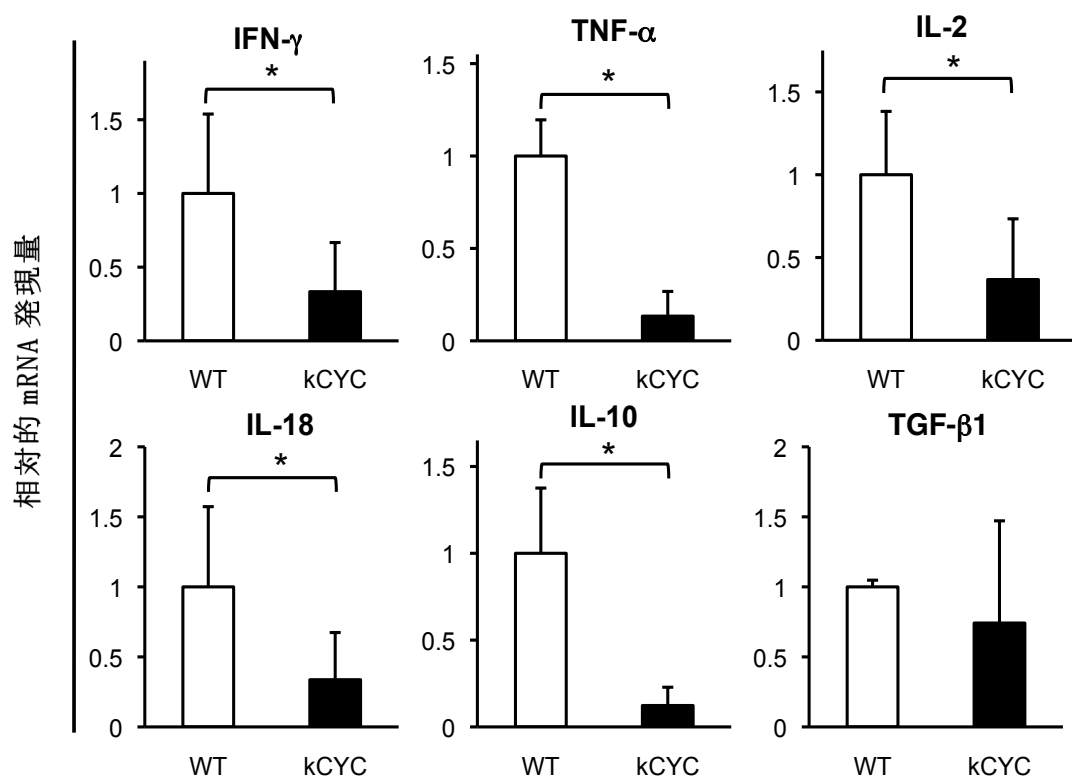


図4 kCYC^{+/-}マウスの所属リンパ節におけるサイトカインの検討

野生型マウス (n=4) およびkCYC^{+/-}マウス (n=4) に対してEL-4リンパ腫接種14日後の所属リンパ節（左鼠径リンパ節）からRNAを抽出し、quantitative RT-PCRを用いてIFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-18, IL-10, TGF- β 1の発現量を測定した (* $P < 0.05$)。データは平均値+SEMを用いて表した。

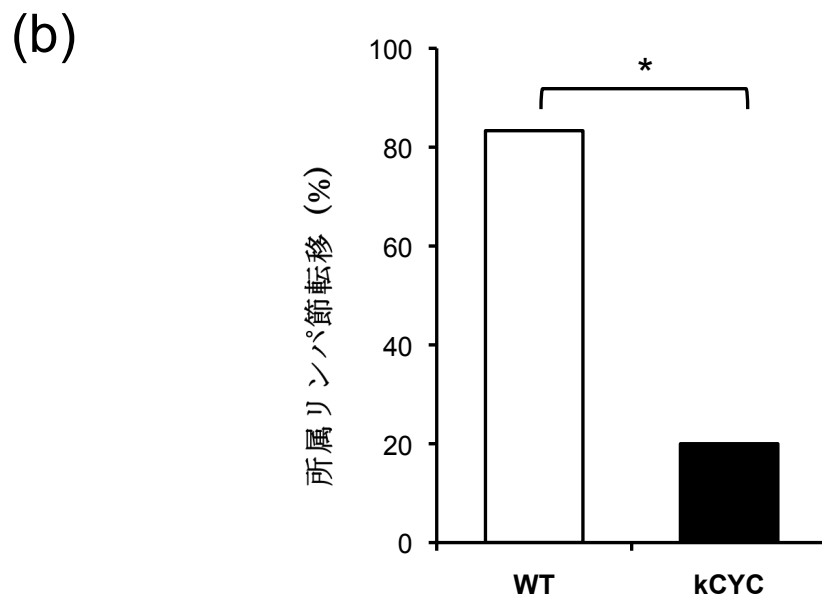
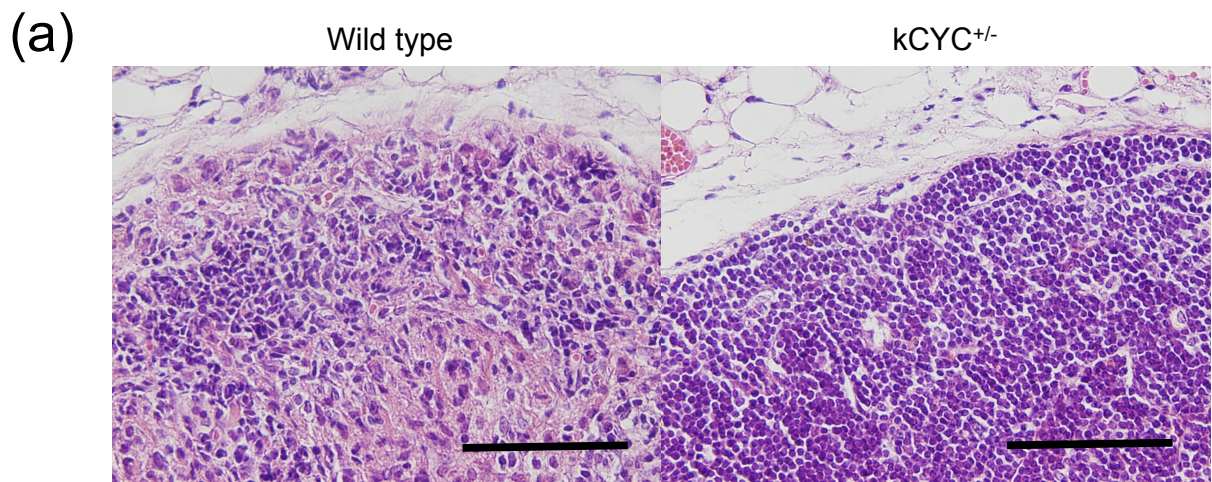


図5 kCYC^{+/-}マウスの所属リンパ節転移の検討

(a) 野生型マウスおよびkCYC^{+/-}マウスに対してB16メラノーマ接種14日後に所属リンパ節（左鼠径リンパ節）を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。スケールバーは100 μ mを示す。(b) 野生型マウス (n=6), kCYC^{+/-}マウス (n=5)にB16メラノーマ細胞を注射して14日後に所属リンパ節を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行ってリンパ節転移陽性であったマウスの割合を示す (* $P < 0.01$)。

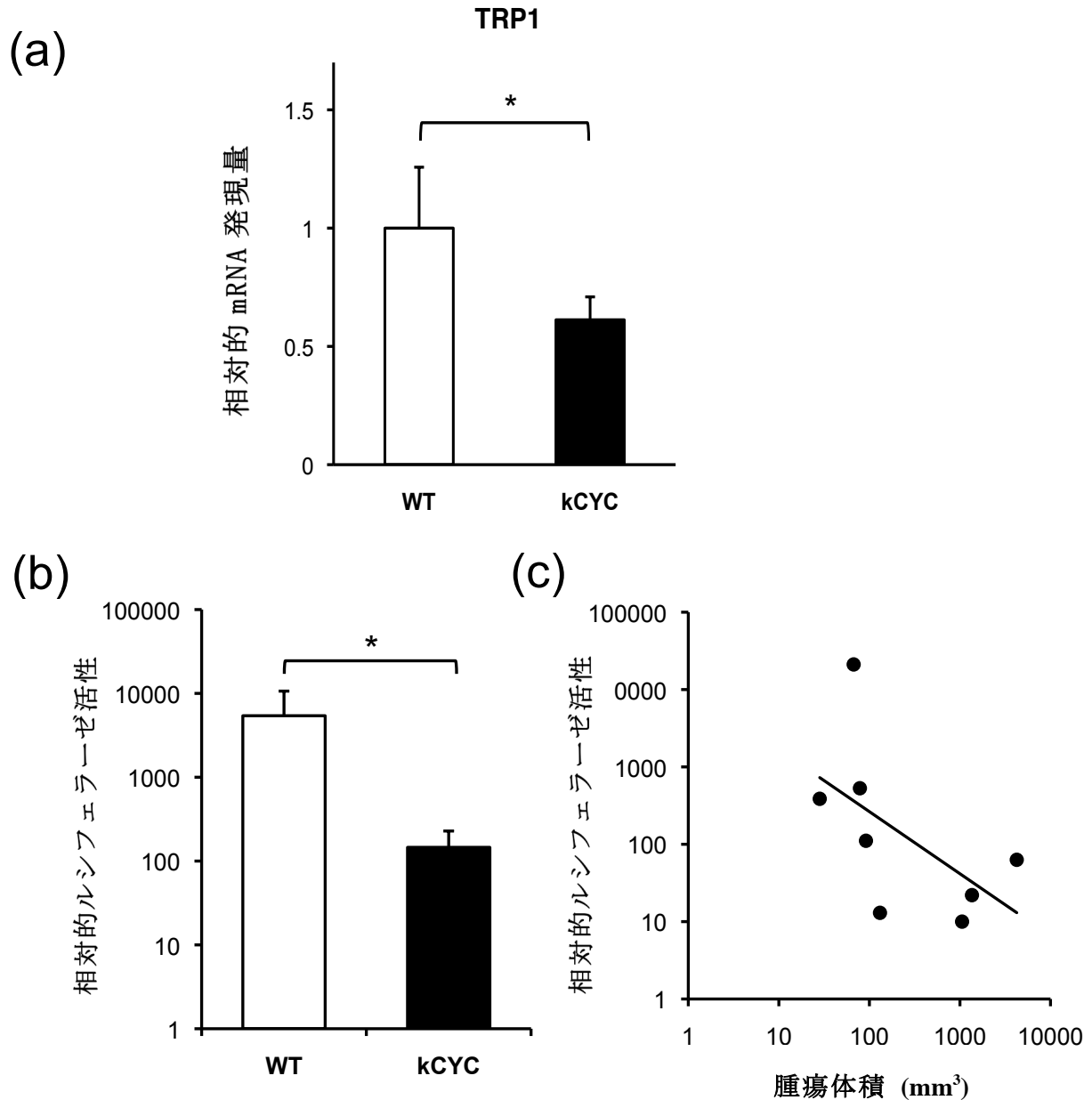


図6 kCYC^{+/-}マウスの所属リンパ節における腫瘍由来 RNA および luciferase の検討
 (a) 野生型マウス (n=6)および kCYC^{+/-}マウス (n=4)に対して B16 メラノーマ接種 14 日後の所属リンパ節 (左鼠径リンパ節) から RNA を抽出し、quantitative RT-PCR を用いて tyrosinase-related protein-1 (TRP1)の発現量を測定した。データは平均値+SEM を用いて表した。(b) 野生型マウス (n=4)および kCYC^{+/-}マウス (n=4)に対して B16 メラノーマ接種 14 日後の所属リンパ節を採取し、luminometer を用いて luciferase の活性を評価した (**P* < 0.05)。データは平均値+SEM を用いて表した。(c) 腫瘍体積と luciferase 活性の相関関係を示した。直線は近似曲線を示す (*r* = -0.71, **P* < 0.05)。

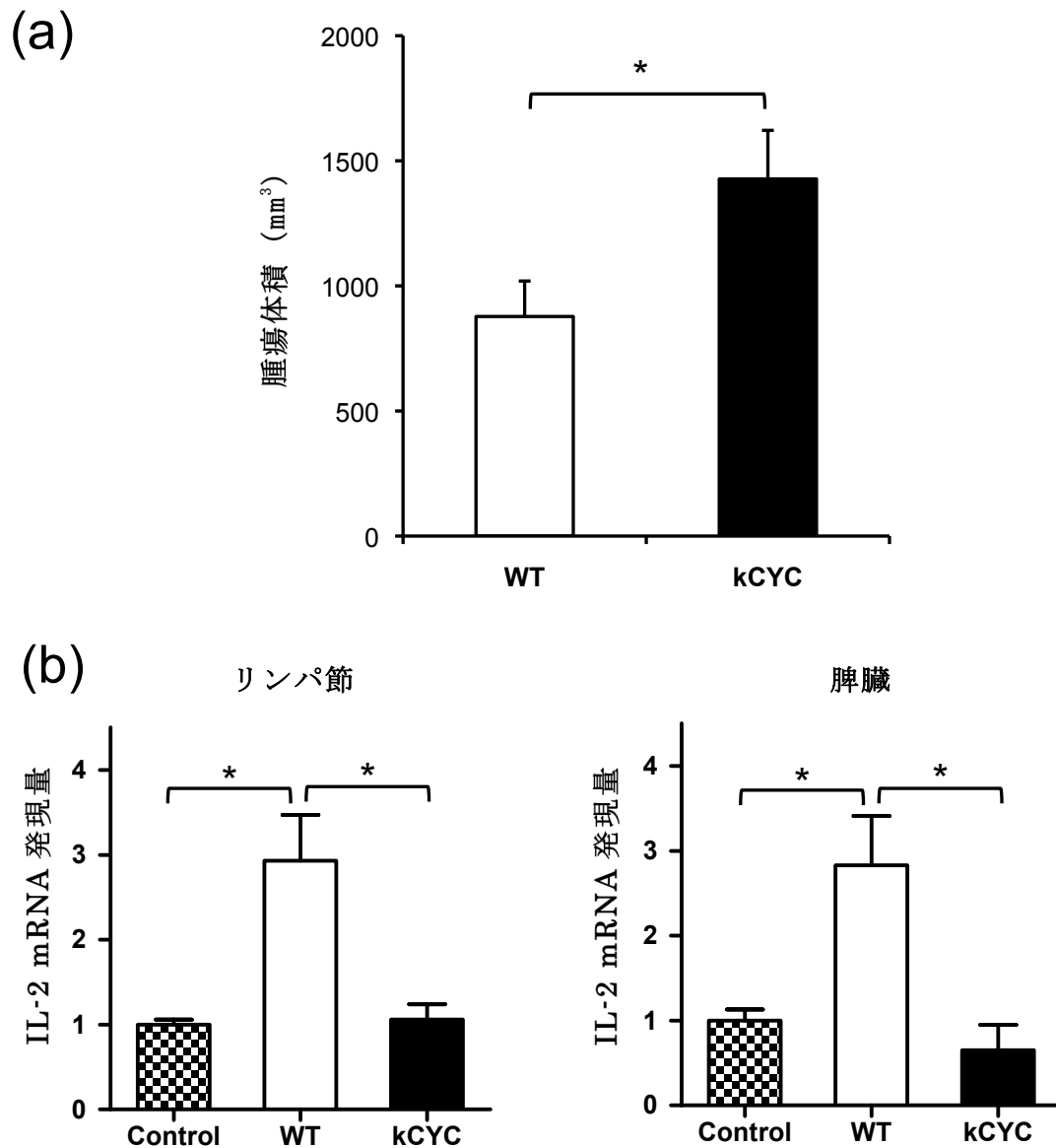


図7 kCYC^{+/-}マウスにおける MO4 細胞由来の抗原提示の検討

(a) 野生型マウス (n=11), kCYC^{+/-}マウス (n=8) に MO4 メラノーマ細胞を皮下注射して 14 日後に計測した腫瘍の大きさを示す (* $P < 0.05$)。データは平均値+SEM を用いて表した。(b) MO4 メラノーマ接種 14 日後に所属リンパ節と脾臓を採取し、RF33.70 細胞と 24 時間共培養した。培養細胞から RNA を回収し、quantitative RT-PCR を用いて IL-2 の発現量を測定した (* $P < 0.05$)。データは平均値+SEM を用いて表した。

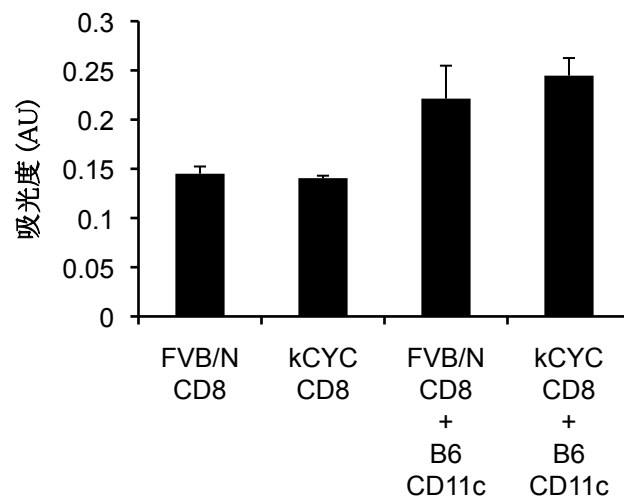


図8 *k-cyclin* トランスジェニックマウスにおける $CD8^+$ T 細胞の反応性の検討
野生型 FVB/N マウス、*k-cyclin* トランスジェニックマウス (FVB/N バックグラウンド) のリンパ節から $CD8^+$ T 細胞を回収した。また野生型 C57BL/6 マウスのリンパ節から $CD11c^+$ 樹状細胞を回収した。 $CD8^+$ T 細胞と $CD11c^+$ 樹状細胞をそれぞれ 3×10^4 個ずつ共培養し、細胞の増殖能を評価した。データは平均値+SEM を用いて表した。

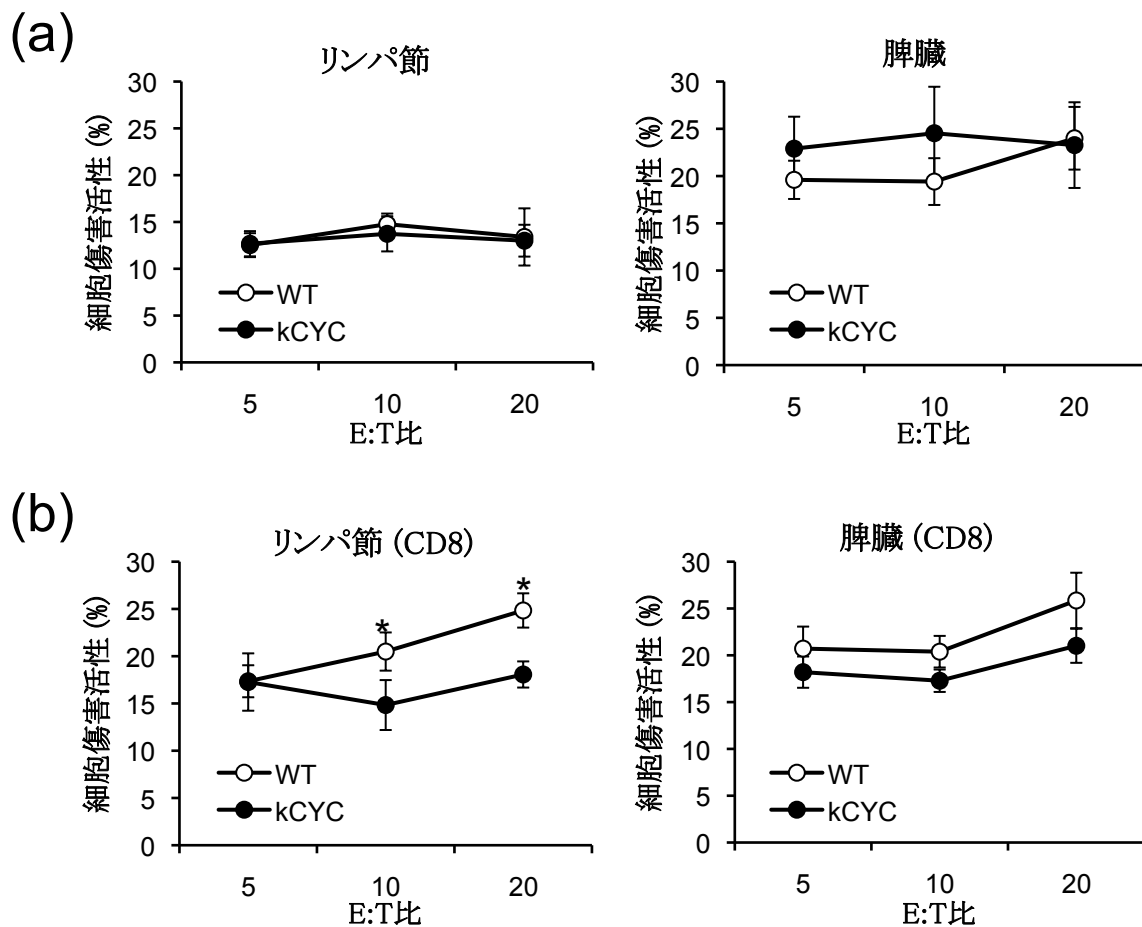


図9 kCYC^{+/-}マウスにおけるリンパ球の細胞傷害活性の検討

野生型マウス (n=10)、kCYC^{+/-}マウス (n=7) に B16 メラノーマ細胞 5×10^5 cells/100 μ l を皮下注射し、14 日後に所属リンパ節および脾臓から細胞 (effector cell) を採取した。分離操作を行わない細胞 (a) あるいは MACS を用いて分離した CD8⁺ T 細胞 (b) を effector として B16 メラノーマ細胞 (target) と effector : target (E : T) 比が 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1 となるように共培養した。Target cell のうち死細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した (* $P < 0.05$)。データは(a) 野生型、kCYC^{+/-}マウスそれぞれ n=10, 7、(b) 野生型、kCYC^{+/-}マウスそれぞれ n=7, 4 から得られ、平均値 \pm SEM を用いて表した。

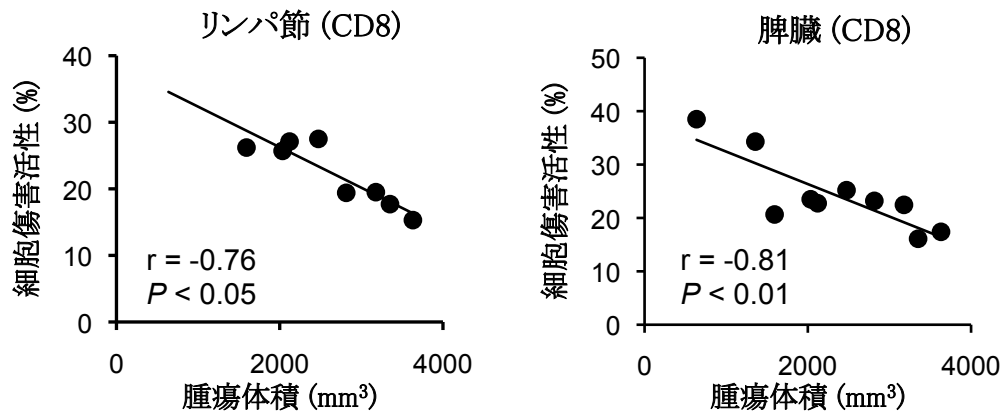


図 10 腫瘍の大きさと細胞傷害活性の相関

野生型マウス、 $kCYC^{+/-}$ マウスに B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、14 日後に腫瘍の大きさを計測するとともに、所属リンパ節および脾臓のそれぞれから $CD8^{+}$ T 細胞を採取した。図 9 と同様に、 $CD8^{+}$ T 細胞を effector、B16 メラノーマ細胞を target として effector : target (E : T) 比が 20 : 1 となるように共培養し、死細胞の割合を測定した。腫瘍の大きさと死細胞の割合について相関関係を図に示した。直線は回帰直線を表す。リンパ節、脾臓のそれぞれについて $R = -0.76$ ($P < 0.05$)、 $R = -0.81$ ($P < 0.01$)の負の相関がみられた。

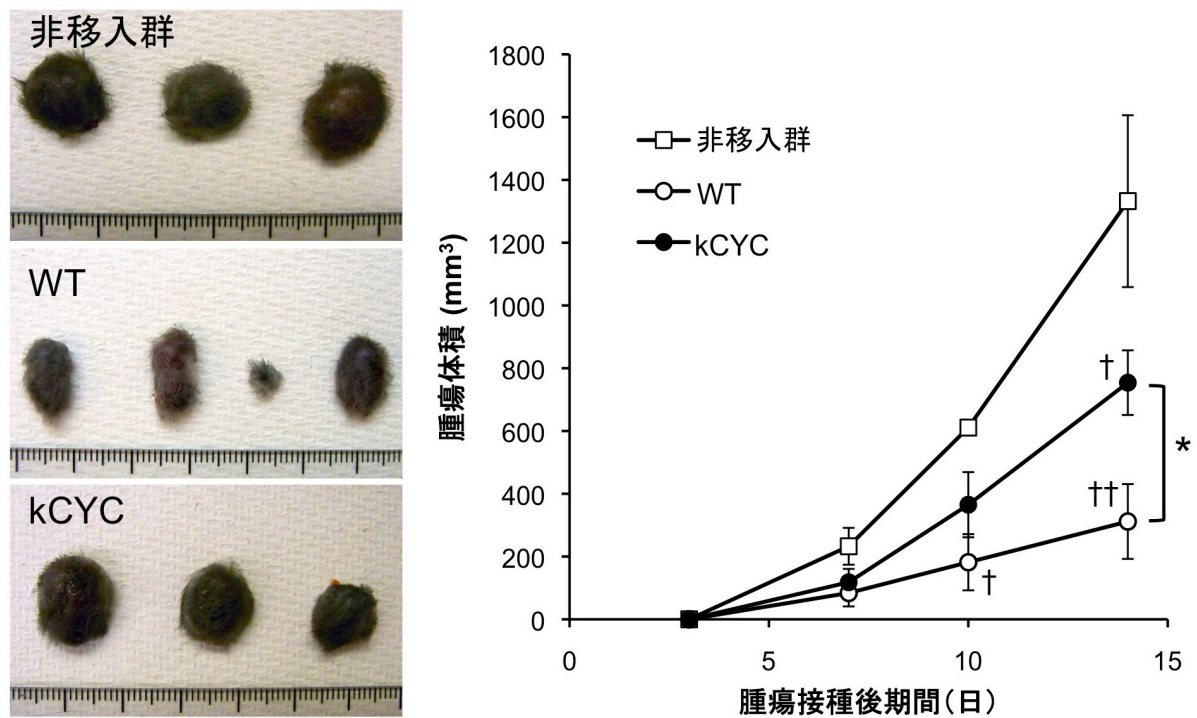


図 11 腫瘍接種後のリンパ節細胞の移入実験

野生型マウス (n=4)、kCYC^{+/-}マウス (n=3) に B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、14 日後に所属リンパ節を採取し、CD8⁺ T 細胞を分離した。CD8⁺ T 細胞を C57BL/6 マウスに静注して 1 日後に B16 メラノーマ細胞を皮下注射したのち、3,7,10,14 日後に腫瘍の大きさを計測した。陰性コントロールとして同量の PBS を静注したマウス (n=3) を用いた。14 日後に採取した腫瘍の写真と大きさの経時的変化を示す (* $P < 0.05$)。† $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$ はそれぞれ陰性コントロール群との比較を示した。データは平均値 ± SEM を用いて表した。