●総 説● 特集:新しいリンパ学の創生―微小循環学,免疫学,腫瘍学との連携―

リンパ管、リンパ節形態学の最近の進歩

大谷 修 大谷 裕子

要 旨:リンパ管の形態と新生,およびリンパ節の構造と機能について述べる。in vivoでは,リンパ管内皮細胞(LECs)が,まず単独で遊走していき,それが集まってリンパ管を形成する。LECsは低酸素下で,インサート上や生体から採取したコラーゲン線維網上で急速に増殖してリンパ管網を形成する。リンパ節はLECsで囲まれた腔と実質からなり,抗原提示細胞,抗原,リンパ球が遭遇して免疫応答を開始し,リンパを濃縮する。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48:107–112)

Key words: lymphatic vessel, lymphangiogenesis, lymph node, metastasis, sentinel node

序 言

リンパ管は組織液の恒常性を保ち, 生体の免疫監視 機構として働き,脂肪および脂溶性ビタミンA,D, E, Kを摂取するために重要な役割を演じている。ま た、リンパ浮腫等種々の病態に関与している。リンパ 管は1627年イタリアの解剖学者Gasparo Aselliによって 犬の腸間膜中に"milky veins"として初めて同定された。 それ以来リンパ管研究のためにさまざまな方法が考案 され,リンパ管の分布や構造が明らかにされてきた¹⁾。 しかし、特異的なマーカーがなかったために、組織切 片でリンパ管を同定することすら困難な場合が多かっ た。ところが,最近の10年間に, prox-1²⁾, podoplanin³⁾, LYVE-1⁴⁾, VEGFR-3⁵⁾, CCL21⁶⁾, desmoplakin⁷⁾等のリンパ管特異的マーカーが発見さ れ,そのためにリンパ管研究は急速に発展し,種々の リンパ管疾患の診断と治療法の進歩が期待されてい る。一方、リンパ節は抗原提示細胞、リンパで運ばれ てくる抗原、および血液から供給されるリンパ球が遭 遇する重要な交差点であり,リンパ管内皮細胞で囲ま れた腔とリンパ球などで満たされた細網構造で構成さ れる実質からなる。輸入リンパ管から入ってきたリン パの水分がリンパ節内で吸収されてリンパのタンパク 質が濃縮される。また,腫瘍のリンパ節転移は,患者 の予後を悪くする主たる要因である。本稿ではリンパ

富山大学大学院医学薬学研究部(医学), 解剖学講座

THE JOURNAL of JAPANESE COLLEGE of ANGIOLOGY Vol. 48, 2008

管の形態,リンパ管新生,リンパ節の構造と機能について述べる。

リンパ管の形態

リンパ管には起始リンパ管あるいは毛細リンパ管と 集合リンパ管の2種類がある。毛細リンパ管は1層の リンパ管内皮細胞(lymphatic endothelial cells: LECs)か らなり,多くの場合,数百ミクロンから数ミリ間隔で 弁を有し、リンパを1方向に流すことができる(Fig. 1)。血管と違い、基底膜はなく、周皮細胞もない。リ ンパ管はfibrillinを含む⁸⁾係留フィラメント⁹⁾によって周 囲の細胞外基質に結合されている。LECs間には二~三 重に重なって接着した部分と、接着していないで開閉 できるいわばミクロの弁として働く部分とがある。間 質液の圧が上昇するとLECsについている係留フィラメ ントが緊張し毛細リンパ管の腔が拡張し、LECs間の接 着していない部分が開き,液体やマクロ分子,あるい は細胞がリンパ管内に入る。集合リンパ管には弁と平 滑筋がある。平滑筋の収縮により、リンパが輸送され る。平滑筋は弁の周りでは輪状に走り、弁と弁の間で は斜めに走る傾向がある(Fig. 2)。集合リンパ管の平滑 筋は部位および種によって発達の度合いが異なる。

リンパ管の発生・新生

フローレンスのSabinは1902年に、発生の初期に静脈

²⁰⁰⁸年1月7日受理



Figure 1 Lymphatic capillaries in the rat diaphragmatic pleura. There are many blind ends (arrowheads) and valves (arrows). Enzyme-histochemistry to 5'-nucletidase. Scale bar = 200μ m

©1993 Archives of Histology and Cytology. All rights reserved. Ohtani Y, Ohtani O, Nakatani T: Microanatomy of the rat diaphragm: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. 1993, **56**: 317–328.

から発芽により原始リンパ嚢が形成され、そこから内 皮が周囲の組織や器官に発芽して末梢のリンパ管が形 成されると提唱した¹⁰⁾。Oliverは2004年に、遺伝子操作 をしたマウスによる研究で、哺乳類のリンパ管は胎生 期の静脈から発生するというSabinの説を証明した¹¹⁾。

近年,VEGF-CがVEGFR-3を介して培養LECsの増殖 と遊走を促進することが明らかになった¹²⁾。さらに, VEGF-A,VEGF-C,およびVEGF-DはVEGF受容体あ るいはneuropilin 2を介してリンパ管新生を促進するこ とが明らかになった。リンパ管新生の分子レベルでの 制御機構が急速に解明されつつある。詳細は他家の総 説¹³⁾を参照されたい。

LECsの増殖とリンパ管形成を促進する環境因子については十分に解明されていない。ラット胸管から採取したLECsを低酸素下で培養すると、5%CO2を含んだ空気下で培養する場合よりも早くコンフルエントになる。低酸素下でインサート上にLECsを培養すると層状に増殖し、リンパ管が形成される(Fig.3)。また、ヒトの胸管や横隔膜の細胞を溶かし、コラーゲン線維網のみを自然の三次元構造を保った状態で取り出し^{14,15)}、その上にLECsを低酸素下で培養すると急速に三次元的にリンパ管が形成されることが明らかになった(Fig.4)。これらは、リンパ管の形成には低酸素環境と三次元的足場が重要であることを示唆している(詳細は他誌に発表)。

リンパ管のin vivoでの発達に関する研究は多くな



Figure 2 Smooth muscle cells around the collecting lymphatic vessel in the rat diaphragm. They tend to run circumferentially at around the valves (arrowheads) and obliquely or herically between valves.

Scale bar = $50\mu m$

©2001 Archives of Histology and Cytology. All rights reserved. Ohtani Y, Ohtani O: Postnatal development of lymphatic vessels and their smooth muscle cells in the rat diaphragm: a confocal microscopic study. 2001, **64**: 513–522.



Figure 3 LECs expressing LYVE-1 from the thoracic duct of the green rat (transgenic SD rats containing fluorescent genes; Amersham, Tokyo) cultured on an insert under a low oxygen condition proliferate rapidly and form a lymphatic-like network. Scale bar = 100μ m

い。われわれは、ラットの横隔膜におけるリンパ管の 発達を研究してきた^{16~18)}。胎生16日ごろから横隔膜の 胸腔側に明瞭なリンパ管が認められるようになる。や や遅れて腹腔側にも出現する。リンパ管は、主として 発芽によって発達すると考えられている。しかし、わ れわれの最近の研究では、リンパ管が形成されると思 われる部位にLECsがばらばらに遊走して列をなし、そ れらが互いに集まってリンパ管を形成すると思われる 所見が得られている(Fig.5)。LECsが間質液の流れる方 向に単独で遊走し、後にそれらが集まってリンパ管に なるとする報告もある¹⁹⁾。

集合リンパ管の平滑筋の発生についてもほとんど注 目されていない。われわれのラット横隔膜における研 究¹⁷⁾では,生後 2 週目の終わりごろまでα-smooth

脈管学 Vol. 48, 2008



Figure 4 LECs from the rat thoracic duct cultured on a collagen fiber sheet from human thoracic duct rapidly form a threedimensional lymphatic network. Scale bar = 25μ m



Figure 5 Developing lymphatic vessels in the rat diaphragm. Numerous single LECs are in lines in the places where lymphatic vessels are expected to be formed. L: lymphatic vessels already formed. Scale bar = 50μ m

muscle actin(α-SMA)を発現する紡錘形の細胞が多数認 められる。その後、リンパ管に細長い突起を巻きつけ たα-SMA陽性の細胞がみられるようになる。やがて、 輪状あるいはらせん状にリンパ管に纏わりついた典型 的な平滑筋がみられるようになる。これらのことか ら、リンパ管の平滑筋は間葉系の細胞から分化するも のと思われる¹⁷¹。

リンパ節の構造と機能

リンパ節は抗原提示細胞、リンパで運ばれてくる抗 原,および血液から供給されるリンパ球が遭遇して, 免疫応答を開始する重要な交差点である。リンパ節 は、リンパ管内皮細胞で囲まれた腔とリンパ球などで 満たされた細網構造で構成される実質からなる²⁰⁾。実 質では皮質が深皮質を経て髄索とつながっている。輸 入リンパ管は、皮膜下リンパ洞へ注ぐ。皮膜下リンパ 洞の床にある孔を通って、液体や細胞は皮質に入る (Fig. 6)。深皮質にはリンパ球を満たしたリンパ迷路が ある。リンパ迷路は髄洞に連絡している。髄洞は内径 が広く、LECsで包まれた梁柱が発達し、マクロファー ジが多数絡まっている。皮膜下リンパ洞はまた中間洞 を経て髄洞に連絡している。中間洞の構造は髄洞とほ ぼ同じである。深皮質には高内皮細静脈(high endothelial venules: HEVs)が発達しており、その壁を通って流 血中のリンパ球がリンパ節の実質中に出ていく(Fig.

7)。一方,深皮質のリンパ迷路には実質からリンパ球 が入る(Fig. 7)。リンパ迷路はCCR7を発現していると 言われている。

リンパ節は、輸入リンパ管から入ってきたリンパの 水分を吸収してタンパク質を濃縮する²¹⁾。この機構 は、十分には解明されていないが、HEVsの内皮細胞が 細胞表面近くにAquaporine-1という水チャンネルを強く 発現することから、HEVsの壁から水が血管内に吸収さ れると考えられている²⁰⁾。

腫瘍のリンパ節転移は,がん患者の予後を悪くする 主たる要因である。近年,ある種のヒトの腫瘍は VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D等を産生することが明ら かになった。そのような腫瘍はリンパ管を増殖させ, センチネルリンパ節への転移を促進する²²⁾。またヒト 胃がんや結腸直腸がん等ではVEGF-Cの発現とCox-2の 発現が相関している^{23,24)}。Cox-2 inhibitorを実験的腫瘍 モデルに投与するとリンパ管新生を抑制すると報告さ れている。これらのことから,がん治療の戦略として 腫瘍のリンパ管新生を阻害する方法が模索されてい る。

腫瘍細胞がリンパ節に転移する機構は十分には解明 されていない。Lewis lung carcinoma (LLC)細胞をマウ ス肺に移植すると縦隔リンパ節に転移する²⁵⁾。GFPを 発現するLLC細胞を用いたモデルで調べると、皮膜下 リンパ洞に到達したLLC細胞は単独でばらばらと皮質

脈管学 Vol. 48, 2008



Figure 6 Schematic diagram of the rat lymph node showing an overview of lymphatic pathways (green), arteries (red) and veins (violet: HEVs; blue: ordinary vein) of the lymph node. Arrows indicate the direction of fluid flow. Cross lines in subcapsular sinuses (SS), intermediate sinus (IS), and medullary sinuses (MS) indicate the networks of intraluminal reticular cells (i.e., lymphatic endothelial cells).

F: follicle, Af: afferent lymphatic vessels, Ef: efferent lymphatic vessels, LL: lymphatic labyrinth.

©2003 Archives of Histology and Cytology. All rights reserved. Ohtani O, Ohtani Y, Carati CJ et al: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression. Arch Histol Cytol, 2003, **66**: 261– 272.

内に侵入し、そこで増殖してがん結節を形成する。結 節の周辺にはLLC細胞が散在し、単独のものや小さな 細胞集団を形成しているものもある。髄洞を通過した LLC細胞は次のリンパ節へ転移する。腫瘍細胞が髄洞 を通過できないようにすることもがん治療の戦略とし て重要かもしれない。

謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究(B) 課題番号16390047)により行われた。

文 献

- 大谷 修,加藤征治,内野滋雄:リンパ管 形態・機 能・発生.西村書店,新潟,1997.
- Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell, 1999, 98: 769– 778.



Figure 7 Schematic of a closer view of the boxed area in Fig. 6. Thicker white arrows indicate a possible time sequence for the uppermost lymphocyte flowing in an HEV, which subsequently rolls on (thinner white arrow), then adheres to the luminal surface, and finally penetrates through its endothelium to enter a lymph node parenchyma. Black arrows indicate that lymphocytes in the lymph node parenchyma move towards the lymphatic labyrinths and penetrate through their endothelium to enter the labyrinths. Yellow arrows indicate lymph flow direction.

©2003 Archives of Histology and Cytology. All rights reserved. Ohtani O, Ohtani Y, Carati CJ et al: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression. Arch Histol Cytol, 2003, **66**: 261– 272.

- 3) Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H et al: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol, 1999, **154**: 385– 394.
- 4) Banerji S, Ni J, Wang SX et al: LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. J Cell Biol, 1999, 144: 789–801.
- 5) Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T et al: Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 3566–3570.
- 6) Gunn MD, Tangemann K, Tam C et al: A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 258–263.
- 7) Ebata N, Nodasaka Y, Sawa Y et al: Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels. Microvasc Res, 2001, 61: 40–48.

- 8) Gerli R, Solito R, Weber E et al: Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics. Lymphology, 2000, 33: 148– 157.
- Leak LV, Burke JF: Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. Am J Anat, 1966, 118: 785–809.
- 10) Sabin FR: On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. Am J Anat, 1902, 1: 367–391.
- Oliver G: Lymphatic vasculature development. Nat Rev Immunol, 2004, 4: 35–45.
- 12) Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S et al: Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. EMBO J, 2001, 20: 4762–4773.
- 13) Cueni LN, Detmar M: New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. J Invest Dermatol, 2006, **126**: 2167–2177.
- 14) Ohtani O: Three-dimensional organization of the connective tissue fibers of the human pancreas: a scanning electron microscopic study of NaOH treated-tissues. Arch Histol Jpn, 1987, **50**: 557–566.
- 15) Ohtani O, Ushiki T, Taguchi T et al: Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: a demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method. Arch Histol Cytol, 1988, **51**: 249–261.
- 16) Ohtani Y, Ohtani O, Nakatani T: Microanatomy of the rat diaphragm: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. Arch Histol Cytol, 1993, 56: 317–328.
- 17) Ohtani Y, Ohtani O: Postnatal development of lymphatic

vessels and their smooth muscle cells in the rat diaphragm: a confocal microscopic study. Arch Histol Cytol, 2001, **64**: 513–522.

- 18) Shao XJ, Ohtani O, Saitoh M et al: Development of diaphragmatic lymphatics: the process of their direct connection to the peritoneal cavity. Arch Histol Cytol, 1998, 61: 137–149.
- 19) Rutkowski JM, Boardman KC, Swartz MA: Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291: H1402– H1410. doi: 10.1152/ajpheart.00038.2006
- 20) Ohtani O, Ohtani Y, Carati CJ et al: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression. Arch Histol Cytol, 2003, 66: 261–272.
- 21) Renkin EM: Some consequences of capillary permeability to macromolecules: Starling's hypothesis reconsidered. Am J Physiol, 1986, **250**: H706–H710.
- 22) Wissmann C, Detmar M: Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. Clin Cancer Res, 2006, 12: 6865–6868.
- 23) Murata H, Kawano S, Tsuji S et al: Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. Am J Gastroenterol, 1999, 94: 451–455.
- 24) Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y et al: Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. Dis Colon Rectum, 2006, **49**: 392–398.
- 25) Doki Y, Murakami K, Yamaura T et al: Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of Lewis lung carcinoma cells in mice. Br J Cancer, 1999, **79**: 1121–1126.

Recent Development in Morphology of Lymphatic Vessels and Lymph Nodes

Osamu Ohtani and Yuko Ohtani

Department of Anatomy, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan

Key words: lymphatic vessel, lymphangiogenesis, lymph node, metastasis, sentinel node

This paper reviews the morphology of lymphatics and lymphangiogenesis *in vivo*, the microenvironments that promote lymphangiogenesis *in vitro*, and the structure and function of lymph nodes. Lymphatic capillaries consist of a single layer of lymphatic endothelial cells (LECs) and have valves, whereas collecting lymphatics are endowed with smooth muscle cells (SMCs) and valves in addition to a single layer of LECs. In the embryonic rat diaphragm, LECs presumably first migrate according to interstitial fluid flow and later join to form lymphatic vessels. SMCs of the collecting lymphatics are apparently differentiated from mesenchymal cells. LECs cultured on Cell Culture Inserts under a lowoxygen condition proliferate very well and form lymphatic networks. LECs cultured on collagen fiber networks with natural three-dimensional (3D) architecture in low oxygen rapidly form 3D lymphatic networks. The lymph node is organized to initiate an immune response as a critical crossroad for encounter between antigen-presenting cells, antigens from lymph, and lymphocytes recruited into nodes from the blood. The node consists of spaces lined with LECs and parenchyma. High endothelial venules in the node strongly express Aquaporin-1, suggesting their involvement in net absorption of water from lymph coming through afferent lymphatics. Metastasis of malignant tumors to nodes is briefly reviewed. (J Jpn Coll Angiol, 2008, **48**: 107–112)

> Online publication August 6, 2008 脈管学 Vol. 48, 2008