

センチネルリンパ節とリンパ行性癌転移

竹内 裕也 北川 雄光

要 旨：乳癌では，センチネルリンパ節 (sentinel node: SN) 理論の妥当性，臨床的有用性が実証され，SN転移診断に基づく個別化縮小手術が実践されている。今後は，早期胃癌を対象にsentinel node navigation surgery (SNNS) の臨床応用が積極的になされていくものと考えられ，現在胃癌SN微小転移検出のための術中迅速RT-PCR法の開発が行われている。SN微小転移は単に解剖学的な要因だけでなく，SNにおける局所免疫抑制作用やリンパ管新生など多くの因子がその転移成立に関与していると考えられ，転移成立機序の解明と治療法の開発が期待される。

(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 137-142)

Key words: sentinel node, breast cancer, gastric cancer, RT-PCR, micrometastasis

はじめに

一般・消化器外科領域においてリンパ節郭清の縮小・省略を目指した低侵襲機能温存手術として，sentinel node navigation surgery (SNNS) が注目されている。センチネルリンパ節 (sentinel node: SN) とは，腫瘍原発巣から直接リンパ流を受けるリンパ節のことであり，最初のリンパ節微小転移が発生する場所と考えられている (SN理論)。さらにいえばSNにリンパ節転移がなければその他のリンパ節転移は生じていないと判断することができ，SNに集中した病理学的あるいは分子生物学的転移診断を行うことにより，時間的，経済的に効率よいリンパ節微小転移診断を行うことができる。SNNSとは，このSNの分布 (SN mapping) とSN生検による転移の有無を指標として，リンパ節郭清を個別的に縮小ないし省略し，それに伴って切除範囲を最小限とすることを目的とした手法である。

すでに悪性黒色腫や乳癌では，SN理論の妥当性，臨床的有用性が実証され¹⁻⁴⁾，SN転移診断に基づく個別化縮小手術が実践されている。消化器癌領域では，SN同定から転移診断に至るまでいまだ多くの技術的課題を残しているが，早期胃癌は消化器癌のなかでSN理論研究が最も進んだ領域であり，SN転移診断に基づく胃機能温存・個別化縮小手術への応用が期待されている。

一般・消化器外科領域におけるSNNS臨床応用の現状と展望

(1) 乳癌

乳癌に対する多くのfeasibility studyにより，乳癌におけるSN理論の妥当性が実証され，欧米ではSNNSはcN0乳癌に対する標準的な術式となっている^{3, 4)}。わが国でもSNNS研究会により2003年に乳癌SNNSガイドラインが策定され，大規模多施設共同研究が進められている一方で，cN0乳癌に対してはすでに多くの施設で日常臨床としてSNNSが行われている⁵⁾。

乳癌におけるSNNSは，これまで長年にわたり行われてきた腋窩リンパ節郭清をSN生検結果により省略するという画期的な治療法の開発につながり，患者に対して大きな恩恵をもたらした。cN0乳癌においては通常SNは腋窩に存在しているが，SN転移陰性であればSN以外の腋窩リンパ節郭清の省略が可能であり，術後高頻度に発生していた患側上肢のリンパ浮腫や知覚障害，挙上障害などを有意に減少させた。現在，SNNS研究会により長期フォローアップによるSNNSに基づいた腋窩リンパ節郭清省略の臨床的意義について検証中であるが，当教室における2002年1月以降のSN転移陰性腋窩リンパ節郭清省略例の予後は，健存率，生存率において過去の腋窩郭清群と比して有意差を認めなかった。

また腋窩郭清を省略した436例において観察期間中央値28カ月の時点では腋窩リンパ節再発は認めていない。現在米国ではSNNSと腋窩リンパ節郭清の長期予後と比較検討する第III相臨床試験が進められており、結果が待たれるところである。

乳癌は他の固形癌に比べ、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、分子標的治療などさまざまな治療法の組み合わせが可能であり、今後も新しい集学的治療が開発されていくものと考えられる。乳癌においてSNに集中した病理学的あるいは分子生物学的転移診断を行うことにより、正確で効率よいリンパ節微小転移診断を行うことが可能となり、リンパ節転移診断と局在診断に基づいた集学的治療法が開発されていくことが期待される。

AJCC (American Joint Committee on Cancer) 分類におけるリンパ節微小転移の意義に関して、乳癌においては径2mmまでの微小リンパ節転移が必ずしも腋窩リンパ節転移としての臨床的意義を有さないとの報告がみられているが、今後さらに精度の高い検証を行う必要がある。また乳癌において、1個ないし2個のSNにのみ転移がみられるような症例が比較的多く存在することが明らかとなっており、このような症例の選別と腋窩郭清の是非が今後の課題となろう。

(2) 胃癌

消化器癌領域において現時点で、機能温存・個別化縮小手術への応用が最も期待される対象はcT1N0胃癌である。内視鏡下トレーサー注入、radioisotope (RI) 法の導入などにより、胃癌に対するSN同定手技は飛躍的に向上し (Fig. 1)、これまでに多数の単施設研究が行われ、良好なSN同定率 (90~100%)、転移検出感度 (85~100%) が報告されている。教室では2006年までに、cT1N0ないしcT2N0胃癌症例382例に対してRI法+色素併用法によるSN生検を施行している (SN同定率96%、転移検出感度99%)^{6, 7)}。現在、色素 (Lymphazurin™) とRIを内視鏡下に粘膜下注入する併用法 (SNNS研究会/厚生労働省がん研究助成金研究班) による多施設共同研究が進行中であり、今後SNNS標準手術手技の確立に向けてその結果が注目されている (Table 1)。

早期胃癌においてSN理論が成立するのであれば、乳癌のようにSN転移陰性早期胃癌は郭清の完全省略と胃 (原発巣) の局所切除だけで根治術とすることが理論的

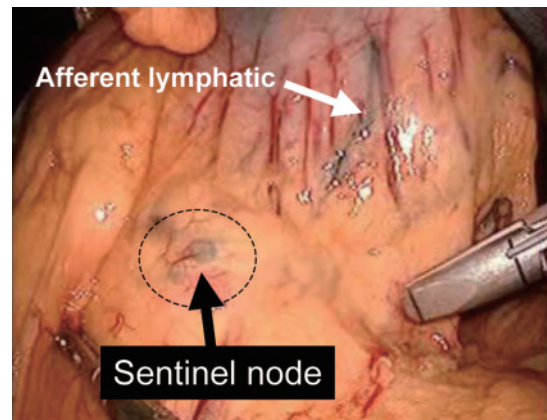


Figure 1 Laparoscopic sentinel node mapping for early gastric cancer.

には可能である。しかし、SNは転移陰性であるのにSN以外のリンパ節に転移が認められる、いわゆる偽陰性症例の存在が皆無とはいえない現状では、より安全域のある根治性を損なわない術式が要求される。つまり、SNを含むそのリンパ領域 (SN basin: Fig. 2) を選択的に郭清する術式 (SN basin dissection) が推奨されている⁸⁾。SN同定の技術的問題や術中迅速診断の見逃しにより、偽陰性が生じた場合でも、実際のリンパ節転移はSN basin内に存在し、また限定される可能性が高いことが明らかとなっている。一方、SNに明らかな転移が認められる症例ではSN領域外にも転移が存在する可能性が否定できないため、現時点では標準的な切除郭清術が必要である。

今後、早期胃癌に対するSNNSの臨床応用に向け、術中SN同定技術、微小転移診断技術の精度向上が必須であるが、われわれは現時点で安全性を損なわない方策としてSN basin dissectionの施行と術中迅速RT-PCR法の開発 (後述) が重要であると考えている。

腹腔鏡下胃癌手術手技の向上により、内視鏡下手術による低侵襲性の確保とSNNSによる機能温存・縮小手術の組み合わせが技術的に可能となっている⁶⁻⁹⁾。現在行われている多施設共同研究の結果により、胃癌におけるSN理論の妥当性が実証され、SN生検標準手術手技が確立すれば、今後は積極的に腹腔鏡下胃癌手術にSNNSを応用した縮小手術が取り入れられることが予想される。

Table 1 Standard protocol for sentinel node mapping for gastric cancer
(Japanese Society for Sentinel Node Navigation Surgery)

Indication
cT1/T2 N0M0 gastric cancer (single lesion, no previous treatment) Diameter of primary lesion < 4.0 cm
Radio-guided method
Tracer: 99m Technetium tin colloid (0.3 mCi at the time of surgery) Administration: Endoscopic submucosal injection (0.5 ml × 4 points) Timing of administration: the day before surgery SN detection: Gamma probing (GPS Navigator, Tyco HealthCare Japan)
Dye-guided method
Tracer: 1% Isosulfan blue (Lymphazurin, Tyco HealthCare Japan) Administration: Endoscopic submucosal injection (0.5 ml × 4 points) Timing of administration: the day before surgery SN detection: Identification of blue stained nodes within 15 min

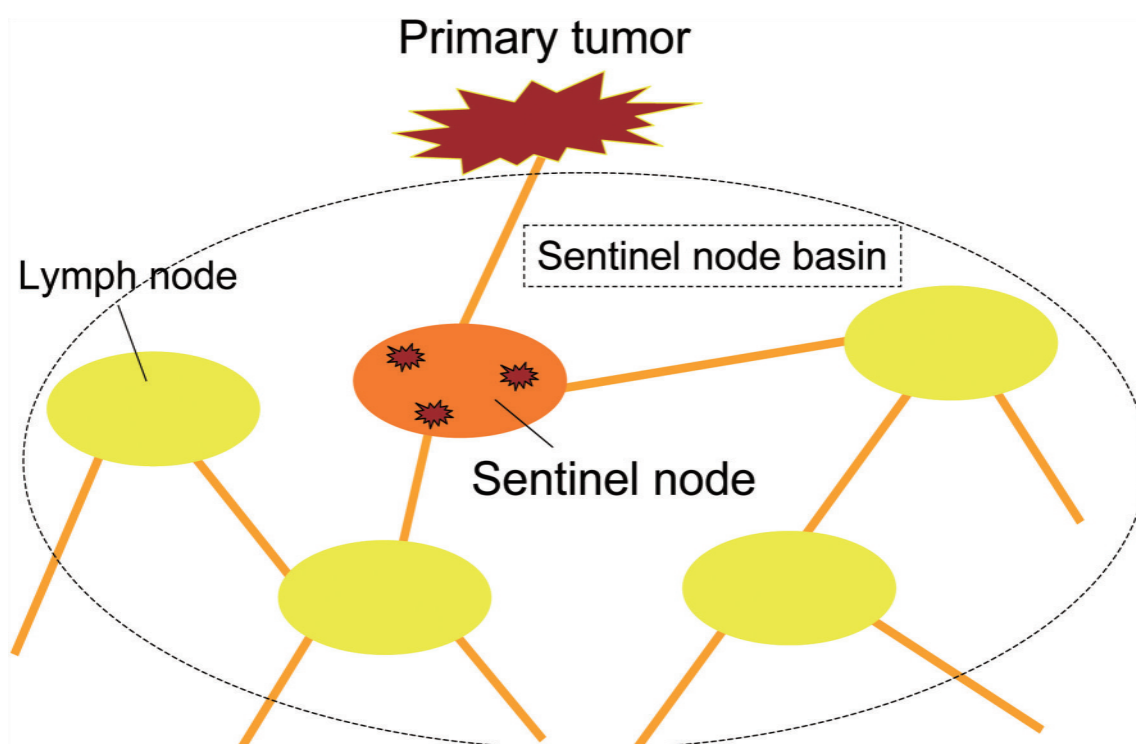


Figure 2 Sentinel node and sentinel node basin. Sentinel node basin dissection is a sort of focused lymph node dissection containing sentinel nodes.

胃癌センチネルリンパ節術中迅速転移診断

悪性黒色腫や乳癌のような体表の癌腫では、生検されたSNの永久標本の病理結果により後日改めて領域リンパ節の郭清術を追加することが可能であるが、胃癌のような腹腔内臓器でSN転移診断に基づく縮小手術を行うには、術中のSN転移診断が必須である。胃癌微小転移検出のための術中迅速病理診断は、従来リンパ節の最大断面を含む数切片の限られたスライドの顕微鏡下での検索であり、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色だけではその検出感度に限界があった。これに抗サイトケラチン抗体などを用いた免疫組織染色を加えることでSN微小転移検出感度が向上することが報告されている。しかし、H&E染色と同様に数切片の限られたスライドの検索であることや、frozen sectionはパラフィン包埋切片と比べ、病理診断が困難な点があり、SN内の微小転移を見落とす可能性を完全には否定できない。

近年reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法やone-step nucleic acid amplification (OSNA)法など分子生物学的手法を用いて形態学的には捕捉しえない癌細胞まで検出することが可能となってきた。これらは従来の病理学的診断法よりも一般的に高感度であり、数スライドだけの検索ではなくリンパ節全体を一度に検索できる利点を有する。しかし、RT-PCR法におけるmRNA抽出からRT, PCRに至る過程でのコンタミネーション(偽陽性)や、手技の不確実さによる偽陰性の問題、PCRの再現性の問題など、分子生物学的手法による微小転移検索は極めて高度なテクニックを必要とする手技といえる¹⁰⁾。

Arigamiら¹¹⁾は、RI法によるSN生検を施行したcT1, cT2N0胃癌患者61例の計1,410個のリンパ節で病理組織学的検索とreal time RT-PCR法の比較検討を行っている。それによるとSNのH&E染色で転移陽性と診断された患者は5例(8.2%)、SN抗サイトケラチン染色陽性例は8例(13.1%)に認められた。SNの免疫組織染色陰性例53例のうち、SNのRT-PCR法で陽性であったものは13例(25%)あった。SNのRT-PCRが陰性であった40例のうち、非SNでRT-PCRが陽性であった。つまりmolecular levelでの偽陰性例はcT2症例1例のみであった。この結果は、cT1N0症例であれば、molecular levelでも偽陰性症例は認められないということとなり、cT1N0

胃癌症例におけるSN理論の妥当性をmolecular levelでも証明したものである。

われわれは胃癌に対するSN微小転移診断法としてRoche Diagnostics社とCK19, CK20, CEAをマーカーとしたreal time RT-PCR法を共同開発し、現在臨床応用に向けて多施設共同研究を計画中である¹²⁾。この方法は、検体採取から結果が出るまで約60分と術中迅速診断に有用である。これまでに96例のSN生検施行例について検討を行い、molecular levelでの偽陰性症例を4例に認めている。しかしながら、これら偽陰性を生じた非SNはいずれもSNと同一のlymphatic basin内に認められており、今後SN転移診断に基づく個別化縮小手術において最も重要な点である安全性の担保としてSN basin dissectionは不可欠であると考えられる。

早期胃癌における癌微小転移やisolated tumor cells (ITC)の臨床的意義についてはいまだ明らかではなく、長期予後の検討も含め今後さらなる検証が必要である。

センチネルリンパ節癌転移のメカニズム

腫瘍原発巣から直接リンパ流を受けるSNへの癌転移の成立は、単に腫瘍内あるいは傍腫瘍微小リンパ管内に癌細胞が侵入し、リンパ流に乗ってSNに癌細胞が到達するという解剖学的な要因だけで説明がつくのだろうか。SNは原発巣から腫瘍特異抗原の情報が最初に到達するリンパ組織であり、局所免疫応答の場としても極めて重要な役割を担っている。なぜSNが癌転移を食い止められないか、この点は大きな興味の対象である。SNにおける局所免疫の状態は、必ずしも癌による全身性の免疫抑制を反映しているものではないが、最近の研究で、腫瘍細胞がリンパ行性転移を起こすためにSNの局所免疫を抑制するメカニズムが少しずつ明らかになってきている。

Nagataら¹³⁾は、ラットの腸間膜SN節モデルを用いて、リンパ節転移成立時の経時的な形態変化とリンパ節内のサイトカインの変動を観察した。リンパ節にmigrateした癌細胞は、当初marginal sinusに存在することから、marginal sinusはSNを通過しようとする癌細胞のmechanical barrierとなっていることが推測される。またmarginal sinusに癌細胞が充満した状態を経て、腫瘍は堰を切ったようにcortex やparacortexに浸潤していく。このとき、SN内のマクロファージから産生されるtumor necrosis factor (TNF) α やinterleukin (IL)-1 β , IL-2

は、転移初期には著明に増加するもののリンパ節内腫瘍の増大に伴い、経時的に抑制されることを明らかにした。彼らはこのマクロファージがSN転移成立の阻害に重要な役割を果たしていると考えしている。

Paracortical areaには樹状細胞や各種リンパ球が存在するが、それらの数や活性は個々のリンパ節において異なっている。最近の報告では、SNと非SNを比較すると、SNではparacortexの樹状細胞の数、maturityとも有意に減少し、樹状細胞のmeshworkも有意に少なくなっていることが明らかとなった^{14, 15)}。さらに、T細胞の数やその活性においてもSNは非SNより劣っていた¹⁶⁾。またnaive T細胞が抗原提示樹状細胞を認識するために通過するhigh endothelial venules (HEV)の数もSNは非SNより有意に減少していた。これらの結果は、SNが腫瘍原発巣からのimmune modulationを受け、SN内で癌細胞が生存できる環境、転移成立しやすい環境になっていることを示唆するものである。

腫瘍原発巣から産生されるIL-10がSNにおける樹状細胞の活性を抑制していることが報告されている。また腫瘍のリンパ管増殖因子であるVEGF-C/Dや血管増殖因子VEGF-Aの発現が癌のリンパ行性転移と深くかかわっていることが最近数多くの報告で明らかとなっている¹⁰⁾。

癌細胞がケモカインレセプターを発現しており、各臓器から分泌されるケモカインによって癌細胞が遊走し、臓器特異性転移が成立するというMüllerら¹⁷⁾の報告は、Paget¹⁸⁾の“seed and soil”theoryを説明する結果として注目された。その後、数多くの追加報告があり、癌細胞がケモカイン、ケモカインレセプターを発現し、周囲の免疫担当細胞や、線維芽細胞との相互作用によって浸潤・転移能を獲得していくことが明らかとなりつつある。われわれは、ケモカインレセプターCCR7がメラノーマ細胞において発現しており、SN転移と関係していること、またそのリガンドであるケモカインCCL21はSNに高発現しているが、転移形成とともに有意に抑制されることを報告した¹⁹⁾。CCL21は先に述べたHEVから主に分泌されていることから、何らかのメカニズムによりSN転移形成にCCL21の抑制が関与していることが示唆される。

おわりに

乳癌における腋窩リンパ節郭清省略に代表される

SNNSによる機能温存・縮小手術による恩恵は大きく、今後消化器癌、特に早期胃癌を対象にSNNSの臨床応用が積極的になされていくものと考えられる。そのためには胃癌SN微小転移検出のための術中迅速RT-PCR法の開発が急務であろう。SN微小転移は単に解剖学的な要因だけでなく、SNにおける局所免疫抑制作用やリンパ管新生など多くの因子がその転移成立に関与していると考えられ、このメカニズムの解明により今後リンパ行性転移の抑制やSN転移病変を標的とした新しい治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Morton DL, Wen DR, Wong JH et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 1992, **127**: 392–399.
- 2) Reintgen D, Cruse CW, Wells K et al: The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg*, 1994, **220**: 759–767.
- 3) Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM et al: Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*, 1994, **220**: 391–398.
- 4) Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V et al: Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet*, 1997, **349**: 1864–1867.
- 5) 井本 滋, 和田徳昭, 山内雅佐子: 乳癌のSNNS: 臨床応用の現況と多施設共同試験. *臨外*, 2004, **59**: 559–562.
- 6) Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M et al: The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer. *Surg Clin North Am*, 2000, **80**: 1799–1809.
- 7) Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M et al: Sentinel lymph node mapping in esophageal and gastric cancer. *Cancer Treat Res*, 2005, **127**: 123–139.
- 8) 竹内裕也, 才川義朗, 和田則仁 他: 早期胃癌におけるセンチネルリンパ節生検の手法と課題. *消化器外科*, 2007, **30**: 1481–1487.
- 9) Saikawa Y, Otani Y, Kitagawa Y et al: Interim results of sentinel node biopsy during laparoscopic gastrectomy: possible role in function-preserving surgery for early cancer. *World J Surg*, 2006, **30**: 1962–1968.
- 10) Takeuchi H, Kitajima M, Kitagawa Y: Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Sci*, 2008, **99**: 441–450.
- 11) Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y et al: Evaluation of sentinel node concept in gastric cancer based on lymph node

- micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Ann Surg*, 2006, **243**: 341–347.
- 12) Matsuda J, Kitagawa Y, Fujii H et al: Significance of metastasis detected by molecular techniques in sentinel nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2004, **11**: 250S–254S.
- 13) Nagata H, Arai T, Soejima Y et al: Limited capability of regional lymph nodes to eradicate metastatic cancer cells. *Cancer Res*, 2004, **64**: 8239–8248.
- 14) Cochran AJ, Huang RR, Lee J et al: Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**: 659–670.
- 15) Huang RR, Wang HJ, Lin LL et al: MHC-class II molecules expression by dendritic cells correlates with activated OPD4+ T cell in of Sentinel and Non-Sentinel nodes from Melanoma patients. *Mod Pathol*, 2004, **17**: 382.
- 16) Huang RR, Paul E, Wang HJ et al: Sentinel lymph nodes are immunosuppressed whether or not they contain metastatic melanoma. *Mod Pathol*, 2005, **18**: 379.
- 17) Müller A, Homey B, Soto H et al: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001, **410**: 50–56.
- 18) Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1889, **1**: 571–573.
- 19) Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M et al: CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**: 2351–2358.

Sentinel Node and Mechanism of Lymphatic Metastasis

Hiroya Takeuchi and Yuko Kitagawa

Department of Surgery, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: sentinel node, breast cancer, gastric cancer, RT-PCR, micrometastasis

The sentinel node (SN) concept has revolutionized the approach to the surgical staging of breast cancer, and the technique can yield patient benefit by avoiding various complications due to unnecessary prophylactic complete lymph node dissection in cases with negative SNs for cancer metastasis. Moreover various types of function preserving surgery for cT1N0 gastric cancer can be individually performed based on SN concept. We are establishing intra-operative system of real time RT-PCR assay for SN navigation surgery in early gastric cancer. Recent studies have demonstrated that primary tumors can actively induce lymphangiogenesis and promote SN metastasis. Also SNs dramatically show morphological, phenotypical and functional changes that indicate immune suppression by tumor cells. Further studies may develop a novel therapy that can prevent or eradicate SN metastasis. (J Jpn Coll Angiol, 2008, **48**: 137–142)