

学位論文題名

悪性黒色腫の転移経路に関する動物実験:リンパ行性転移と 血行性転移の関連について

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

悪性黒色腫はメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、高率にリンパ節転移を来し、進行例の予後は不良で、化学療法や免疫療法などの各種治療法に対して強ことが知られている。本研究は悪性黒色腫の予後に関わる、リンパ行性転移および血行性転移について、以下の2点を検証することを目的として行った。

悪性黒色腫に特徴的なリンパ行性転移として、*in-transit* 転移がある。*In-transit* 転移は原発巣から所属リンパ節間のリンパ管内で腫瘍が増殖することで生じる。*In-transit* 転移は局所の病態であるにもかかわらず、その予後は不良である。しかし、その性質については十分に解明されているとは言えない。その理由の一つとして動物実験で *in-transit* 転移を再現できていないことが挙げられる。本研究では動物実験で悪性黒色腫の *in-transit* 転移を再現し、予後不良であることのメカニズム解明を1つ目の目的とした。

また、臨床におけるセンチネルリンパ節転移と遠隔転移の発生に関する検討から、悪性黒色腫の転移経路に関して次のような仮説を立てた。即ち悪性黒色腫はまず原発巣からリンパ行性にセンチネルリンパ節に転移した後、リンパ節内に存在するリンパ流と血流をつなぐシャントを通過して血行性の遠隔転移を生じるというものである。この仮説の正当性を検証することを2つ目の目的とした。

【材料と方法】

上記2点を検証するために、マウスの後肢をリンパ浮腫状態にして、そこに悪性黒色腫細胞を移植した。*In-transit* 転移はリンパ流のうっ滞がある状態で生じやすいことが知られていること、リンパ管内での腫瘍細胞のトラップという *in-transit* 転移の病態を考慮し、リンパ浮腫状態の脚に腫瘍を移植することで再現が可能であると推測した。また、リンパ浮腫状態では原発巣からのリンパ流は所属リンパ節へは到達できない。リンパ節内にリンパ流と血流をつなぐシャントが存在し、悪性黒色腫細胞がそこを通過して遠隔転移を生じるという仮説が正しければ、シャントに到達できずに遠隔転移は減少することが予想される。

マウス後肢のリンパ浮腫モデル作成の際には、マウス鼠径部への放射線照射と、リンパ管結紮、リンパ節切除、および全周性の皮膚欠損作成を行った。蛍光リンパ管造影と脚周径の計測により、リンパ浮腫状態を再現できていることを確認した。

実験には C57BL/6 マウス、悪性黒色腫細胞株は B16-F10 の同系移植系を用いた。腫瘍の生体内での動態把握、細胞数の定量を容易にするために B16-F10 に luciferase 遺伝子を導入し、安定発現させた細胞株(B16-F10-luc2)を使用した。生体内での転移巣の観察には luciferin を腹腔内投与後に *in vivo* Bioluminescence imaging を使用した。また、抗 CD31 抗体・抗 Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1 (LYVE-1) 抗体による免疫染色を行い、腫瘍内および腫瘍周囲の血管・リンパ管面積を計測した。細胞増殖の指標として抗 Ki-67 抗体による免疫染色を行い、陽性率をカウントした。

定量 Reverse Transcription-PCR(RT-PCR)を用いて腫瘍の性質を検討した。転移能の指標として細胞接着因子 E-Cadherin 発現、E-Cadherin 発現を制御する Snail、Epithelial-mesenchymal transition(EMT)の指標として間葉系マーカーの alpha smooth muscle actin(α -SMA)、リンパ管増殖因子として Vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C)の発現を検討した。遠隔転移の指標としての肺転移定量は、マウスの肺から luciferase を抽出し、luciferin を添加して発光強度を計測することで行った。

【結果】

リンパ浮腫状態の後肢へ悪性黒色腫細胞を移植することで in-transit 転移を再現可能だった。また、リンパ浮腫状態のマウスでは、通常では見られないような移植後早期からの遠隔リンパ節(腋窩リンパ節)への転移がみられた。In-transit 転移巣では腫瘍細胞の Ki-67 陽性率が有意に高かった。リンパ浮腫状態に移植した腫瘍では、リンパ管の面積・血管面積が増加していた。リンパ浮腫の腫瘍・in-transit 転移では、通常と比較して E-Cadherin の発現が低下している傾向があった。 α -SMA の発現は、通常と比較してリンパ浮腫で有意に低下していた。また、リンパ浮腫状態では通常と比較して肺転移が有意に増加していた。

【考察】

In-transit 転移を動物実験で再現した報告はこれまでに無かったが、リンパ浮腫状態のマウス後肢に悪性黒色腫細胞を移植することで in-transit 転移を再現可能であった。リンパ浮腫状態ではリンパ管の面積が増加しており、リンパ行性転移である in-transit の形成に寄与していると思われた。

In-transit 転移巣では、Ki-67 陽性率の上昇・E-Cadherin の発現低下が起こっており、腫瘍の増殖能、転移能が高まっていることが示唆され、予後不良である要因の一つであると考えられた。 α -SMA 発現の検討結果からは、転移・増殖能の亢進は EMT とは異なるメカニズムで生じていることが示唆された。また、リンパ浮腫状態では血管の面積が増加しており、リンパ浮腫マウスで肺転移が多かった原因の一つでとなっている可能性も考えられた。

リンパ浮腫マウスでは、通常と比較して肺転移が増加していた。リンパ節内のシャントに到達できない状態では遠隔転移は減少するという仮説とは相反する結果となり、仮説が誤っている可能性が示唆された。しかし、リンパ浮腫マウスでは遠隔リンパ節への転移が観察されており、本研究に用いたモデルでは腫瘍がリンパ節内のシャントへと到達できない状態を完全には再現できていなかった。また、リンパ浮腫では増殖能・転移能の亢進した in-transit 転移を生じていたことから、その影響が大きいためにリンパ節内のシャントによる影響がマスクされた可能性も考える必要がある。その他に、リンパ浮腫モデルではリンパ節を切除した事により、局所の腫瘍免疫能が低下していたことが遠隔転移の増加に寄与していた可能性も否定できないと考えられた。

【結論】

リンパ浮腫状態のマウス後肢へ悪性黒色腫細胞を移植することで、in-transit 転移を再現することが可能だった。In-transit 転移では細胞の転移能・増殖能が高まっていることが示唆され、予後不良の原因となっている可能性が考えられた。転移能・増殖能の亢進は EMT とは異なるメカニズムで起こっていることが示唆された。

仮説に反してリンパ浮腫状態では遠隔転移が減少しており、悪性黒色腫が転移の際にリンパ節内のシャントを通過しているかどうかについては、本研究では検証が不十分であると考えられ、更に検討する必要があると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	松 野 吉 宏
副 査	教 授	山 本 有 平
副 査	准教授	濱 田 淳 一
副 査	教 授	秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

悪性黒色腫の転移経路に関する動物実験:リンパ行性転移と 血行性転移の関連について

申請者は以下の内容について発表した。

悪性黒色腫の in-transit 転移を再現した動物実験モデルを作製しその性質を解析すること、およびリンパ節内の血管・リンパ管接続を介した悪性黒色腫の転移を証明することを目標として研究を行った。

本研究ではまずマウス後肢のリンパ浮腫モデルを作製した。過去に報告のあったラットのモデル作製法を応用して、マウスの後肢をリンパ浮腫状態にすることに成功した。そこに悪性黒色腫細胞を移植することで in-transit 転移の再現が可能だった。In-transit 転移巣では腫瘍の増殖能・転移能が亢進していた。

また、リンパ節内の血管・リンパ管間の接続を介した転移が実際に起こっているならば、リンパ節を切除したリンパ浮腫状態では、転移経路が遮断されているため遠隔転移が減少すると予想されたが、実際には遠隔転移が増加した。In-vivo imaging によりリンパ浮腫マウスへの腫瘍移植モデルでは側副リンパ流によって遠隔リンパ節である腋窩リンパ節への転移が観察され、リンパ節内の血管・リンパ管接続を介した転移を完全に遮断することができていなかったことが明らかとなった。遠隔転移の増加した原因は、転移能・増殖能の亢進した状態である in-transit 転移を生じたこと、リンパ節切除によって局所的な免疫不全状態に陥っていたことなどが関与していると推測された。

血管・リンパ管接続を介した転移経路は証明できなかったが、世界で初めて in-transit 転移を動物実験で再現することに成功し、その性質を明らかにすることができた。

発表の後、以下の如く質疑応答がされた。

濱田准教授から、病理組織における血管とリンパ管の評価において、数や太さではなく面積を計測したことの妥当性について質問があった。それに対して申請者は、本研究では脈管の増加と拡張の双方が生じていることが推測されたため、包括的に評価するために面積の計測を選択したと回答した。

さらに濱田准教授から肺転移が多かった個体の病理組織において、腫瘍の脈管浸潤が多く観察されたのかに関して質問があった。それに対して申請者は in-transit を生じた個体ではリンパ管侵襲は多く観察され、肺転移が多かった個体では血管侵襲が目立つ傾向があったと回答した。

秋田教授から悪性黒色腫以外の皮膚悪性腫瘍では in-transit 転移は見られないのかと質問があった。申請者は基底細胞癌や有棘細胞癌では in-transit 転移は起こらないが、悪性黒色腫では約6%で in-transit 転移を生じるというデータを引用し、悪性黒色腫はリンパ行性転移を生じやすいことを裏付けていると回答した。

さらに秋田教授から in-transit 転移の動物実験モデルを用いると、どのように臨床へ寄与できるか質問があった。申請者は新治療法を開発する際の効果検証に利用可能なこと、in-transit 転移に特異的な分子を解明し分子標的薬の開発へつながることを説明した。

次に松野教授から、臨床検体における in-transit 転移に特異的な所見が、過去に報告されているのかについて質問があった。申請者は in-transit 転移では MIB-1 index が高かったという臨床データの報告例を引用し、本研究と矛盾しない内容であることを説明した。更に今後は臨床検体を用いて更なる検討につなげていく考えを示した。

また松野教授から in-transit 転移巣における腫瘍細胞の性質の変化はどのような機序で生じているのかについて質問があった。申請者は2つの仮説について説明した。一つはリンパ浮腫という特殊な環境が腫瘍細胞の性質を変化させたという考え、もう一つは in-transit 転移の過程において高悪性度な細胞の選択が生じたという考えだった。

さらに松野教授からは悪性黒色腫細胞とリンパ管内皮細胞の相互作用が、in-transit 転移の形成にどのように関与していたのかについて質問があった。申請者は悪性黒色腫とリンパ管内皮細胞の相互作用に関与するケモカインに関しても検討を行ったものの、現時点では有用な結果が得られておらず、引き続き解析を進めていく考えを示した。

山本教授から、リンパ節郭清術を行うことは in-transit 転移のリスクとなるのではないかと指摘があった。それに対して申請者は原発巣から所属リンパ節まで、リンパ管を含めて連続的に切除する subtotal integumentectomy の術式について言及し、適応を吟味した上で治療を行うことが重要であり、本研究の結果は必ずしも所属リンパ節郭清の有用性を否定するものではないと回答した。

この論文は、これまで内容を発表した国内の学会および国際学会で高く評価され、悪性黒色腫の病態解明、治療法開発に関する基礎および臨床研究結果に有用な新知見を付与するものと期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。