HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス後肢リンパ浮腫モデルを用いたリンパ管新生因子の発現と悪性黒色腫の転移機構に関する検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	岩嵜, 大輔
Description	配架番号：2278
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12537号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65968
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Iwasaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　岩嵜大輔

学 位 論 文 題 名

マウス後肢リンパ浮腫モデルを用いたリンパ管新生因子の発現と
悪性黒色腫の転移機構に関する検討

(Studies on the expression of lymphangiogenesis factor and the metastatic mechanism of malignant melanoma using an acquired lymphedema model in the mouse hindlimb)

【背景と目的】リンパ管は生体内において、広範な閉鎖循環系のネットワークを血管とともに形成している。末梢組織で血管から漏出した間質液、タンパク質、脂肪、免疫担当細胞などを吸収し、集合リンパ管を介して血管系へと還流する機能を有している。また、リンパ管は末梢組織、臓器とリンパ節をつなぐ脈管であり、細菌などの非自己物質を認識・排除する免疫系ネットワークも形成する重要な器官である。リンパ管は上記のように、生体にとって有意義に働く一方で､病態生理学的には悪性腫瘍の転移経路となる側面もある。リンパ管とリンパ管新生に関する機序については、まだ十分明らかとなっていない。リンパ管が関与する様々な病態の中で、後天性・続発性リンパ浮腫と悪性黒色腫の転移を模倣する動物モデルを作製し、再現することを試みた。このモデルを使用して分子生物学的に解析することでリンパ管新生やリンパ節転移のメカニズムを明らかにすることを目的とした。研究内容を２章に分けて、第一章はマウス後肢リンパ浮腫モデルの確立についての研究を論述し、第二章はリンパ管機能不全を呈した環境における悪性黒色腫の転移動態に関する研究を論述した。

【対象と方法】第一章では、マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製方法を試みた。全身麻酔下で行い、手術用顕微鏡を用いて行った。左後肢のリンパ管を同定した後、左鼠径を全周性に切開して、左鼠径と左膝窩領域のリンパ節郭清を行った。3mm 幅の長方形型のシリコン製のスプリントを 1mm 厚のシリコンシートから作製した。作製したシリコンスプリントを左鼠径の皮膚と筋肉に 6-0 ナイロンで縫合固定して終了とした。術後リンパ浮腫の評価は、蛍光リンパ管造影と後肢周径測定で行った。LYVE1 による免疫組織学的染色と HE 染色により、リンパ浮腫組織の組織学的検討を行った。リンパ浮腫組織を採取して、リアルタイム PCR とウエスタンブロッティングの手法を用いて、VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway の発現を mRNA レベル、タンパクレベルで確認した。

第二章では、マウス後肢のリンパ節郭清レベルを手術操作により段階的に分けて、手術侵襲に伴うリンパ管機能不全が、悪性黒色腫細胞の増殖能と転移能に与える影響に関して検討した。本実験では、手術後のリンパ管機能不全が、腫瘍の増殖能や転移能に及ぼす影響を検討するために以下の 4 群の動物モデルを作製した。A 群:手術操作無しのコントロール群､B 群:左膝窩リンパ節のみ摘出した群､C 群:左膝窩リンパ節と周囲脂肪組織を摘出(膝窩郭清)した群、D 群:左膝窩領域と左鼠径領域を同時に郭清した群、以上の４群とした。蛍の発光遺伝子であるルシフェラーゼを安定的に発現する B16F10Luc2 メラノーマ細胞株を上記４群のマウスの左足に投与した。In vivo bioluminescence imaging system によって、腫瘍からの生物発光の検出による腫瘍動態(増殖、転移)追跡を、非侵襲的かつ経時的に行った。遠隔転移である肺転移の評価も、生物発光の検出により定量した。各群の遠隔リンパ節(左腋窩リンパ節)を RT-PCR で解析して、転移の有無の評価と、炎症・免疫応答に関

わる遺伝子発現の評価を行った。
【結果】第一章では、分子生物学的解析が可能な新たなマウス後肢リンパ浮腫モデルを確立した。手術後、シリコンスプリントを左鼠径に留置した群のマウス(Splinted Lymphedema Model)の左後肢の周径が、コントロールと比較して、有意に増加していることを確認した。組織学的検討では、リンパ浮腫の病態に近似した組織像が得られた。蛍光リンパ管造影では、リンパ液がリンパ管から皮膚へ逆流する現象である Dermal back flow を後肢全体に認めた。リンパ管新生において重要な VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway は mRNA レベル、タンパクレベルにおいて再現性のある発現パターンが得られた。また、これらの発現は浮腫に応じて変動していることが確認された。第二章では、D 群において、早期（腫瘍移植後、1 週間）に、腫瘍細胞からの生物発光が生じるのが確認された。D 群のマウスにおいて 左後肢に in-transit 転移を生じる転移パターンを示した。腫瘍移植後 4 週目においては、D 群が最も生物発光が強いことが示された。D 群において、肺抽出物からの生物発光が最も強いことが確認され、肺転移量が多いことを示す所見であった。他群においても、術後リンパ管の再生におうじて、腫瘍の増殖能と転移能が変動することを確認した。遠隔リンパ節の転移の評価に関しては、D 群がもっとも早く転移することが確認された。リアルタイム PCR にて炎症と免疫応答に関連する遺伝子発現の解析をおこなったところ、VEGF-A の発現において B 群と D 群で有意差を認めたが、他の遺伝子の発現変動に関しては、統計的有意性を認めなかった。以上の結果から、リンパ管・リンパ節の手術侵襲に伴うリンパ管機能不全は、悪性黒色腫の増殖能と転移能に影響を及ぼす因子であることが示された。所属リンパ節において、残存するリンパ節(本研究では左鼠径リンパ節)は、リンパ管機能不全の環境下の悪性黒色腫の増殖と転移を抑制する因子であることが示された。
【考察】過去の論文において、マウス後肢に一定期間リンパ浮腫を持続させ、更に浮腫を呈した組織を分子生物学的に解析して報告したものはない。本研究のマウス後肢リンパ浮腫モデルの確立は、新たな知見であるといえる。従来のモデルと異なり、放射線照射を施行していないので、放射線照射に伴う副作用を排除できる。リンパ浮腫は、慢性炎症を基盤とした複雑な病態であるといわれる。本モデルは、リンパ浮腫に関連する分子生物学的病態を解明する上で有用なツールとなる可能性がある。リンパ管・リンパ節に対する手術侵襲によるリンパ管機能不全は、悪性腫瘍がその環境にあった場合、増殖能や転移能に影響を与えることが示唆された。リンパ管機能不全モデルに移植された悪性黒色腫細胞は、免疫反応に必要な抗原提示能が著しく損なわれ、結果として局所免疫能が低下した免疫不全環境下に存在することになる。こうした高度なリンパ管機能不全の環境下にある悪性黒色腫は、免疫逃避機構を利用して、その増殖能と転移能を高めると考えられる。臨床で行なわれているリンパ節郭清術などの手術侵襲の程度によって、郭清部位より末梢に腫瘍が残存した場合、腫瘍動態が異なってくることが示唆された。
【結論】リンパ浮腫の病態は、まだ十分に明らかとなっていない。本研究で開発したマウス後肢リンパ浮腫モデルは、ヒトのリンパ浮腫に近似した病態を示している。本モデルを使用して、今後のリンパ浮腫に関連した研究が進むものと考えられる。悪性黒色腫の外科治療において、センチネルリンパ節生検やリンパ節郭清術などのリンパ管・リンパ節へ手術的操作は重要な手技である。本研究では、こうした手術操作が、残存腫瘍の動態に影響を与える可能性が示唆された。今後、所属リンパ節の一部の温存を含めて、郭清レベルの選択が重要になってくると考えられる。