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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　岩嵜　大輔

主査　教授　久下裕司
審査担当者　副査　教授　近藤　亨
副査　教授　清水　宏
副査　教授　玉木長良

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)

申請者は以下の内容について発表した。手術によるリンパ系機能不全を背景とした続発性リンパ浮腫と悪性黒色腫の転移を模倣する２つの動物モデルについて発表した。まず、リンパ浮腫モデルを用いて分子生物学的に解析することでリンパ管新生因子の発現検討を論じた。また腫瘍転移モデルを用いてリンパ系機能不全を呈した環境下での悪性黒色腫の動態の検討について論じた。発表後、以下の質疑応答があった。

まず副査の近藤教授から、第一に本研究でのリンパ節・リンパ管新生において、血管新生に関与するとされる snail の発現を認めたかについて、第二に本研究ではリンパ行性の転移を検討しているが、腫瘍転移における血行性転移の頻度・割合はどれくらいであったか、第三にリンパ管新生における Prox1 の役割について、第四に VEGF-C、VEGFR-3、Prox1 の発現に関与する細胞について、第五に血行性転移しやすい B16F10 メラノーマ細胞を使用した理由についての質問があった。申請者は次のように回答した。Snail がリンパ管・リンパ節の新生にどのように関与するかは本研究では検討していない。しかし snail は上皮間葉転換にも関わる因子であるため、第二章の研究で、悪性腫瘍の形質の変化に関与するのではないかと仮説をたてたが、解析は進まなかった。本研究では、血行性転移ではなく、主にリンパ行性転移に焦点をあてて解析しており、血行性転移の頻度・割合に関しては検討していない。Prox1 はリンパ管新生において必須のホメオボックス遺伝子であり、重要な転写因子である。本研究では、浮腫モデルにおける発現パターンを解析したのみで、Prox1 がどのような役割を果たしているかについては検討していない。リンパ浮腫組織におけるマクロファージの浸潤を免疫組織学的染色で認めており、VEGF-C などのリンパ管新生因子の一部は、マクロファージより産生されている可能性がある。当初、肺転移の機序をみるために B16F10 メラノーマ細胞を使用したが、後にリンパ行性転移の研究でも、扱いやすさの点から使用するようになった。

副査の玉木教授から、第一にマウス後肢リンパ浮腫モデルの開発経緯について、第二にマウス後肢リンパ浮腫モデルとヒトのリンパ浮腫の病態の近似性について、第三に浮腫形成における炎症の役割について、第四に生物発光量と腫瘍の量は一致するかについて、第

五に腫瘍移植モデルにおけるリンパ系の手術侵襲の程度とその浮腫形成の程度について、第六に血行性転移を生じる他の腫瘍の移植は検討したかについての質問があった。申請者は次のように回答した。本モデルは、本研究で独自に開発したモデルとなり、浮腫形成の程度、蛍光リンパ管造影の所見、病理組織学的変化などの所見からヒトのリンパ浮腫の病態を反映したモデルとなる。リンパ浮腫の病態における炎症の役割については十分検討していない。ルシフェラーゼによって生じる生物発光の検出は確立された方法であり、生物発光と腫瘍量は相関すると報告されている。本研究では、過去の論文を参考にして、リンパ系への手術侵襲を段階的にわけてモデルを作製した。本研究では、血行性転移については十分解析しておらず、悪性黒色腫以外の腫瘍細胞も今後検討する必要がある。

副査の清水教授から、第一に悪性黒色腫の血行性転移の頻度や機序について、第二に悪性黒色腫の外科的治療におけるセンチネルリンパ節生検の意義について、第三に、リンパ系機能不全を背景とした腫瘍移植モデルを用いて、どのように研究を発展させるかについて質問があった。申請者は次のように回答した。悪性黒色腫は、リンパ行性以外にも、血行性で転移するとされている。リンパ浮腫による組織間圧の上昇があると、腫瘍は近傍の血管へ機械的応力で侵入しやすくなり、結果として血行性転移の頻度が高まると考えられる。現在、臨床ではセンチネルリンパ節が陽性であれば所属リンパ節の郭清術を行う流れになっている。本研究で得られた知見から、所属リンパ節群に残存する腫瘍免疫を担うリンパ節の温存を目的とした郭清範囲の縮小につながると予想される。本研究での腫瘍移植モデルは、悪性腫瘍の転移能や増殖能などの動態を解析したのみで、その機序までは詳細に解明していない。今後の研究では、リンパ系機能不全を呈した環境での腫瘍の形質の変化について解析していく必要がある。悪性黒色腫は、上皮間葉転換によって、転移能を獲得するとの報告もあり、本モデルにおける上皮間葉転換に関わる snail などの発現パターンも評価する必要がある。

最後に主査の久下教授から、第一にマウス後肢リンパ浮腫モデルにおけるシリコンスプリントの役割について、第二に腫瘍移植モデルにおいて手術操作をおこなった後に腫瘍移植を行っているが、その研究的意義についての質問があった。申請者は次のように回答した。本研究の改良浮腫モデルにおいて、スプリントは左鼠径領域の創収縮を抑えた。結果として､肉芽増生と上皮化を緩徐に生じさせ､線維化を伴う瘢痕を形成するようになった。スプリントが無い場合、ヒトの創傷治癒と異なり、早期に創閉鎖してしまい、結果として浮腫が寛解しやすくなる。線維化を伴う瘢痕がリンパ浮腫の持続において重要であると考えられる。過去に報告された創傷治癒モデルの知見を利用している。本研究での第二章のリンパ系機能不全モデルを利用した腫瘍移植モデルは､近年報告された論文を参考にして、作製した。腫瘍移植のタイミングとしては、臨床を反映するならば、手術操作前に行うのが妥当である。予備実験では、腫瘍移植したマウスは衰弱していく傾向にあり、手術侵襲を段階的にわけていくと、死亡していくマウスが多くなった。そのため、まず手術を行って､その後全身状態が落ち着いた時期で､腫瘍移植を行う実験計画を立てることに至った。

この論文は、これまで内容を発表した国内の学会で高く評価され，リンパ浮腫と悪性黒色腫の治療法開発に関する基礎および臨床研究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充分な資格を有するものと判定した。