

## 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 大芦孝平

### 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

#### 【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、マウス単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 Tsanscription-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( $\alpha$ -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。 $\alpha$ -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は無かったが、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。 $\alpha$ -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。