

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18903

研究課題名(和文)メラノーマ転移動物モデルにおける低酸素ストレス応答の解析

研究課題名(英文)Analysis of Hypoxic Stress Response in Animal Models of Melanoma Metastasis

研究代表者

草島 英梨香(KUSAJIMA, Erika)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：30813547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんは生体に備わっている低酸素応答システムを利用し、増殖・浸潤・転移を促進させると言われており、低酸素応答はがん治療のターゲットとして注目されている。本研究では、マウス後肢リンパ管機能不全モデルにメラノーマを移植し、HIF-1 阻害薬であるYC-1を投与することで腋窩リンパ節および肺転移量に与える影響について検証を行なった。これまでにYC-1のメラノーマの転移抑制効果が報告されているが、本研究ではYC-1による転移抑制効果を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん組織において増殖・浸潤・転移を促進させる低酸素応答システムを抑制することができれば、腫瘍特異的な標的療法となりうる。本研究はマウスモデルを用いて、HIF-1 の活性を調整する薬剤投与により、通常のマウスおよび転移能が亢進しているとされるリンパ管機能不全マウスモデルにおいて、転移動態に及ぼす影響の解明を目的とした。

研究成果の概要(英文)：Cancer is said to utilize the body's own hypoxic response system to promote growth, invasion, and metastasis. Therefore, the hypoxic response has been attracting attention as a target for cancer therapy. In this study, melanoma was transplanted into a mouse hindlimb lymphatic dysfunction model, and the effect of administration of YC-1, a HIF-1 inhibitor, on axillary lymph node and lung metastatic volume was examined. Although the inhibitory effects of YC-1 on melanoma metastasis has been previously reported, in this study, we did not find any inhibitory effect of YC-1 on metastasis.

研究分野：形成外科

キーワード：HIF-1 メラノーマ 低酸素応答 リンパ管機能不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メラノーマは高い転移能を有し、特に進行期では転移の有無が生命予後につながる。近年、がん細胞は本来生体が持つ組織内の低酸素応答システムを用いて増殖・浸潤能を促進させていることが報告されている<sup>1</sup>。この低酸素応答システムには HIF1- $\alpha$  (Hypoxia inducible factor-1 alpha) が関わり、がん細胞はこれを活性化させることで腫瘍内の血管新生・易転移性を獲得しているとされ、メラノーマを含む各がん腫において、HIF-1 の活性調整薬剤による転移動態の研究が活発に行われはじめている。

一方、メラノーマはリンパ管機能不全を呈する微小環境にある場合、増殖能と転移能が高まると報告されている<sup>2</sup>。我々のグループは、局所リンパ系破綻モデルである、マウスリンパ浮腫モデルにメラノーマを移植し、肺転移が増加したことを報告している<sup>3</sup>。さらに膝窩リンパ節を切除したのみでもリンパ流が変化し、リンパ節転移、肺転移が増悪したことを示した<sup>4</sup>。

これらのことより、免疫系の影響として、リンパ組織の破綻が局所免疫低下につながる可能性が示唆される。すなわち、リンパ節郭清術という局所リンパ系の破壊は、循環系への影響としてリンパ浮腫に、また免疫系への影響として腫瘍の易転移性につながる可能性があると考えている。現時点で、リンパ管機能不全モデルにおけるがんの転移に対して、HIF-1 の活性調整薬剤による転移動態への影響を解析した研究は乏しい限りではない。

### 2. 研究の目的

がん組織において増殖・浸潤・転移を促進させる低酸素応答システムを抑制することができれば、腫瘍特異的な標的療法となりうる。本研究はマウスモデルを用いて、HIF-1 の活性を調整する薬剤投与により、通常のマウスおよび転移能が亢進しているとされるリンパ管機能不全マウスモデルにおいて、転移動態に及ぼす影響を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデルの作製

8~10 週齢 C57BL/6N マウス(雄)を用いて以下の2つの群を作製した。Group1. 下肢リンパ節郭清群: 膝窩リンパ節 + 鼠径リンパ節郭清群 Group2. コントロール(手術操作なし)。

#### (2) Cell lines

蛍光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 (Caliper Life sciences, Hopkinton, MA) を購入し使用した。B16F10Luc2 細胞は、レンチウイルスベクターによって蛍光発光遺伝子(Luc2)を B16F10 細胞に遺伝子導入することで作製される。腫瘍細胞はインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。移植に用いる細胞は、対数増殖期にあるがん細胞を使用した。長期間培養したがん細胞は変異しやすく転移能に影響を及ぼすことから、凍結細胞の培養開始 1 週間後を目安に移植した。培養容器に接着している subconfluent に増殖したがん細胞を Trypsin-EDTA solution (0.25% w/v trypsin; Gibco, Eggenstein, Germany) を用いて剥離した後、10% fetal bovine serum (FBS) を添加した RPMI 1640 培養液(Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を加えた後、細胞を遠心管に移して遠心(1500rpm, 5 分間)した。遠心後、細胞を氷冷 phosphate-buffered saline (PBS, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 不含) に再浮遊した。細胞の cell viability (90% 以上) を確認するため、トリパンブルーを使用して、細胞数を算定した。細胞密度を 8 x 10<sup>6</sup>/ml に調整した細胞浮遊液を作製した。

#### (3) マウスモデルへのメラノーマ移植

上記(1)で作製した3群の動物モデルの左足底に 4 x 10<sup>5</sup> 個(0.05ml)の癌細胞を移植した。腫瘍移植の時期は、各群における手術施行後 4 週間とした。

#### (4) 薬剤投与

HIF-1 阻害剤である YC-1 (Selleck Chemical, Shanghai, China) を購入し、使用した。上記(1)で作製した3群の動物モデルに対し、A: コントロール(DMSO)、B: YC-1(HIF1- 阻害剤)投与を行った。薬剤投与群では、メラノーマ移植と同日から既報<sup>5</sup>に準じ、YC-1 を 30  $\mu$ g/g/日、14 日間腹腔内投与を行った。

#### (5) ルシフェラーゼアッセイによる転移の定量的評価

転移巣における腫瘍細胞の総量をルシフェラーゼアッセイにより評価した。メラノーマ移植後の転移が予想される 3 週および 4 週の時点でマウスを安楽死させ、腋窩リンパ節、肺を採取した。PBS で洗浄し、付着血液を除去した各器官を液体窒素にて瞬間凍結した。凍結した各器官は、Micro Smash MS-100(TOMY)を使用して破碎した後、Cell Culture Lysis Reagent (Luciferase Assay System; Promega) に溶解した。細胞溶解液を 13000rpm、4 分で遠心して上清を採取した。上清に Luciferin (Luciferase Assay Reagent; Promega) を添加して生じる生物発光を検出 (GloMax 20/20n Luminometer; Promega) することで、転移の定量的評価とした。この転移の定量的評価をがん遠隔転移の指標とした。

## (6) 統計学的解析

2 群間の解析は Wilcoxon の順位和検定で統計解析した。  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) 薬剤投与方法、投与量の検討

簡便かつマウスにとって有害でない投与方法および投薬容量・濃度に関して検討を行った。使用薬剤は YC-1 とし、 $30 \mu\text{g/g/日}$ 、14 日間腹腔内投与として実験を開始した。

### (2) 転移量の判定週数の決定および使用マウスモデルの選定

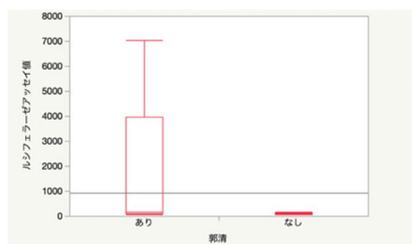
Group1. 下肢リンパ節郭清群：膝窩リンパ節 + 鼠径リンパ節郭清群、Group2. コントロール(手術操作なし)、各モデル群のマウス後肢足底にメラノーマを移植し、それぞれの群に対し A. コントロール(DMSO)、B. YC-1 (HIF1- 阻害薬) 投与の介入を行った。さらにメラノーマ移植後 3 週、4 週で評価する群を作成した。

まず、(Group1・Group2) × (A: コントロール(DMSO)・B: YC-1 投与) × (移植後 3 週・4 週) の各 8 群においてそれぞれ  $N = 1$  で検討を行い、転移能評価のため腫瘍細胞量の定量を目的として、ルシフェラーゼアッセイを施行した。メラノーマ移植後 3 週より腋窩リンパ節、肺に肉眼的転移が出現した。腋窩リンパ節、肺の肉眼的転移の出現は 3 週群では  $N = 2$ 、4 週群では  $N = 2$  であり、アウトカムの判定週数は腫瘍移植後 3 週および 4 週の両方で評価することとした。(Group1・Group2) × (A: コントロール(DMSO)・B: YC-1 投与) × (移植後 3 週・4 週) の各 8 群に対してそれぞれ  $N = 5$  を追加し検討した。

### (3) 結果

A: コントロール(DMSO) 群における腋窩リンパ節および肺転移量の解析

A: コントロール(DMSO) 群において、メラノーマ移植後 3 週および 4 週の解析では、4 週後の腋窩リンパ節、および 3 週の肺および腋窩リンパ節転移量に Group1、Group2 間で有意差はなかった。4 週において、Group1 は Group2 に対し、有意に肺転移量が増加した。(図)



Group1 における腋窩リンパ節および肺転移量の解析

Group1 において、メラノーマ移植後 3 週および 4 週の解析では、A: コントロール(DMSO) B: YC-1 投与の腋窩リンパ節および肺転移量に有意差はなかった。

Group2 における腋窩リンパ節、肺転移量の解析

Group2 において、悪性黒色腫 3 週および 4 週後の解析では、A: コントロール(DMSO) B: YC-1 投与の腋窩リンパ節転移量に有意差はなかった。

### (4) まとめ

コントロール(DMSO) 群、メラノーマ移植後 4 週において、Group1 は Group2 に対し有意に肺転移量が増加した。これはリンパ節郭清術によるリンパ管機能不全により転移能が増加していると考えられた。本研究では Group1、Group2 にかかわらず、YC-1 による転移抑制効果を認めなかった。既報論文において尾静脈からメラノーマ細胞を移植したモデルにおける YC-1 の転移抑制効果が報告されている<sup>1</sup>が、本研究はメラノーマ細胞を本来の発生臓器(本研究では左足)に移植するモデルであり、転移形成にいたる過程が異なるため、転移抑制効果が得られなかった可能性が考えられる。また、YC-1 にはマウス尾部リンパ管機能不全モデルにおいてリンパ管再生を遅延させる作用が報告されており<sup>6</sup>、本研究で使用したマウス後肢リンパ管機能不全モデルにおいてもリンパ管機能不全が増悪した結果、転移が促進し、転移抑制効果との相互作用により、結果的に転移量に有意差が得られなかった可能性も考えられる。今後は後肢リンパ管機能不全モデルにおける HIF-1 調整薬剤のリンパ管機能に与える影響をより詳細に解析する必要があると考えられた。

### < 引用文献 >

1. Goto, Y., L. Zeng, C. J. Yeom, Y. Zhu, A. Morinibu, K. Shinomiya, M. Kobayashi, *et al.* "Uchl1 Provides Diagnostic and Antimetastatic Strategies Due to Its Deubiquitinating Effect on Hif-1alpha." *Nat Commun* 6 (Jan 23 2015): 6153.

2. Kimura, T., M. Sugaya, T. Oka, A. Blauvelt, H. Okochi, and S. Sato. "Lymphatic Dysfunction Attenuates Tumor Immunity through Impaired Antigen Presentation." *Oncotarget* 6, no. 20 (Jul 20 2015): 18081-93.

3. Oashi, K., H. Furukawa, H. Nishihara, M. Ozaki, A. Oyama, E. Funayama, T. Hayashi,

- Y. Kuge, and Y. Yamamoto. "Pathophysiological Characteristics of Melanoma in-Transit Metastasis in a Lymphedema Mouse Model." *J Invest Dermatol* 133, no. 2 (Feb 2013): 537-44.
4. Maeda, T., T. Hayashi, H. Furukawa, D. Iwasaki, K. Ishikawa, E. Funayama, N. Murao, *et al.* "Immune-Mediated Antitumor Effect of a Transplanted Lymph Node." *Int J Cancer* 143, no. 5 (Sep 2018): 1224-35.
5. Yeo, E. J., Y. S. Chun, Y. S. Cho, J. Kim, J. C. Lee, M. S. Kim, and J.W.Park. "Yc-1: A Potential Anticancer Drug Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1." *J Natl Cancer Inst* 95, no. 7 (Apr 2 2003): 516-25.
6. Zampell, J. C., A. Yan, T. Avraham, S. Daluvoy, E. S. Weitman, and B. J. Mehrara. "Hif-1alpha Coordinates Lymphangiogenesis During Wound Healing and in Response to Inflammation." *FASEB J* 26, no. 3 (Mar 2012): 1027-39.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草島英梨香、星野善允
2. 発表標題 マウスモデルにおける低酸素ストレス応答の解析
3. 学会等名 第40回 北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------