

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390330

研究課題名（和文）光イメージングによる癌転移機構解明

-メラノーマがリンパから血流に入る瞬間を捉える-

研究課題名（英文）Clarifying the metastatic mechanisms of melanoma by imaging techniques

研究代表者

古川 洋志（FURUKAWA HIROSHI）

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00399924

研究成果の概要（和文）：リンパ浮腫状態のマウス後肢に悪性黒色腫を移植することで、世界で初めてとなる動物での悪性黒色腫 in-transit 転移の再現に成功した。In-transit 転移を生じたマウスはその後早期に遠隔転移を生じることを突き止め、実際の臨床で in-transit 転移を生じた症例の予後が悪いことを裏付ける結果となった。リンパ浮腫状態や in-transit 転移では、悪性黒色腫は細胞増殖活性が高いこと、リンパ管・血管が増加していることを確認し、in-transit 転移症例が予後不良であることの原因の一部を解明できた。

研究成果の概要（英文）：We reproduced melanoma in-transit metastasis (ITM) in a mouse hind limb by transplanting melanoma cells into the footpad of a mouse with lymphedema (LE). The tumor cells at the ITM site were highly proliferative, and mice with ITMs were more likely than control mice to develop distant lymph node and lung metastases. Peritumoral lymphatic vessels and tumor-associated blood vessels were increased in the primary tumor site of the LE mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：悪性黒色腫、リンパ浮腫、in-transit 転移、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫はリンパ行性転移、遠隔転移を来しやすい、一旦転移すると有効な治療法は無く、予後不良な癌として知られている。臨床でのデータから、皮膚悪性黒色腫は転移の際に最初にリンパ行性にセンチネルリンパ節へと転移した後で、血行性の遠隔転移をすと考えられている。リンパ節内の高内皮細静脈は、通常ではリンパ球のホーミング

や水・電解質の移動の場として働いており、生理的なリンパ流と血流をつなぐシャントであることが知られている。悪性黒色腫の転移様式がリンパ行性転移から血行性転移へと変化する際には、腫瘍細胞がこのシャントを逆行性に通過することで、血流内に侵入しているという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究は前述の仮説、すなわち悪性黒色腫はリンパ節内の高内皮細静脈を経由して血管内に侵入して血行性の遠隔転移を起こしている、という事を動物実験で解明することを目的として行った。

## 3. 研究の方法

前述の目的のために、マウス後肢をリンパ浮腫状態にして、そこに悪性黒色腫を移植する実験系を用いることとした。その理由はリンパ浮腫状態では、移植された悪性黒色腫細胞はリンパ行性にセンチネルリンパ節転移を起こすことは無く、仮説が正しければ悪性黒色腫は血流内に侵入する場がなくなるため、血行性の遠隔転移が減少すると考えたためである。

マウス後肢のリンパ浮腫モデルは過去には報告が無かったため、新たに作成する必要がある。作成に当たっては過去にラットの後肢リンパ浮腫モデル作成法が報告されていたので、これを参考とした。作成手順はマウスの単径部に30Gyの放射線照射を行い、1週間後に手術でリンパ節郭清、リンパ管結紮、全周性皮膚欠損の作成を行った(詳細な方法は5. 主な発表論文等-雑誌論文の①に記してある)。

上述の方法で作成したリンパ浮腫状態のC57BL/6マウス後肢足底皮下に、同系のB16F-10悪性黒色腫細胞株を移植した。腫瘍の観察、定量が容易に行えるよう、移植する細胞株は遺伝子組み換えによってホタルの発光遺伝子を安定発現させたもの(B16-F10-luc2)を用いた。

悪性黒色腫を移植した後、生体内イメージング技術(in vivo imaging)を用いて腫瘍がどのように転移していくかを、経時的に観察した。マウスの肺を採取し、上述のホタル発光遺伝子を利用した生体外生体発光技術(ex vivo bioluminescence)を用いることで、肺に転移した腫瘍細胞数を定量、比較した。移植した腫瘍組織を採取して、組織切片を作成、抗LYVE-1(リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体)抗体、抗CD31抗体による免疫染色を行って腫瘍組織のリンパ管、血管を同定し、組織切片の単位面積あたりの血管、リンパ管面積を定量して比較した。抗Ki67抗体による免疫染色も行い、腫瘍細胞の陽性率をカウントし、細胞増殖活性を比較した。また採取した腫瘍組織からRNAを抽出し、定量RT-PCR法を用いて、悪性黒色腫の転移に関与する遺伝子の発現を定量、比較した。

## 4. 研究成果

### (1)マウス後肢リンパ浮腫モデルの作成

マウス後肢への放射線照射と手術によってリンパ浮腫状態を再現できたかを確認す

るために、脚周径の計測、インドシアニンググリーンを用いた蛍光リンパ管造影、組織切片ではリンパ管内皮細胞の免疫染色を行った。

脚の周径は手術と放射線照射を行った側では、何もしなかった側と比較して大きくなっており、その状態は手術を行ってから約半年間継続していた。

蛍光リンパ管造影では、足底皮下に蛍光色素であるインドシアニンググリーンを注入して、リンパ流のうっ滞を観察した。正常の後肢では足底から膝窩リンパ節を経由して坐骨のあたりから骨盤内へ侵入するリンパ管の蛍光をはっきりと観察できた。一方放射線照射と手術を行ったリンパ浮腫の後肢では、後肢全体がびまん性に造影され、リンパ流がうっ滞していることを確認できた。リンパ流のうっ滞は手術から半年程度持続していた。

### (2)移植した悪性黒色腫の転移様式

本研究に用いた悪性黒色腫細胞株 B16-F10 は肺転移の好発株として知られており、遠隔転移の検証は、対象臓器を肺として行う事とした。通常のマウス後肢に B16-F10 悪性黒色腫を移植すると、最初に膝窩リンパ節へリンパ行性に転移し、次いで血行性の遠隔転移を来すことが確認できた。対してリンパ浮腫状態のマウス後肢足底皮下に腫瘍を移植した場合、移植後早期に後肢に in-transit 転移を生じ、続いて遠隔リンパ節である同側の腋窩リンパ節へと転移した(図1)。移植後24日目の時点では、通常のマウスと比較してリンパ浮腫のマウスではより多くの肺転移を生じていた(図2)。

このことは当初の仮説とは反対の結果であった。われわれはこの結果を受けて、in-transit 転移を生じたことが遠隔転移の増加につながったという新たな仮説を立て、それを検証することとした。臨床においては悪性黒色腫では in-transit 転移を生じた症例は予後が不良であることが知られているものの、動物実験でこの in-transit 転移を再現したという報告は過去に無く、その性質の詳細な解明は進んでいなかった。そのため本実験系を用いて in-transit 転移の詳細な分子生物学的性質を解明し、in-transit 転移症例で遠隔転移を生じやすい原因を探ることとした(図3)。

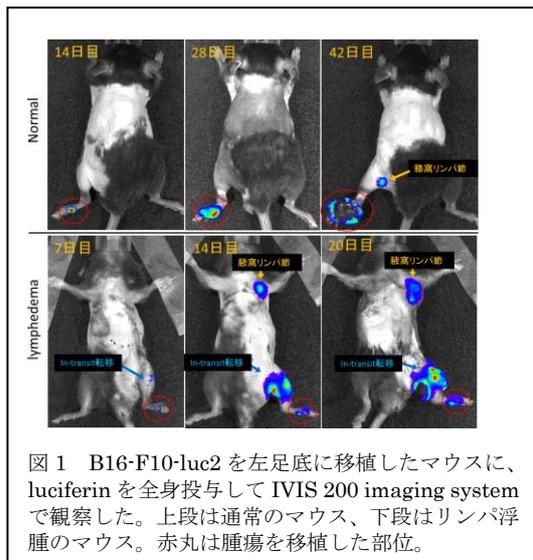


図1 B16-F10-luc2を左足底に移植したマウスに、luciferinを全身投与してIVIS 200 imaging systemで観察した。上段は通常のマウス、下段はリンパ浮腫のマウス。赤丸は腫瘍を移植した部位。

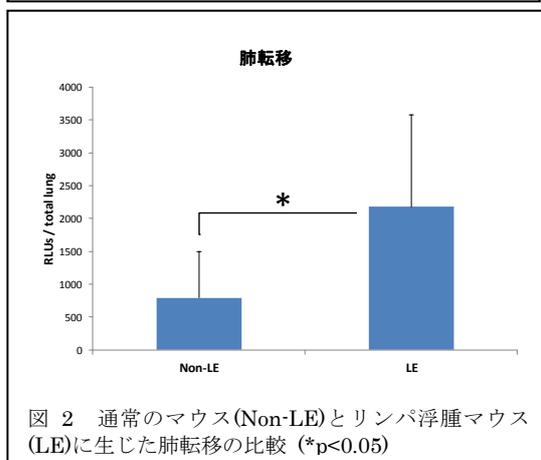


図2 通常のマウス(Non-LE)とリンパ浮腫マウス(LE)に生じた肺転移の比較 (\* $p < 0.05$ )



図3 リンパ浮腫状態のマウス後肢に生じたin-transit転移

### (3) 腫瘍組織の病理組織学的検討

マウス足底皮下に移植した腫瘍、及びリンパ浮腫のマウスに生じた in-transit 転移の腫瘍組織で免疫染色を行い、リンパ管と血管を同定し、単位面積あたりに占める脈管内腔の面積を比較したところ、リンパ浮腫足底皮下の腫瘍組織では、リンパ管、血管ともに内腔の面積が増加していた。一方 In-transit 転移では脈管内腔面積の変化には有意差は無かった。

抗 Ki67 抗体による免疫染色で腫瘍細胞中

の陽性細胞が占める割合は、in-transit 転移で有意に高くなっており、in-transit 転移では細胞増殖活性が高まっていると考えられた。

### (4) 腫瘍組織の分子生物学的検討

腫瘍組織から RNA を抽出し、腫瘍の mRNA 発現を定量 RT-PCR で評価した。細胞接着因子 E-cadherin の発現は in-transit 転移、リンパ浮腫、通常の順に低い傾向があったが、有意な差ではなかった。E-cadherin の発現を抑制し、上皮間葉転換を惹起する転写因子である Snail の発現は、通常と比べてリンパ浮腫・in-transit 転移で同程度に高くなっていたが、有意な差ではなかった。間葉系のマーカーである  $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現は、通常と比べてリンパ浮腫で有意に低下していた。リンパ管内皮細胞の Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) に作用して、リンパ管新生を惹起する細胞増殖因子である Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) の発現には、3 群で差を認めなかった(図4)。

結果を総合的に解釈すると、in-transit 転移およびリンパ浮腫状態に移植された腫瘍では、腫瘍の生物学的な悪性度が高くなっており、そのことが本研究で観察された転移の増加、実臨床での予後の悪さにつながっていることが示唆された。生物学的悪性度が高くなった原因としては、上皮間葉転換以外のメカニズムが関与していることが示唆された。

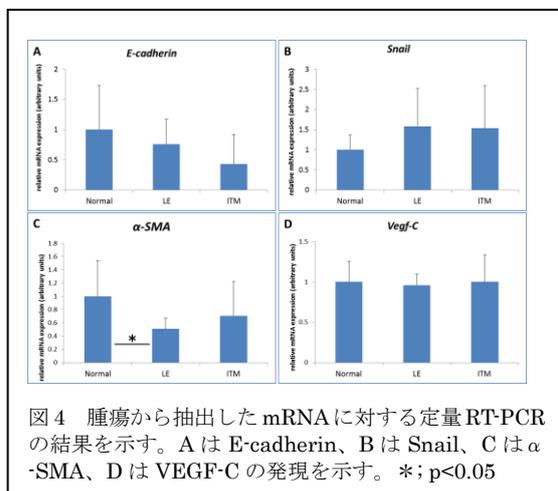


図4 腫瘍から抽出した mRNA に対する定量 RT-PCR の結果を示す。A は E-cadherin、B は Snail、C は  $\alpha$ -SMA、D は VEGF-C の発現を示す。\*;  $p < 0.05$

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Oashi, K., Furukawa, H., Nishihara, H., Ozaki, M., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Kuge, Y., Yamamoto, Y. Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. J Invest Dermatol, 133 (2): 537-44, 2013. (査読有)
- ② Oashi, K., Furukawa, H., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Saito, A., Yamamoto, Y. A new model of acquired lymphedema in the mouse hind limb: a preliminary report. Ann Plast Surg, 69 (5): 565-568, 2012. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大芦孝平, 古川洋志, 山本有平:メラノーマ in-transit 転移の病態解明に関する動物実験第 2 報～動物モデルを用いた性質の検討～. 第 28 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 北海道, 2012. 6. 29, 京王プラザホテル札幌
- ② 大芦孝平, 古川洋志, 山本有平:メラノーマ in-transit 転移の動物実験モデル作成. 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京都, 2011. 10. 06, ハイアットリージェンシー東京
- ③ 大芦孝平, 古川洋志, 山本有平:メラノーマの転移経路に関する動物実験. 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京都, 2011. 10. 06, ハイアットリージェンシー東京
- ④ 大芦孝平, 古川洋志, 大澤昌之, 山本有平:マウス後肢リンパ浮腫モデルの作成. 第 37 回日本マイクロサージャリー学会学術集会, 愛知県, 2010. 11. 18, ウィンクあいち
- ⑤ 大芦孝平, 古川洋志, 大澤昌之, 山本有平:マウスリンパ節の構造と機能に関する検討とマウス後肢リンパ浮腫モデルの作成. 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会, 神奈川県, 2010. 9. 16, パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 00399924

### (2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 70271674

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)

北海道大学・大学病院・講師  
研究者番号: 70374486

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 10533630

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)

北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号: 00432146

齋藤 亮 (SAITO AKIRA)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号: 70507574

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号: 80256510

(H24: 連携研究者)

堤田 新 (TSUTSUMIDA ARATA)

国立がん研究センター中央病院・皮膚腫瘍科・医長

研究者番号: 00374489

(H23→H24: 連携研究者)

### (3) 連携研究者

久下 裕司 (KUGE YUJI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 70321958

大芦 孝平 (OASHI KOHEI)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号: 00640343

