

氏名	河合 穂高
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5481号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	GFP 骨髄移植マウスを用いた腫瘍間質における骨髄由来細胞の動態と役割
論文審査委員	飯田 征二 教授 志茂 剛 准教授 長塚 仁 教授

学位論文内容の要旨

【目的】

腫瘍組織は腫瘍細胞と、腫瘍細胞以外の腫瘍間質細胞で構成されている。特に悪性腫瘍組織を構成する腫瘍間質細胞は癌間質細胞と呼称され、腫瘍微小環境を形成して、腫瘍細胞との相互作用を行い腫瘍の浸潤性や転移に影響を与えることが明らかとなってきた。腫瘍間質は線維芽細胞や炎症細胞、血管など多彩な細胞で構成されているが、一部は骨髄由来であることが指摘されている。骨髄由来細胞(Bone marrow derived cell: BMDC)は血球系細胞のみならず、様々な細胞に分化することが知られており、肝臓、肺、腸管など全身の臓器に造血幹細胞由来の細胞が出現することや、BMDC が遠隔の臓器の組織再生や創傷治癒に関与していると報告されている。しかし、腫瘍間質での BMDC の動態は不明な点が多い。本研究では、BMDC の腫瘍の浸潤性や転移能への関与を明らかにするため、GFP 骨髄移植マウスに腫瘍を移植し、腫瘍間質における BMDC の動態を検討した。

【材料および方法】

GFP マウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)、8 週齢)から骨髄を採取し、放射線照射(総量 10Gy)を行った野生型マウス(C57BL/6J、8 週齢)に骨髄移植を施行し、骨髄細胞のみ GFP 陽性のキメラマウスを作製した。同マウスに Lewis Lung Cancer 細胞を、背部皮下または尾静脈より移植し、前者を原発モデル、後者を転移モデルとした。腫瘍移植 4 週後に腫瘍組織を摘出し、パラフィン包埋連続切片を作製した。標本は病理組織学的に検討し、免疫組織化学的(IHC)に GFP 陽性細胞の局在を検討した。 α -SMA、CD3、CD11b、CD31、CD34、CD105 陽性細胞の局在を GFP 陽性細胞と併せて比較検討した。また、GFP と CD11b、CD31、CD105 については蛍光免疫二重染色を行い検討した。

【結果】

HE 染色では、原発モデルの腫瘍組織辺縁部(Peripheral area: PA)と、腫瘍組織中心部(Central area: CA)では、腫瘍細胞の形態が異なり、PA では腫瘍細胞の密な増殖と紡錘形細胞が多く、CA では細胞間隙が目立つ類円形細胞が主体であった。転移モデルの肺における腫瘍組織(Metastatic area: MA)では、腫瘍細胞は PA と類似した像であった。IHC では、腫瘍間質に球形、樹状形の GFP 陽性細胞が確認されたが、CA に比べ PA や MA で有意な GFP 陽性細胞の分布がみられた。免疫組織化学染色では、 α -SMA は血管周囲平滑筋や PA の紡錘形細胞に、CD3 は小型の球形の細胞に陽性像がみられたが、GFP 陽性細胞の分布と相関はみられなかった。CD11b は腫瘍組織内の球形、樹状形の細胞に陽性像が見られ

た。これらの細胞の多くは GFP 陽性で、壊死巣を中心に集簇像が観察され、腫瘍組織内にも多数の陽性像を認めた。CD31、CD34、CD105 の免疫組織化学染色では、腫瘍組織内の管状もしくはスリット状の構造をとる血管内皮細胞に陽性像を認めた。また、CD31 にのみ腫瘍組織内の球形、もしくは樹状形の細胞に陽性像が観察された。これらの細胞は PA、MA で CA に比べ有意に集簇しており、GFP 陽性細胞の局在と相関がみられた。腫瘍組織内の血管面積を計測し、各領域で比較したところ、PA、MA の血管面積は、CA に比べ有意に広がった。蛍光免疫二重染色による検討では、CD31 もしくは CD105 陽性の血管内皮細胞は GFP 陰性であった。CD31 陽性の球形、もしくは樹状形の細胞は、CD105 陰性、GFP 陽性の細胞であった。

【考察】

腫瘍間質には多数の BMDC が存在し、腫瘍の部位により局在が異なることが示された。α-SMA 陽性の紡錘形細胞は筋線維芽細胞と考えられた。細胞形態や染色態度から癌間質細胞の CAF (cancer associated fibroblast) である可能性が示唆された。CD3 は小型の炎症細胞で T 細胞と考えられた。壊死巣周囲で見られた CD11b 陽性細胞は壊死物を貪食するマクロファージと考えられたが、腫瘍組織内に存在する CD11b 陽性細胞の一部は腫瘍の浸潤や転移への関与が報告されている腫瘍随伴マクロファージの可能性が示唆された。CD31、CD34、CD105 陽性の細胞は血管内皮細胞であったが、CD31 陽性の球形、樹状形の細胞は血管内皮細胞とは異なる細胞と考えられた。CAF や血管内皮細胞は GFP 陰性で骨髄以外の由来と考えられた。CD31 陽性の球形、樹状形の細胞は GFP 陽性で骨髄由来であり、CD31 陽性 BMDC は、PA、MA で多く集簇していることから腫瘍の浸潤や転移に関与する BMDC である可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

近年、腫瘍間質細胞は腫瘍細胞との相互作用により、腫瘍の浸潤性や転移に影響を与えることが明らかとなってきた。また、腫瘍間質は線維芽細胞や血管、炎症細胞など多彩な細胞で構成され、一部は骨髄由来であることが指摘されている。しかし、腫瘍間質における骨髄由来細胞(Bone marrow-derived cell: BMDC)の動態と役割は不明な点が多い。本研究では、BMDCの腫瘍の浸潤性や転移能への関与を明らかにするため、Green Fluorescent Protein (GFP)トランスジェニック骨髄移植マウスに腫瘍を移植し、腫瘍間質におけるBMDCの動態を検討した。

GFPトランスジェニックマウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP), 8週齢)から骨髄を採取し、放射線照射(総量10Gy)を行った野生型マウス(C57BL/6J, 8週齢)に骨髄移植を施行した。同マウスにLewis Lung Cancer細胞を、背部皮下または尾静脈より移植し、前者を原発モデル、後者を転移モデルとした。腫瘍移植4週後に腫瘍組織を摘出し、パラフィン包埋連続切片を作製した。標本は病理組織学的に検討し、免疫組織化学的(IHC)にGFP陽性細胞の局在を検討するとともに、 α -SMA, CD3, CD11b, CD31, CD34, CD105陽性細胞の局在をGFP陽性細胞と併せて比較検討した。

HE染色では、原発モデルの腫瘍組織辺縁部(Peripheral area: PA)と、腫瘍組織中心部(Central area: CA)では、腫瘍細胞の形態が異なり、PAでは腫瘍細胞の密な増殖と紡錘形細胞が多く、CAでは細胞間隙の目立つ類円形細胞が主体であった。転移モデルの肺における腫瘍組織(Metastatic area: MA)では、腫瘍細胞はPAと類似した像であった。IHCでは、腫瘍間質に球形、樹状形のGFP陽性細胞が確認されたが、CAに比べPAやMAで優位なGFP陽性細胞の分布がみられた。これらの一部はCD11bやCD31陽性の細胞で、CD31陽性の球形、樹状形をした細胞はGFP陽性細胞と局在に相関がみられた。CD3陽性細胞は小型の球形の細胞に陽性で、GFP陽性細胞との相関はみられなかった。 α -SMA, CD34, CD105陽性細胞はGFP陰性であった。

腫瘍間質には多様なBMDCが存在し、腫瘍の部位により局在が異なることが示された。CD11b陽性BMDCの一部は、腫瘍関連マクロファージとみられ、腫瘍間質の筋線維芽細胞や血管はGFP陰性で骨髄以外の由来と考えられた。CD31陽性BMDCは、創傷治癒において血管新生を誘導することが報告されており、腫瘍において血管新生を誘導し、浸潤や転移に関与する可能性が示唆された。

これらの知見は、腫瘍間質における骨髄由来細胞の動態と役割を明らかにしたものであり、腫瘍の浸潤性や転移能における、腫瘍細胞と腫瘍間質細胞の相互関係解明の一端を担う基礎研究として価値のある研究業績である。

よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。