

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

河合 穂高

Role of GFP transplanted bone marrow derived cells into tumor stroma

(平成 28 年 12 月 7 日受付)

Hotaka Kawai

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻 口腔病理学分野

(指導：長塚 仁 教授)

諸 言

癌組織は癌細胞のみならず、癌組織周囲の様々な非腫瘍細胞によって構成されている。非腫瘍細胞はリンパ球やマクロファージ、好中球などの免疫担当細胞や、血管を構成する血管内皮細胞、線維芽細胞などである。

近年の研究で、このような間質細胞は組織充填細胞としての役割のみならず、癌細胞の浸潤性や転移能、生存、増殖などに影響を与えることが明らかとなってきた¹⁾。Zeisberg らは胃癌周囲の線維芽細胞が、通常の線維芽細胞とは異なり、MMP などのタンパク質を分泌して、周囲組織を破壊し、癌の浸潤に影響を与えることを報告した。Zeisberg らはこのような線維芽細胞を、癌間質線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast (CAF)) と呼称し、腫瘍細胞が周囲間質細胞に影響を与え CAF を誘導し、CAF は腫瘍の増殖や浸潤を助ける環境をつくることを報告している²⁾。この様に腫瘍細胞が自らの周囲に形成する、生存に有利な環境を、腫瘍微小環境と呼称し、近年注目されている。また、マクロファージは個体発生や組織修復、生体防御など成体の恒常性維持に重要な役割を果たすが、腫瘍間質においては、マクロファージが、様々なサイトカインを放出し、周囲の炎症を抑えることで腫瘍の進展を助け、腫瘍微小環境を形成すると報告されている。これらは腫瘍随伴マクロファージ (Tumor associated Macrophage (TAM)) と呼ばれ³⁾、免疫抑制⁴⁾ や、血管新生⁵⁾ など、役割の異なる様々な TAM が存在

することが報告されている。

その他、腫瘍間質に存在するリンパ球や、好中球などの顆粒球、腫瘍血管などが腫瘍微小環境の形成に関与することが報告されている。このように腫瘍は、腫瘍細胞自身の遺伝的、生物学的要因のみならず、腫瘍間質細胞との相互作用によって性質が規定されることが明らかとなりつつある^{6,7)}。しかし、腫瘍微小環境の成り立ちや、関係する細胞の由来については不明な点が多い。

腫瘍微小環境を構成する細胞の内、リンパ球やマクロファージなどの血球系、炎症細胞や毛細血管など、腫瘍間質を構成する細胞の中には、骨髄由来と考えられる細胞が多数存在する。さらに、胃癌における CAF の一部は骨髄由来であると報告されており⁸⁾、近年では、骨髄由来細胞(bone marrow derived cell: BMDC)が腫瘍微小環境の形成に深く関与するという報告がなされている⁹⁾。

正常組織においても、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、骨髄、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¹⁰⁾、ラット骨髄移植後に肝臓を部分切除した実験で、再生した肝細胞の一部が移植された骨髄由来細胞由来であることが示されている¹¹⁾など、BMDC が遠隔の臓器の組織再生や創傷治癒に関与していることが報告されている。しかし、腫瘍組織間質において、BMDC が腫瘍にどのような影響を及ぼしているかについては検討が不十分である。

そこで、本研究では、腫瘍の浸潤部組織や転移巣における BMDC の局在や性質を検討することで、BMDC が腫瘍の浸潤性や転移について影響を与えているか検討を行った。

材料・方法

1. 実験動物

実験動物には 7 週齢雌性 GFP トランスジェニックマウス〔C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)〕(Shimizu laboratory supplement, Kyoto, Japan) 8 匹および 7 週齢雌性同系野生型マウス(C57BL/6J) (Shimizu laboratory supplement, Kyoto, Japan) 15 匹の計 23 匹を使用した。尚、本研究において使用した全ての動物は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の実験動物ガイドラインに従い飼育、使用した。本研究は岡山大学動物実験委員会の審査、承認を受けて行った(承認番号：05-006-099)。

2. GFP 由来骨髓細胞移植マウスの作製

1) 骨髓細胞の調整

GFPマウスをジエチルエーテルの過剰吸入にて安楽死させ、大腿骨と脛骨を採取した後、骨周囲軟組織を可及的に切除し、Dulbecco's modified eagle medium

(Invitrogen Co., NY, USA)を用いて骨髓細胞を回収した。骨髓細胞浮遊液をCell Strainer (BD Falcon, NJ, USA)に通した後、1500rpmで5分間遠心分離し、骨髓細胞浮遊液を0.1M phosphate buffer saline(PBS) HBSSで希釈し、約 1.0×10^7 cells / 0.25mlになるように調整した。

2) 骨髓移植

野生型マウスにエックス線照射装置(MBR-1520R, Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan)を用いて総量10Gyのエックス線を照射した。エックス線照射終了直後に調整した骨髓細胞浮遊液を27G注射器にて0.50ml/匹を経尾静脈投与した。骨髓移植後4週間は感染予防のために酸性水(pH3.0)を与えて飼育した¹²⁾。

3) 腫瘍移植

マウス肺癌由来細胞として、Lewis Lung Cancer (LLC)細胞を用いた(3LL, JCRB1348, National institutes of biomedical innovation, Health and Nutrition JCRB Cell Bank, Osaka, Japan)。LLC細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo fisher scientific K K, NY, USA) に10% Fetal bovine serum (FBS, Thermo fisher scientific K K, NY, USA)を加えた培地を用い、10cm dishでコンフルエントになるまで培養した。得られたLLC細胞を、背部皮下もしくは尾静脈に、それぞれ 1.0×10^6 cells / 0.1ml, 5.0×10^5 cells / 0.2mlを27G注射器にて投与した。背部皮下

へ移植を行い、同部に腫瘍の増殖巣を形成した個体を原発モデルとし、尾静脈から腫瘍移植をして肺に病巣を形成した個体を転移モデルとした。

3. 組織学的観察

1) 組織切片の作成

LLC細胞移植4週間後のマウスをジエチルエーテル過剰吸入にて安楽死させ腫瘍を摘出後、4%パラフォルムアルデヒド固定液で12時間浸漬固定した。常法に従ってパラフィン包埋し、厚さ5 μ mの連続パラフィン切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色，を行うとともに免疫組織化学的染色を行い，組織学的に観察した。

2) ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

切片をキシレンにて脱パラフィンし，100%から70%エタノールおよび精製水にて再水和後，HE染色を行った。70%から100%エタノールおよびキシレンにて脱水・透徹を行った後，Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて封入し組織学的観察を行った。

2)免疫組織化学的染色

染色に用いた抗体の詳細については表1に示す。組織切片の脱パラフィン後、室温で30分間0.3%過酸化水素メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼをブロックし、精製水で洗浄した。抗体は、抗GFP抗体として、ポリクローナルGFP抗体 (598, MBL, Nagoya, Japan), モノクローナルGFP抗体(ab6673, Abcam, Tokyo, Japan), CAFのマーカーとして抗 α -SMA抗体(ab5694, Abcam, Tokyo, Japan), マクロファージ, T細胞マーカーとして抗CD3抗体(ab16669, Abcam, Tokyo, Japan)を使用した, TAMマーカーとして抗CD11b抗体(ab75476, Abcam, Tokyo, Japan), 血管内皮マーカーとして抗CD31抗体(ab56299, Abcam, Tokyo, Japan), 抗CD34抗体(ab815, Abcam, Tokyo, Japan), 抗CD105抗体(MAB8094, R&D system, Minneapolis, USA)。

抗CD31, CD34, CD105抗体は37°Cで5分間0.1%トリプシン溶液により前処理, 抗CD31抗体は1000倍, CD34抗体は200倍, 抗CD105抗体は50倍に希釈して4°Cでovernightにて反応させABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, USA)で免疫反応を行った。抗GFP抗体, 抗CD11b抗体および抗CD3抗体は0.01molクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いて5分間マイクロウェーブで前処理, それぞれ200倍に希釈して4°Cでovernightにて反応させ, ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, USA)で免疫反応を行った。発色は0.01% 3,3'-ジアミノベンチジン [0.05M Tris HCl Buffer(pH7.6)] で行った。対比染色はマイヤーヘマトキシリン染色液(Merck

KGaA, Darmstadt, Germany)で行った。陰性対照は二次抗体のみで行い、すべて陰性であった。

3) 蛍光免疫二重染色

抗GFP, CD11b, CD31, CD105抗体を用いて以下のような組合せによる蛍光免疫二重染色を行った。使用した抗体の詳細はTable 2に示す。各抗体の希釈はCan Get signal® (TOYOBO, Osaka, Japan)で行った。

抗GFP-抗CD11b抗体の組合せについては、脱パラフィン後に0.01molクエン酸緩衝液 (pH6.0)を用いて1分間マイクロウェーブで前処理、TBST (Tris-buffered saline with tween 20) で洗浄後、ブロックエース® (DS pharma biomedical, Osaka, Japan) を用いて室温で20分間ブロッキングを行った。一次抗体として抗GFP抗体は200倍、抗CD11b抗体は200倍に希釈して4°Cでovernightにて反応させた。TBSTで洗浄後、二次抗体を200倍に希釈して室温で60分間反応させた。

抗GFP-抗CD31抗体の組合せについては、5分間0.1%トリプシン溶液により前処理を行い、TBSTで洗浄後、ブロックエース®を用いて室温で20分間ブロッキングを行った。一次抗体として抗GFP抗体は200倍、抗CD31抗体は1000倍に希釈して4°Cでovernightにて反応させた。TBSTで洗浄後、二次抗体を200倍に希釈して室温で60分間反応させた。

抗CD31-抗CD105抗体の組合せについては、脱パラフィン後に37°Cで5分間0.1%トリプシン溶液により前処理、TBSTで洗浄後、ブロックエース®を用いて室温で20分間ブロッキングを行った。一次抗体として抗CD31抗体は1000倍、抗CD105抗体は50倍に希釈して4°Cでovernightにて反応させた。TBSTで洗浄後、二次抗体を200倍に希釈して室温で60分間反応させた。

二次抗体反応終了後、対比染色としてDAPI 1 μ g/mlを3分間反応させた。TBSで洗浄後にFluorescence mounting medium® (DAKO, Glostrup, Denmark) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4) 細胞数の計測

作製した免疫染色標本を用いてGFP陽性細胞、CD11b陽性細胞、CD31陽性細胞について細胞数の計測を行った。GFP、CD11bは細胞質陽性像、CD31は細胞膜陽性像をそれぞれ陽性判定とし、染色を施した腫瘍組織上の無作為に選択した10か所について400倍視野中の陽性細胞数の平均値を算出した。結果はStudent's T-Testにより検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

4. 血管密度測定

腫瘍血管密度の測定では、腫瘍組織におけるCD105陽性細胞で取り囲まれる管腔の面積を計測した。計測にはオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-700, Keyence, Osaka, Japan）および画像解析ソフト（BZ-X Analyzer, Keyence, Osaka, Japan）を使用して、腫瘍組織中無作為に選択した10か所について400倍視野中の計測を行った。計測結果は Student's T-Testにより検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

結 果

1. 腫瘍の組織学的検討

原発モデルより得られた組織では、皮下真皮層に充実性に増殖する腫瘍組織が観察され、部位により間質が腫瘍内部にまで入り込むような像が観察された。転移モデルでは、肺に多発性の病巣があり、病理組織学的には肺組織内で複数の転移巣を形成する腫瘍組織が観察された（図 1a, b）。原発モデルの腫瘍組織をさらに詳細に検討すると、周囲組織と腫瘍が接する領域では、腫瘍細胞は、間質に入り込むような紡錘形の形態を示し。腫瘍細胞同士の間隔も広がった（図 1c）。対して、原発モデルの腫瘍中心部では腫瘍細胞は密に増殖し、輪郭のはっ

きりした球形の細胞形態をとり、腫瘍組織辺縁部と腫瘍組織中心部では細胞の形態が異なっていた(図 1c, d)。

また転移巣では腫瘍細胞は腫瘍組織辺縁と中央の区別なく、一様に紡錘形と球形の細胞が混在しており、原発モデルの組織像とは異なる構築を示していた(図 1e)。

腫瘍組織の部位により腫瘍細胞の形態と分布に特徴があり、これらの組織学的特徴に基づき、原発モデルの腫瘍組織辺縁部を peripheral area: PA (図 1c)、原発モデルの腫瘍組織中心部 central area: CA (図 1d)、転移モデル腫瘍部を metastatic area: MA (図 1e)と称することとし、以後の組織学的解析はこの領域区分に基づいて行った。

2. 腫瘍組織に浸潤する GFP 陽性細胞の形態と分布

GFP 陽性細胞の免疫組織学的検討では、原発モデル、転移モデルともに腫瘍組織内に GFP 陽性細胞を多数認めた。GFP 陽性細胞は球形、もしくは樹状形の細胞質を有した細胞であった。PA と MA の領域では多数の球形および樹状形細胞がび漫性に分布していた。これらの陽性細胞は血管周囲にも認められた。また、

CA では PA や MA に比べ腫瘍組織内に分布する GFP 陽性細胞は少なく, その主体は樹状形であった。(図 1f-h)。

3. 腫瘍間質細胞の各種マーカーの発現と GFP 陽性細胞との比較

α -SMA 陽性細胞は原発モデル, 転移モデルともに腫瘍間質の血管周囲の平滑筋に陽性像が見られたが, CA, PA, MA の領域による分布の違いは明らかでなかった。免疫組織化学的に GFP 陽性を示した球形や樹状形の細胞では α -SMA の陽性像は観察されなかった(図 2a-c)。また, PA においてごく少数, α -SMA 陽性の管腔形成を取らない紡錘形細胞が観察された(図 2a)。

CD3 はリンパ球様の小型の球形細胞に陽性像が認められた。(図 2d-f)。CD3 陽性細胞は原発モデル, 転移モデルともに腫瘍組織間質にごく少数存在していたが, PA, CA, MA の領域による分布の違いは明らかではなかった。

CD11b 陽性細胞は原発モデル, 転移モデルともに腫瘍組織内に多数浸潤していた。またこれらの陽性細胞は球形, もしくは樹状形を示す細胞で, GFP 陽性細胞と類似する細胞であった(図 2g-i)。原発モデルの腫瘍中心部の壊死巣でも多数の球形の陽性細胞が観察された。

CD31, CD34, CD105 は管腔構造もしくは裂隙状構造を形成する腫瘍組織内の血管の血管内皮細胞に陽性であった。また、腫瘍組織辺縁部および転移巣では小型の細い内腔を有した血管が多数観察されたのに対し、腫瘍組織中心部では内腔の太い成熟した血管が多く観察された(図 3a-f)。また、CD34, CD105 では血管内皮細胞のみに陽性が見られたが(図 3a-f), CD31 では血管内皮細胞に加えて、球形もしくは樹状形の細胞が染色された(図 4a-c)。これらの細胞は GFP 陽性細胞に形態が類似していた。

4. 蛍光免疫二重染色による解析

1) CD11b および GFP

CD11b と GFP の陽性像を重ね合わせて検討すると、CD11b は形態的には球形の細胞にみられて、その多くが GFP 陽性の細胞であった (図 2 k-m)。CA の壊死を伴う部位では多数の二重陽性細胞の集簇が観察され、壊死に乏しい部位や PA, MA においても少数の二重陽性細胞 (図 2m 矢頭) が観察された。GFP 単独陽性の細胞 (図 2m 矢印) が CA の壊死に乏しい部位において多数観察された。これらの細胞は比較的大型の細胞で、球形もしくは樹状形の細胞であった。

2) CD105 および GFP

CD105 では管腔構造を形成する血管内皮細胞で陽性細胞が見られたが、GFP は球形もしくは樹状形の単核細胞のみに陽性で、原発巣、転移巣共に検討を行ったすべての部位で二重陽性細胞は観察されなかった(図 3g-i)。

3) CD31 および CD105

CD31, CD105 どちらも管腔形成をみる血管内皮細胞では陽性 (図 4g 矢印) であったが、CD31 では管腔形成を取らない球形もしくは樹状形の細胞で単独陽性像が観察された (図 4g 矢頭)。

4) CD31 および GFP

CD31 は管腔形成をみる血管内皮細胞と球形もしくは樹状形の単核細胞に陽性を示し、この内球形もしくは樹状形の単核細胞では、GFP と二重陽性であった。またこのような二重陽性細胞は、PA, MA で数個の細胞集塊としてみられた(図 4h-j)。

5. 陽性細胞数計測

GFP 陽性細胞数の平均値は PA では 203.8 個, CA では 83.9 個, MA では 233.8 個で, MA が最も高値を示した。また CA に比べ, PA と MA では陽性細胞数が

有意に高値を示した (図 1 i)

CD11 b 陽性細胞数の平均値は PA では 29.8 個, CA では 41.3 個, MA では 31.4 個で, CA が最も高値を示した。陽性細胞は CA で PA に比べ細胞数が有意に多いことが明らかとなった。MA と CA では, 有意差は無かったが, PA と MA は同様の値であった(図 2j)。

CD31 陽性細胞数の平均値は PA では 70.7 個, CA では 17.8 個, MA では 80.1 個で, MA で最高値を示した。さらに, 管腔構造もしくは裂隙状を取らない, 球形もしくは樹状形の CD31 陽性細胞のみカウントを行ったところ, PA では 33.5 個, CA では 8.3 個, MA では 27.9 個で, CA に比べ PA, MA で有意に陽性細胞数が多いことが明らかとなった(図 4d)。これは, GFP 陽性細胞の分布と相関のみられる結果であった。

6. 血管面積の測定

血管分布を CA, PA, MA の面積を各領域にわけて計測した結果, PA が 29982 μm^2 , CA が 14964 μm^2 , MA が 26045 μm^2 で, PA が最も高値を示した。また, PA, MA とともに CA に比べ血管の面積が有意に高値を示した。 (図 3j)。

考 察

1. BMDC の形態及び局在の検討

GFP 免疫組織化学染色では、PA、CA、MA すべての領域で GFP 陽性細胞が腫瘍組織内に浸潤していることが明らかとなった。また、GFP 陽性細胞は球形もしくは樹状形の細胞であった。これらのことから、腫瘍組織内には多数の BMDC が存在していることが示された。また、腫瘍組織内の BMDC は球形や樹状形など異なる細胞形態をとっていることから、BMDC は単一の細胞ではなく、様々な性格を示す、数種類の細胞であることが考えられた。

それぞれの領域に存在する GFP 陽性細胞の数を比較したところ、腫瘍組織中心部に比べ腫瘍組織辺縁部、転移巣に存在する GFP 陽性細胞が有意に多いことが分かった。これらのことから、腫瘍組織内に存在する BMDC では腫瘍の部位によって分布の差が存在することが明らかになった。BMDC は主として PA と MA の間質に出現しており、当該部間質の構成要素や生物学的特性に影響を与え、腫瘍の浸潤と転移に関与すると考えられた。

2. 各種マーカーによる間質細胞の検討

1) α -SMA 陽性細胞

α -SMA は、平滑筋細胞や筋線維芽細胞で発現している α アクチンのマーカーである。また、癌間質細胞の CAF も筋線維芽細胞の性質を有し細胞質に α -SMA に陽性を示す。このことから CAF のマーカーとしても同抗体が用いられる¹³⁾。

本実験では、腫瘍組織内の血管平滑筋で陽性像が認められたが、腫瘍辺縁部ででは筋線維芽細胞と考えられる、少数の α -SMA 陽性の紡錘形細胞が観察された。CAF は α -SMA 陽性紡錘形細胞であり、これらの細胞に CAF が含まれている可能性が考えられた。 α -SMA 陽性細胞は、球形、樹状形のものは観察されず、明らかに GFP 陽性細胞とは形態が異なっており、その由来は骨髄ではなく腫瘍周囲組織より動員されていると考えられた。

2) CD3 陽性細胞

CD3 は胸腺細胞、成熟 T 細胞系、NKT 細胞の細胞膜のマーカーとして用いられている。本実験では CD3 陽性の小型の球形の細胞で陽性像がみられ、細胞の大きさや形態からは成熟 T 細胞が考えられた。より詳細な CD3 陽性細胞の同定にはさらなる細胞マーカーによる検索が必要と考えられた。腫瘍組織内では、PA, CA, MA 各領域ともごく少数の陽性細胞が散在性に観察され、領域による局在の差異に乏しく、CD3 陽性細胞の腫瘍の浸潤性や転移能との関係は明らかではなかった。

3) CD11b 陽性細胞

CD11b は単球/マクロファージやミクログリアに強発現し、顆粒球やNK 細胞、樹状細胞に弱く発現している。また、TAM での発現が報告されている¹⁴⁾。

本実験では、CD11b 陽性細胞は、球形や樹状形の細胞で陽性像がみられた。CD11b 陽性細胞の分布領域は、CA, PA, MA で広く陽性細胞が出現していたが、特に CA の壊死組織で多数の集簇が見られた。実際に腫瘍組織内に存在する CD11b 陽性細胞数を計測すると、CA では PA に比べ陽性細胞が多いことが明らかとなった。また、これらの細胞の多くは蛍光免疫二重染色によって、GFP と二重陽性であることが明らかとなり、骨髄由来であることが示された。

壊死巣に集簇する CD11b と GFP 二重陽性細胞は壊死物を貪食するマクロファージであると考えられたが、腫瘍組織内には散在性に浸潤する CD11b 陽性の単核、球形細胞が多数存在していた。組織学的にはマクロファージや単球と考えられ、その一部は TAM である可能性が考えられた。TAM は腫瘍の増殖や転移に関与するという報告が多くなされている¹⁵⁾が、腫瘍組織辺縁部や転移巣でみられた CD11b 陽性 BMDC は、これらに関わる TAM である可能性が示唆された。また、近年、骨髄由来のマクロファージが腫瘍血管新生において血管形成促進作用を持つことが報告されている^{16,17)}。本実験では、腫瘍中心部で CD11b 陽性

BMDC が腫瘍組織辺縁部に比べ多い傾向がみられたが、腫瘍組織中心部のような虚血に陥りやすい部位では、専ら異物処理を行うマクロファージや単球のみならず血管形成などに寄与する TAM が多く集簇している可能性が考えられた。

4) CD34 陽性細胞・CD105 陽性細胞

CD34 は血管内皮細胞, 造血系前駆細胞の接着因子として知られており, CD105 は細胞増殖に関連し, 低酸素症により惹起されるタンパク質で, 血管内皮細胞や造血前駆細胞で発現している。いずれのマーカーも血管内皮細胞のマーカーとして用いられる。本実験でも, 腫瘍組織内に環状もしくは裂隙状に配列する紡錘形の血管内皮細胞に CD34, CD105 の陽性像が認められた。

血管内皮細胞の由来には, 血管内皮前駆細胞, 血管芽細胞, 血管幹細胞など諸説ある¹⁸⁻²⁰⁾。Asahara らは血液細胞と血管細胞が共通の祖先から発生すること, 血管内皮前駆細胞が CD34, CD31, Tie-2 など, 造血前駆細胞と共通の抗原を発現していることを示し血管内皮前駆細胞の起源は骨髓細胞由来で, 生体内での血管形成には既存の血管からだけでなく, 骨髓に由来する血管内皮前駆細胞も必要に応じて動員されると報告している²¹⁾。また, BMDC は虚血性組織の血管修復の際に血管内皮細胞に分化することが報告されている²²⁾。

しかし, 本研究では CD105 と GFP の二重陽性を示す血管内皮細胞は観察され

ず、骨髓細胞由来の血管の存在は明らかではなかった。

腫瘍間質の血管の由来については、腫瘍の増殖や転移の際に骨髓由来細胞が血管内皮に分化するという報告²³⁻²⁵⁾がなされている。一方で、Ishii らは骨髓移植マウスを用いて、腫瘍血管の検索を行い、骨髓由来の血管は存在しない²⁶⁾ことを報告しており、腫瘍血管が骨髓細胞由来か、非骨髓細胞由来かについては明確にされていない。我々の実験では、GFP 陽性の血管は観察されず、Ishii らの説を支持する結果となった。しかし、Hyun-jai らは新生間もない腫瘍血管は骨髓由来だが、血管の成熟に伴って非骨髓由来に変化すると報告している²⁷⁾。今回のモデルでは腫瘍細胞移植後 4 週が経過しているので、骨髓由来血管は組織由来の血管に置き換わった可能性も考えられた。

5) CD31 陽性細胞

CD31 は別名 PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) と呼ばれ、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 130kDa の膜内在性糖タンパク質である。生体内では、血管内皮細胞で強く発現し、胚や顆粒球、単球、血小板でも弱く発現している。CD31 は、隣接する細胞と CD31 同士で接着し血管新生の初期や免疫機構の制御に関与している^{28, 29)}。

本実験では、CD31 陽性細胞は血管内皮細胞および、管腔を形成しない球形も

しくは樹状形の細胞に陽性であった。これらの管腔形成に関与していない CD31 陽性細胞は CD105 陰性の細胞で、血管内皮細胞とは異なる細胞であることが明らかとなった。さらにこれらの CD31 と GFP の蛍光免疫二重染色により、CD31 陽性細胞は GFP 陽性であり、骨髓細胞由来であることが明らかとなった。

これらの骨髓由来 CD31 陽性細胞は、癌間質細胞としての報告はなされていない。近年の研究では、心筋梗塞の創傷治癒過程において、CD31 陽性の BMDC が、血管新生を誘導するとの報告がなされている³⁰⁻³²⁾。これは今回我々が報告した CD31 陽性 BMDC と細胞形態や発現マーカーが類似しており、同一の細胞であると考えられる。本実験でも腫瘍の辺縁部や転移巣では豊富な血管分布と著明な血管面積が広く、かつ CD31 陽性 BMDC の出現があり、当該部での血管新生を誘導し、浸潤や転移に関与している可能性が示唆された。

腫瘍血管を構成する血管内皮細胞は、腫瘍血管内皮細胞(tumor endothelial cells : TEC)と呼称され、正常血管内皮と比較して遺伝的にも性質が異なることが報告されている³³⁾。また近年の研究では、悪性度が異なる癌における血管内皮の性質を比較することで、転移能の高い腫瘍の TEC は、転移能の低い TEC に比べ薬剤抵抗性や血管新生能が旺盛で、癌の転移にも深く関与している可能性が報告されている³⁴⁾。本実験でも、CD31 陽性 BMDC が TEC の増生を誘導している可能性が示唆された。

結 語

本実験により，多数の BMDC が腫瘍組織内に存在しており，部位により局在が異なることが明らかとなった。BMDC は特に腫瘍が周囲組織に浸潤している腫瘍辺縁部や，転移巣で著明に集簇し，腫瘍の浸潤性や転移能に積極的に関与している可能性が示唆された。

さらに，腫瘍内に存在する腫瘍血管は非骨髄由来であり，組織から動員されていると考えられたが，腫瘍血管が多く存在する腫瘍辺縁部や転移巣で，CD31 陽性 BMDC の集簇がみられ，これらの細胞が血管新生を促進して，腫瘍の浸潤性や転移能に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり，懇篤なる御指導，御校閲を賜りました岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科口腔病理学分野，長塚仁教授に謹んで感謝の意を表します。
さらに，懇切なる御指導を賜りました岡山理科大学臨床生命科学科組織病態学，
辻極秀次教授ならびに，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病理学分野，
中野敬介准教授に心より感謝いたします。最後に本研究を行うにあたり，貴重
な御援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物
学分野，中山真彰先生ならびに口腔病理学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げ
ます。

文献

- 1) Bissell, MJ., Radisky, D.: Putting tumors in context. *Nat. Rev. Cancer*, **1(1)**, 46-54, 2001.
- 2) Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., Kalluri, R.: Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.*, **67(21)**, 10123-10128, 2007.
- 3) Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A.: Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, **23(11)**, 549-555, 2002.
- 4) Damya, L., Kiavash, M., et al.: Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int. J. Dev. Biol.*, **55(7-9)**: 861-867, 2012.
- 5) Michele, D, P., Mary A, V., Rossella G., Lucia S, S., Letterio S, P., Maurilio S., Luigi N.: Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Neuro-Onco.*, **8(3)**, 211-226, 2016.
- 6) Ethan, R., Debabrata, B.: Subverting subversion: a review on the breast cancer microenvironment and therapeutic opportunities. *Breast Cancer: Basic Clin. Res.*, **9(S2)**, 2015.
- 7) Achim, K.: Premetastatic niche formation in the liver: emerging mechanisms and

mouse models. *J. Mol. Med.*, **93(11)**, 1193-1201, 2015.

8) Michael, Q., Shui, P, T., Hiroyuki, T., et al.: Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth.: *Cancer Cell*, **19(2)**, 257-272, 2001.

9) Héctor P., Maša A., Simon L., et al.: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.*, **18(6)**, 883-891, 2012.

10) Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S.J.: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, **105(3)**, 369-377, 2001.

11) Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, **284(5417)**, 1168-1170, 1999.

12) Nishizaki, K., Teshima, T., Takeda, Y., Yoshinobu, J., Takeuchi, A., Orita, Y., Sugata, Y., Nagatsuka, H., Nagai, N.: The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium. *Brain Res.*, **1052(1)**, 10-15, 2005.

13) Sangai, T., Ishii, G., Kodama, K. et al.: Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer induced stroma. *Int. J. Cancer*, **115(6)**, 885-892, 2005.

- 14) Oscar, R., Colegio, N. C., Alison, L. S, et al.: Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, **513(7519)**, 559-563, 2014.
- 15) Komohara, Y., Jinushi, M., Takeya, M.: Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumor. *Cancer sci.*, **105(1)**, 1-8, 2013.
- 16) De, P. M., Venneri MA., Roca C., Naldini, L.: Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat. Med.*, **9(6)**, 789-795, 2003.
- 17) Ruhrberg, C., De Palma, M.: A agent in cancer: deciphering macrophage roles in human tumors. *Nat. Med.*, **16(8)**, 861-862, 2010.
- 18) Boisset, J.C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., Robin C.: In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, **464(7285)**, 116-120, 2010.
- 19) Park, C., Ma, Y.D., Choi, K.: Evidence for the hemangioblast. *Exp. Hematol.*, **33(9)**, 965-970, 2005.
- 20) Wu, S.M., Chien, K.R., Mummery, C.: Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell*, **132(4)**, 537-543, 2008.
- 21) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for

angiogenesis. *Science*, **275(5)**, 964-967, 1997.

22) Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P., Kerbel, R.S.: The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat. Rev. Cancer*, **6(11)**, 835-845, 2006.

23) Kerbel, R.S.: Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.*, **358(19)**, 2039-2049, 2008.

24) Nolan, D.J., Ciarrocchi, A., Mellick, A.S., Jaggi, J.S., Bambino, K., Gupta, S., Heikamp, E., McDevitt, M.R., Scheinberg, D.A., Benezra, R., Mittal, V.: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.*, **21(12)**, 1546-1558, 2007.

25) Domenico, R.: The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, **8(3)**, 294-300, 2004.

26) Ishii, S., Tsuji, S.: Involvement of bone marrow-derived stromal cells in gastrointestinal cancer development and metastasis. *J Gastroenterolo. Hepatol.*, sup 2, 242-249, 2008.

27) Hyun-Jai C., Namho L.: Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J. Exp. Med.*, **204(13)**, 3257-3269, 2007.

28) Sunyoung, P., Christine, M., Sorenson, N, S.: PECAM-1 isoforms, eNOS and

endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clini. Sci.*, **129(3)**, 217-234, 2015.

29) Federica, M., Marelli, B., Marc C., Claudio M., Giuseppina, C.: An immunologist's guide to CD31 function in T-cells., *J. Cell Sci.*, **126(11)**, 2343–2352, 2013.

30) Can, T., Feng-Sheng, W., et al.: Shock wave treatment induces angiogenesis and mobilizes endogenous CD31/CD34-positive endothelial cells in a hindlimb ischemia model: Implications for angiogenesis and vasculogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **146(4)**, 971-978, 2013.

31) Kim, S. W., Kim H.: Human peripheral blood-derived CD31+ cells have robust angiogenic and vasculogenic properties and are effective for treating ischemic vascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **56(7)**, 593-607, 2010.

32) Lee, S., Yoon, Y. S.: Revisiting cardiovascular regeneration with bone marrow-derived angiogenic and vasculogenic cells. *Bri. J. Pharmacol.*, **169(2)**, 290-303, 2013.

33) Hida, K., Hida, Y. Amin, D. N. Et al.: Tumor associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.*, **64(22)**, 8249-8255, 2004.

34) Ohga, N., Ishukawa, S., Masishi, N. et al.: Heterogenity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high and low metastatic tumors.: *Am. J. Pathol.*, **180(3)**, 1294-1307, 2012.

図表の説明

図 1: ヘマトキシリン・エオジン染色および GFP 染色による腫瘍部の評価

a: ヘマトキシリン・エオジン染色。原発モデルの腫瘍のルーペ像。

b: ヘマトキシリン・エオジン染色。転移モデルの肺のルーペ像。

ab: 原発モデルの腫瘍組織辺縁部を Peripheral area (PA)とし、腫瘍組織中心部を Central area (CA)とした。また、転移モデルの肺転移組織を Metastatic area (MA)とした。

c: PA 部では腫瘍細胞は紡錘形の形態をとり、間質へ浸潤する像が観察された。

d: CA 部では腫瘍細胞は敷石状に配列し、互いに密に接して観察された。

e: MA 部では紡錘形の細胞と球形の細胞が混じり合うような形でみられた。

f: PA 部

g: CA 部

h: MA 部

f-h: 免疫組織化学染色(GFP, 200 倍)。PA, CA, MA では、腫瘍組織内に、樹状形、もしくは球形を示す GFP 陽性細胞が多数認められた。

i: ランダム 10 視野で、GFP 陽性細胞をカウントし、その平均を比較した。PA, MA

が CA 部に比べ優位に細胞数が多かった。

図 2: α -SMA,CD3,CD11b 陽性細胞の評価

a-c: α -SMA(200 倍)。腫瘍間質の血管周囲の平滑筋に陽性像が見られたが、領域 (CA, PA, MA) による違いは明らかでなかった。また、PA においてごく少数、 α -SMA 陽性の管腔形成を取らない紡錘形細胞が観察された

d-f: CD3(200 倍)。リンパ球様の小型の球形細胞で陽性像は認められた。PA, CA, MA による違いは認められなかった。

g-i: CD11b(200 倍)。原発モデル、転移モデルともに腫瘍組織内に多数浸潤していた。またこれらの陽性細胞は球形、もしくは樹状形を示す細胞で、GFP 陽性細胞と類似する細胞であった。原発モデルの腫瘍中心部の壊死巣でも多数の球形の陽性細胞が観察された。

j:各エリアに CD11b 陽性細胞が観察され PA と CA では CA で優位に陽性細胞が多かった。また CA では壊死部に多数の CD11 b 陽性細胞がみられた。(p>0.05)。

k -m: 蛍光免疫二重染色(k: CD11b, l:GFP, m:merge, 200 倍)

(矢頭)CD11b と GFP 二重陽性細胞。(矢印)GFP のみ陽性の細胞。壊死巣で多数の二重陽性細胞が観察され、腫瘍組織内でも少数、二重陽性細胞が観察された。

また、CD11b 陰性の GFP 陽性細胞も、腫瘍組織内で多数観察された。

図 3:CD34, CD105 陽性細胞の評価

a-c:CD105(200 倍)。d-f:CD34(200 倍)。管腔構造もしくは裂隙状構造を形成する腫瘍組織内の血管の血管内皮細胞に陽性であった。

g-i: 蛍光免疫二重染色(k: CD11b, l:GFP, m:marge, 200 倍)

(矢頭)CD105 と GFP 二重陽性細胞。(矢印)GFP のみ陽性の細胞。GFP 陽性の血管内皮は観察されなかった。

j:各エリアの血管の総面積の比較($p<0.05$)。

図 4: CD31 陽性細胞の評価

a-c: 免疫組織化学染色(CD31, 200 倍)。

a: PA 部, b:CA 部, c: MA 部

d: PA, MA 部で CA 部に比べ、明らかに CD31 陽性細胞が多い傾向がみられた($p<0.05$)。

e-g: 蛍光免疫二重染色(e: CD31, f:CD105, g:marge, 200 倍)

(矢頭)CD31 陽性単核細胞。(矢印)CD105 と CD31 二重陽性の血管内皮細胞。

h-j: 蛍光免疫二重染色(h: CD31, i:GFP, j:marge, 200 倍)

(矢頭)CD31 と GFP ダ二重陽性細胞。

h: PA 部, i: CA 部, j: MA 部

k: TS, TM 部で TA 部に比べ, 明らかに CD31 と GFP 二重陽性細胞が多い傾向が
みられた($p<0.01$)。