

氏 名	佐能 彰
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7011号
学位授与の日付	令和6年3月25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	口腔癌における骨髄由来間葉系幹細胞の役割
論文審査委員	飯田 征二 教授 沢 禎彦 教授 池亀 美華 准教授

学位論文内容の要旨

【諸言】

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)は、骨や軟骨、脂肪など、様々な間葉系細胞に分化可能な多能性幹細胞である。MSCs は骨髄に多く存在し、血流などによって全身に分布し各所で様々な細胞に分化する。特に、骨髄由来 MSCs は創傷治癒や組織再生において重要な役割を果たすことが知られている。近年、腫瘍組織においても骨髄由来 MSCs は様々な間質細胞に分化し腫瘍組織に影響を与えることが明らかとなってきた。例えば乳癌では、がん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast: CAF)の一部は骨髄由来 MSCs から供給されることが報告されており、腫瘍血管内皮細胞に分化し血管新生に関与する。さらに、骨髄由来 MSCs は、腫瘍免疫において免疫を抑制し腫瘍促進的に働くことが報告されている。しかし、腫瘍組織における骨髄由来 MSCs の役割は不明な点が多く、口腔癌についてほとんど研究が行われていない。本研究では、口腔癌と骨髄由来 MSCs の役割について検討を行った。

【材料と方法】

骨髄由来 MSCs の腫瘍組織における役割を明らかにするため、酵素処理骨髄移植(Improved Bone Marrow Transplantation: iBMT)法を用いた。iBMT 法は、酵素処理を行わない従来の骨髄移植法に比べより多くの MSCs を移植可能であり、移植後生体内で骨髄由来 MSCs をトレースすることができる手法である。この手法を用い、Green Fluorescent Protein (GFP)マウス(C57BL/6-Tg (CAG-EGFP))より採取された骨髄を、10Gy の放射線照射を受けた野生型マウス(B57BL6J)に移植し、骨髄由来細胞のみ GFP で標識されたキメラマウスを作製した(iBMT マウス)。iBMT マウスの咬筋にマウス口腔癌細胞株2(Mouse Oral Cancer 2: MOC2)を移植し、咬筋移植モデルを作製した。腫瘍移植後3週間でマウスを安楽死させ、腫瘍組織、肺、骨髄を摘出し、常法に従い固定・パラフィンプロックを作製した。ブロックより組織切片を作成し、Leptin Receptor (LepR)、Stromal Derived Factor 1 (SDF-1)、CD34、 α -Smooth muscle Actin (α -SMA)、GFP の局在について免疫組織化学染色、蛍光免疫二重染色を行い検討した。なお、コントロールとして、骨髄移植後間葉系幹細胞の生着に乏しい従来の骨髄移植法を用いて作製したキメラマウス

(BMT マウス群)、骨髄移植を行わない正常マウス (Wild 群) とし、これらのマウスと iBMT 群を比較した。

LepR のアンタゴニスト (SHU9119) を、iBMT を行い MOC2 を移植したマウスに投与する (SHU9119 群) ことで、間葉系幹細胞の腫瘍組織や肺転移への影響を検討した。生理食塩水を投与した群をコントロールとした (Saline 群)。

【結果】

iBMT 群では、椎骨骨髄組織は Wild 群に似た組織像を示した。また、免疫染色により各実験群の骨髄組織における間葉系幹細胞のマーカー LepR、SDF-1 の陽性細胞数を比較したところ、iBMT 群骨髄組織では、BMT 群と比較して有意に多数の LepR、SDF-1 陽性細胞が観察された。また、iBMT 群と Wild 群間に LepR と SDF-1 陽性細胞数の有意差はなかった。

MOC2 を移植した部位の腫瘍組織では、iBMT 群では中心部に小型の壊死があり周囲に脈管様構造が多数観察されたが、BMT 群では、腫瘍中心部に大型の壊死がみられ、脈管様構造の数も少なかった。Wild 群も、腫瘍組織中心部の壊死領域は小さく、脈管様構造が観察された。壊死の領域は、BMT 群が他の 2 群に比べ有意に大きかった。また同腫瘍組織では、iBMT 群は BMT 群に比べ、CD34 陽性細胞や α -SMA 陽性細胞が有意に増加しており、iBMT 群の CD34 もしくは α -SMA 陽性細胞の多くは GFP 共陽性であった。

肺組織では、iBMT 群と Wild 群に MOC2 の転移組織を認めた。MOC2 転移組織には、LepR 陽性細胞の浸潤が観察され、これらの細胞は GFP 陽性であった。LepR、GFP 共陽性細胞は、肺の非転移組織では観察されなかった。

SHU9119 により LepR を競合阻害すると、Saline 群に比べ、腫瘍の壊死領域が拡大し、肺転移が減少した。

【考察】

iBMT 群と Wild 群の椎骨骨髄の組織像、LepR、SDF-1 の免疫組織化学的染色性は両群間で類似しており、iBMT 群の骨髄の状態が正常マウスに近いと考えられた。MSCs と血球系幹細胞は、互いに結合して幹細胞 niche を形成していることから、MSCs を多く移植可能な iBMT 群でより多くの niche 形成が進み、正常に近い骨髄組織が形成されたと考えられた。

また、腫瘍組織においては、iBMT 群で CD34 陽性の骨髄由来血管内皮細胞や、 α -SMA 陽性の骨髄由来 CAF が多数観察された。これらの細胞は、BMT 群ではほとんど観察されず、骨髄由来 MSCs が腫瘍組織において血管内皮細胞や CAF に分化していると考えられた。また、骨髄由来の血管や CAF が増加したことで、腫瘍中心部での壊死が iBMT 群において減少したと考えられた。

肺転移では、転移巣でのみ骨髄由来 LepR 陽性細胞が確認され、同細胞の転移への関与が疑われた。さらに、LepR の阻害により肺転移が抑制され、LepR 陽性細胞も減少したことから、骨髄由来 LepR 陽性細胞は、肺転移において重要な役割を示すことが示唆された。

【まとめ】

以上より、口腔癌において骨髄由来 MSCs は、腫瘍血管内皮細胞や CAF に分化し腫瘍の生存や肺転移の促進に関与すると考えられた。また、LepR は新たな口腔癌治療の標的となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【緒言】近年、骨髄の間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)は、悪性腫瘍組織内で様々な間質細胞に分化し、その増殖に影響を与えることが明らかになっており、いくつかの腫瘍で、がん関連線維芽細胞や腫瘍血管内皮細胞に分化しうること、また、腫瘍に対する免疫を抑制することが報告されている。しかし、骨髄由来 MSCs が口腔癌の増殖に与える影響についてはほとんど明らかとされていない。本研究では、異なる骨髄移植法を用いて口腔癌の増殖や転移における骨髄由来 MSCs の役割について検討した。

【材料と方法】 放射線照射により骨髄細胞を死滅させたマウスに、GFP マウスの骨髄から、酵素処理骨髄移植 (Improved Bone Marrow Transplantation: iBMT) 法あるいは従来の骨髄移植 (Bone Marrow Transplantation: BMT) 法を用いて採取した骨髄細胞を移植し、MSCs の生着程度が異なるマウスを作製した。これらの骨髄移植マウス、および、未処置の野生型マウスの咬筋に、口腔癌細胞株 (Mouse Oral Cancer 2 ; MOC2) を移植し、3 週間後に試料を採取した。パラフィン包埋、切片作製後、免疫染色により、LepR、SDF-1、CD34、 α -SMA、GFP の局在について検討した。また、iBMT 群マウスに LepR 阻害剤 (SHU9119) を投与して、LepR 陽性細胞の腫瘍組織や肺転移への影響を検討した。

【結果】 iBMT 群では、椎骨骨髄組織において LepR、SDF-1 陽性細胞数が従来法である BMT 群に比べ有意に多く観察され、野生型マウスに類似した局在を示した。腫瘍細胞においても、iBMT 群では、壊死組織の範囲やその周囲に形成された脈管様構造が、野生型マウスの腫瘍組織の状態に類似した。また同腫瘍組織では、従来の骨髄移植群に比べ、CD34、 α -SMA 陽性細胞が有意に多く、GFP 共陽性も認められた。iBMT 群では、肺に転移した腫瘍組織に LepR 陽性細胞の浸潤が認められ、GFP 共陽性も認められたが、非転移組織では観察されなかった。SHU9119 により LepR を競合阻害すると、腫瘍の壊死領域が拡大し、肺転移が減少した。

【考察】 iBMT 法では BMT 法に比較し、骨髄では幹細胞 niche が形成され、正常に近い骨髄組織塊を得られ、MSCs 研究には適していると考えられた。また、この方法で作製した実験群では、移植した口腔癌組織に GFP 共陽性を示す血管内皮細胞やがん関連線維芽細胞が多く認められたことから、骨髄由来 MSCs がそれらに分化したと考えられた。さらに LepR 阻害による肺転移抑制効果より、骨髄由来 LepR 陽性細胞は肺転移において重要な役割を示すことが示唆された。

本研究では、口腔癌の浸潤、転移のメカニズムへの骨髄MSCsの関与を検討した。得られた成果は新規性に富んでおり、また浸潤、転移に対する新規治療法を開発する上での礎となるものである。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。