

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
(自 署)	研究指導、総括
(自 署)	実験計画、手技指導
(自 署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野 口腔顎顔面外科学分野	身分 大学院生	氏名 佐能 彰
論 文 題 名 口腔癌における骨髄由来間葉系幹細胞の役割		
【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、椎骨骨髓組織は 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髓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 群骨髓組織では、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 群の椎骨骨髓の組織像、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 群の骨髓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、正常に近い骨髓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 陽性の骨髓由来血管内皮細胞や、 α -SMA 陽性の骨髓由来 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、骨髓由来 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、骨髓由来の血管や 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、転移巣でのみ骨髓由来 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、骨髓由来 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、口腔癌において骨髓由来 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。