

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15261

研究課題名(和文) マイクロキメリズムと癌化の検証

研究課題名(英文) Fetal microchimerism and cancer

研究代表者

清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80300929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎児マイクロキメリズムは妊娠中に胎児の細胞が母体に混入する現象を指す。その意義は不明であるが、「混入細胞が癌化する」という現象の有無を確認することを本研究の目的とする。方法は、蛍光蛋白質発現マウスを用いた交配・変異剤投与による発癌誘導・2光子顕微鏡による生きたマウスにおける混入(癌化)細胞の追跡である。混入細胞の発癌が証明されれば、新たな疾患概念を提出し、発癌に關与する細胞種に基づいた新たな治療法を開発することに繋がる。実験的には、癌の初期から細胞を生きた細胞で追跡することが可能になり、周囲組織との相互作用による悪性化を理解するうえでの、有用なモデルとなる。

研究成果の概要(英文)：Fetal chimerism is defined as the fetal cell migration into the mother during the pregnancy. We here addressed the hypothesis that migrated fetal cells become malignant in the mother. Crossing the male GFP (green fluorescent protein) transgenic mouse and the wild-type female mouse, we will try to identify the GFP-positive cells in the mother. After confirming the GFP cells, we will treat the mother with chemicals to induce inflammation/cancer. If this hypothesis is proven, we could propose the novel criteria of malignancy, novel strategies for diagnosis and treatment. From the view of experiment design, we could follow the cancer cells from the very early stage, which is useful to investigate the relationship between the interstitial cells and cancer.

研究分野：実験病理学

キーワード：キメラリズム 妊娠 蛍光蛋白質

1. 研究開始当初の背景

キメラリズムとは一つの個体に異なる遺伝情報 (= 染色体) から成る細胞が存在することであり、マイクロキメラリズムとは混入している細胞の数が少ないものを指す。骨髄移植や臓器移植後にレシピエントにドナーの細胞が混入することがよく知られているが、性交や妊娠・出産によっても、男性(父親または子供)の細胞が女性に移入することが知られており、胎児マイクロキメラリズムと呼ばれ、出産経験のある成人女性の肝臓では36%に見られるとの報告がある(Int J Develop Biol, 2010)。

マイクロキメラリズムと癌に関連する症例報告には、乳癌や甲状腺の乳頭がんでは抑制的に機能し、大腸癌では促進するという報告もあるが、混入細胞が免疫細胞として機能するという概念は同じである(Eur J Cancer, 2012)。混入細胞ががん化する症例報告もあり、12歳男子の胃癌死亡症例では、胎内で消失した男子双子の細胞が混入し癌化したと推察されている(BMC Cancer 2011)。中年女性の甲状腺腫にY染色体細胞があり、切除後は血中の胎児由来DNAが消失したという報告もある(Clin Chim Acta 2008)。混入細胞の上皮への分化に関しては、出産経験女性の肝生検では3万個に1つの細胞がY染色体を持つ細胞であり、肝細胞マーカーを発現していたことから(Lab Invest., 2004)、移入した幹細胞が、定着しやすい組織で分化する可能性を示している。胎児マイクロキメラリズムよりも症例数が多い骨髄移植後の発癌の場合でも、肉腫や癌腫といった固形がんを発症したという症例報告はいくつかあるが、患部に存在していたとしてもドナーの細胞の貢献度は少ないという報告もあり(Jpn J Clin Oncol 2013; Anti Can Res., 2012)。「混入した細胞が癌化する」というアイデアは、確立した事実という訳ではない。しかし、先述のように混入・定着・上皮細胞への分化という現象がある程度の割合で存在し、癌化する例が確率が低いながらもあるとすると、これまで特異な組織像を示し、治療の方針が定まらなかった症例の原因が胎児マイクロキメラリズムが原因である可能性がゼロではあるとは言えない。

蛍光蛋白質 GFP を発現するマウスのオスと野生型のメスと系統が同じマウスで交配すると、母親の肺の隔壁の毛細管の近くに幹細胞マーカーを持つ蛍光を発する単核球として存在していた(Stem Cells & Dev., 2011)。ヒトの場合、Y染色体を fluorescent in situ hybridization (FISH) にて検出できるかどうかで、胎児マイクロキメラリズムを判定しているのだから、同性間では検証されていないことや、通常の腫瘍の検索では、性染色体を検査しないことなどから、胎児マイクロキメラリズム由来の発癌は、意外に多く存在しているのではないかと考えたのが、本研究課題の動機である。

マイクロキメラリズムが疾患に間接的に関与する報告として、入江らは胆道閉鎖症では母親由来の免疫担当細胞が多数みられることから母系マイクロキメラリズムが疾患の原因になっている可能性を提唱している(Expert Rev Gastroenterol Hepatol., 2009)。胎児マイクロキメラリズムを自己免疫疾患が女性に多い原因として挙げられている報告もあり、混入する細胞そのものが癌化しない場合でも、なんらかの発癌あるいは悪性化に関与する可能性がある。癌の場合は、間質細胞との相互作用によって悪性化が進むことは多数報告があり、混入細胞特異的は蛋白質などによって悪性化が進むという新たな経路を導く可能性がある。

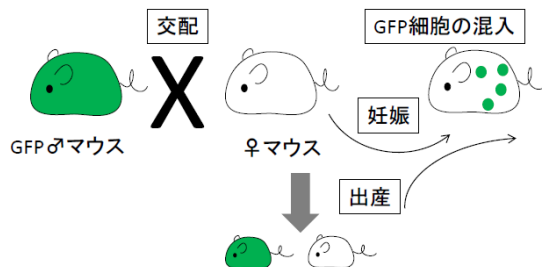
2. 研究の目的

妊娠・出産によって母体に混入した胎児由来の細胞が、母体内において「混入細胞が癌化する」という現象の有無を確認することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

マウスを用いた実験による検証を行う。

蛍光蛋白質 GFP を発現するオス(C57BL/6系統)と、野生型のメス(ICR系統)を交配し、メス体内での蛍光蛋白質細胞の有無を検出する。母体に蛍光蛋白質を発現する細胞が検出されれば、更に化学発癌により混入細胞が癌化するか検証する。

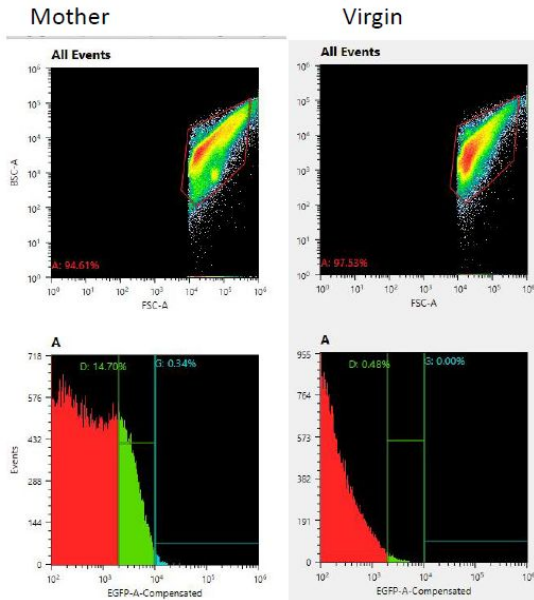


4. 研究成果

(1) FACS による GFP 細胞の確認

上記交配マウスの母親およびコントロールとして未産マウスを用い、肺および肝臓を単離し、1細胞レベルまで組織を機械的に組織を分解した後、FACSを行った。肺はマウスの同系交配実験の既報告で混入細胞が報告されていたことから、肝臓はヒト妊娠例では肝臓がよく調べられていたことから選択した。

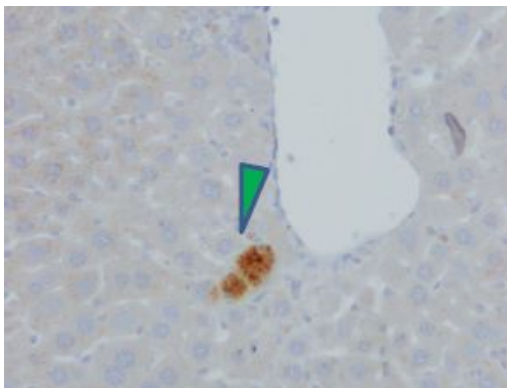
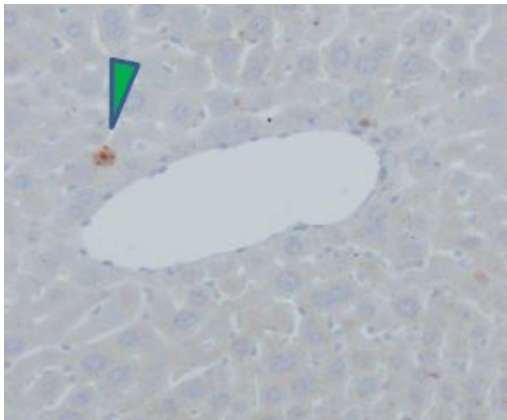
次頁の図は、1回目の出産から2週間後の2回目の妊娠中(Mother)のマウスと、コントロールの未産マウス(Virgin)の肝臓の結果である。上のパネルが細胞の大きさと濁度で細胞を分類したもので、下はその細胞のGFPの蛍光強度を横軸に取ったグラフである。赤で表示がある区分は、未産産でほとんどを



占める GFP 陰性細胞であり、緑に表示した区分が、GFP 陽性細胞である。このように妊娠中マウスの肝臓で高率に GFP 陽性細胞が認められる。しかし、肺では検出されなかった。また、出産後 2 週間経っていても妊娠中で無いマウスでも GFP 陽性細胞は検出されなかった。

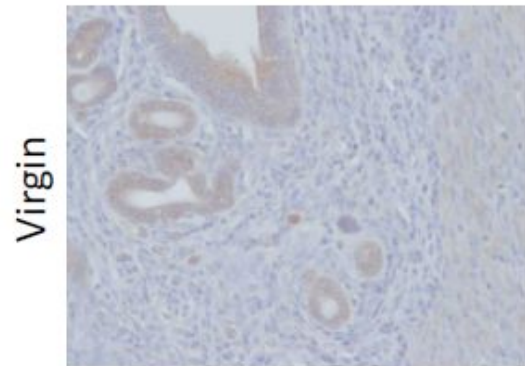
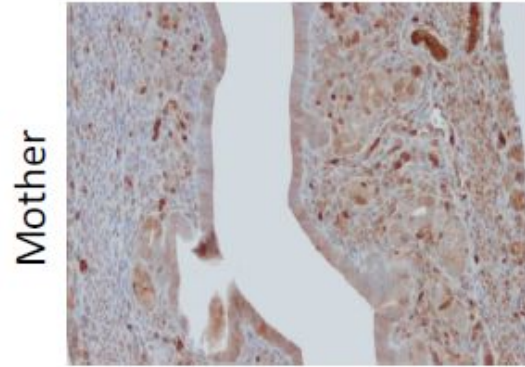
(2) 免疫染色による GFP 陽性細胞の検出

各臓器から組織切片を作製し、GFP 抗体による組織免疫染色を行った。妊娠中のマウスで肝臓および子宮に陽性細胞が観察された(下図・緑矢頭)が、出産後では検出されなかった。



肝臓での GFP 陽性細胞は、大きさにはバラ

つきがあるが、中心静脈近くの類洞に有ることが多く、その形態からクッパ細胞かあるいはマクロファージであると考えられた。活性化しているか否かで細胞の大きさが変化している可能性や、また由来が異なる可能性もある。これまで、骨髄由来で組織に移入してくる群なのか、発生段階から肝臓に定着している群があるとされてきたが、混入した胎仔細胞が正常では異なる分化や動態をしている可能性もある。



また子宮では、上皮細胞では非特異的な染色があるものの、上皮細胞・間質細胞のいずれにおいても、妊娠中のマウスでは GFP 陽性細胞が非常に多いことがわかった(上図)。

(3) マウス臓器の透明化による GFP 陽性細胞の検出

肺および肝臓の CUBIC 法(Susaki ら, Cell, 2014)による透明化を行い、2 光子顕微鏡で観察したが、CUBIC 液の浸透期間によって自家蛍光を発する細胞が観察されることがわかり、適切なコントロールを置く必要があることがわかった。GFP 抗体による免疫染色を行えば、細胞の検出は可能であると考えられた。

本研究では、GFP マウスを用いて、GFP 陽性細胞を検出することを試みた。これまでの報告では肺が一番混入が多い臓器とされてきたが、我々の結果はそうではなかった。結果が異なる理由として、以前の報告では、オスとメスが同じ系統であるのに対し、本研究では、母として用いたマウスの種がオスと異なることが挙げられる。異なる系統を用いている我々の実験の方が、ヒトにより近い状況

を再現していると考えられる。また、妊娠中のマウスでは GFP 陽性細胞が多かったのに対し、出産後では検出することが出来なかったことを考え合わせると、妊娠中の母体では、胎仔由来の細胞を受け入れることが出来る免疫的に寛容な状態にあることが考えられる。また、胎仔由来の細胞の寿命は 1 - 2 週間程度と短く、妊娠中は絶えず供給されているが、出産後に供給が途絶えると妊娠中に混入した細胞は自然に死に至る、という機構が考えられる。ヒトでも妊娠中には、栄養膜細胞が母体に混入しても出産後 2 週間程度で消失するとされており、マウスとヒトで同様の機構があることを示唆している。

肝臓におけるマクロファージ・クッパ細胞は表面マーカーなど類似であるが、その起源が異なることが示唆されている。マクロファージは、骨髄由来で慢性炎症やそれに伴う線維化の状態になると患部に集合するとされているのに対し、クッパ細胞は胎児期から肝臓で作られる細胞であり、臓器の傷害を感知し、炎症反応を開始するとされている。本研究では形態よりマクロファージ・クッパ細胞であることが示唆されたが、今後は表面マーカーによる染色を行い細胞種を同定することが必要である。また、本研究では骨髄における混入細胞の検索を行っていないが、骨髄に定着しているかどうかを検討することも必要である。更に、肝臓に慢性炎症・線維化を誘導したり、担癌したりすることにより、患部に混入細胞が集積する条件を決め、その動態を観察することで混入細胞の役割を検索することが可能になると考えられる。また出産の有無によって、慢性炎症や線維化などの臓器の反応性の相違を検討することが出来れば、混入した細胞の機能に迫ることが可能となる。妊娠・出産の間に悪性腫瘍が発症（あるいは発見）し、急激に進行する症例が稀ながらも存在する。このような症例のモデルとして、更に洗練させていくことで新たな疾患概念を提示し、治療法を考える上で重要になると思われる。

本研究では FACS と免疫染色の検出が可能であったが、免疫染色では検出が感度が低いと考えられる。そのため、栄養膜細胞由来の細胞が混入していても、免疫染色では検出できていない可能性もある。FACS から細胞を回収してセルブロック（パラフィン包埋標本）は作製しているので、栄養膜細胞特異的に発現する抗体で染色することで栄養膜細胞の混入があるかどうかを調べることが可能である。

本研究では、GFP の持つ蛍光や、GFP に特異的に結合する抗体を用いて GFP 陽性細胞を検出したが、細胞が混入するのではなく、核酸を含むエクソソームが母体内に入り込んでいる可能性があり、その場合は肝臓の細胞はエクソソームを効率よく取り込む細胞であると言える。胎盤はエクソソームが豊富な臓器であると考えられており、我々の得た妊

娠中マウスの陽性細胞が全て胎仔由来の細胞とは考えがたく、大部分は胎盤での陽性細胞の原因はエクソソームであると考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~pathol1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)

金沢医科大学 医学部 教授

研究者番号：80300929