

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462783

研究課題名(和文) 転移腫瘍微小環境における骨髄由来細胞の機能解明

研究課題名(英文) Characterization and potential roles of bone marrow-derived stromal cells in cancer development and metastasis

研究代表者

藤井 昌江 (Fujii, Masae)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：30362685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織は、腫瘍細胞からなる実質と、線維芽細胞や血管など非腫瘍細胞からなる腫瘍間質で構成されており、近年、腫瘍間質は、腫瘍の浸潤や転移に関与することが報告されている。本研究は、骨髄細胞のみGFPで標識されたマウスに腫瘍を移植し、腫瘍間質のGFP陽性細胞の局在を観察することで、腫瘍間質における骨髄由来細胞の役割を検討した。結果として、腫瘍間質には多様な骨髄由来細胞が存在し、腫瘍組織辺縁部で有意に骨髄由来細胞が増加していた。その一部は癌関連マクロファージや癌関連線維芽細胞と考えられ、骨髄由来細胞は腫瘍間質で様々な細胞に分化し腫瘍の浸潤を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The activated tumor stroma participates tumor cell growth, invasion and metastasis has been the subject of recent studies. In the present study, bone marrow-derived cells in tumor stroma were traced using the GFP bone marrow transplantation model. The result revealed that a population of GFP positive cells showed peripheralis tumor par parenchyma more than tumor center. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) represent the major cellular component of the stroma. Bone marrow-derived cells might differentiate into inflammatory cells (tumor associated macrophage (TAMs) and endothelial cells that suggested promote tumor invasion.

研究分野：口腔病理

キーワード：腫瘍微小環境 骨髄由来細胞 血球系細胞

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、腫瘍細胞からなる腫瘍実質と、線維芽細胞や毛細血管、炎症細胞など、非腫瘍細胞からなる腫瘍間質で構成されている。近年、腫瘍間質は単に腫瘍の支持組織としての機能のみならず、腫瘍実質に微小環境を提供し、腫瘍の生存や浸潤、転移にまで関与することが明らかとなっている。

特に、血球系細胞は、従来腫瘍の排除に働くと考えられていたが、「慢性炎症が腫瘍の発育を促進する」(Nature Biotech 2011)、「腫瘍局所に動員された炎症細胞が転移を促進する」(Nature 2011)など、血球系細胞の腫瘍微小環境での役割の重要性が注目されている。

しかし、血球系細胞の腫瘍微小環境での役割は未だ不明な点が多い。

我々の研究室では、放射線照射を行なった野生型マウスに、GFP マウス由来の骨髄細胞を移植することで、骨髄のみ GFP 陽性のキメラマウスを作製する技術を確認した。

同キメラマウスを用いれば遠隔組織でも骨髄由来細胞を追跡することが可能であり、腫瘍微小環境における、骨髄由来血球系細胞の動態も検証可能である。実際、同キメラマウスにマウス由来肺癌 (Lewis Lung Cancer: LLC) を移植すると、転移巣で優位に GFP 陽性細胞が多くみられることが明らかとなった。また同細胞の多くは球形や樹状系の細胞で、血球系細胞の可能性が考えられた。

この結果から、「血球系細胞は腫瘍の浸潤や転移を促進する」という仮説を得た。

## 2. 研究の目的

ヌードマウスに GFP ヌードマウスより得た骨髄由来細胞を移植し、骨髄が GFP 陽性のキメラヌードマウスを作製する。同キメラマウスにヒト由来腫瘍細胞株を移植することで、ヒト腫瘍微小環境における血球系細胞の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) GFP ヌードマウス由来骨髄細胞の移植

GFP ヌードマウスは 組織を構成する細胞の全てが GFP 蛋白を発現している。樹立した細胞の移植実験では、移植した細胞がどのような細胞に分化しても GFP 蛋白を有する為、分化誘導した細胞の追跡が可能である。

### GFP ヌードマウス由来骨髄細胞の調整

GFP ヌードマウスをイソフルランの過吸入により屠殺し、大腿骨から骨髄細胞を回収した。

### 細胞移植

GFP ヌードマウスと同系の6週齢(雌)にX線照射(5Gray×2 Total 10Gray)を行った後、

尾静脈から  $1 \times 10^7$  個の細胞を移植した。

### (2) 腫瘍細胞の移植

骨髄移植後4週間を待って、作製した GFP キメラヌードマウスの背部皮下にヒト扁平上皮癌由来細胞株 (HSC2)  $10 \times 10^5$  cells を移植し、28日後に屠殺した。

屠殺したマウスは、心臓より4% paraformaldehyde を注入し、灌流固定を行った。

固定後腫瘍組織を周囲組織を含めて摘出し、4% paraformaldehyde で固定、定法にてパラフィンブロックを作製した。

### (3) 組織学的解析

#### 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にて封入し組織学的観察を行った。

#### 免疫組織化学的染色

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、GFP抗体として、ポリクローナル GFP抗体、T細胞マーカーとしてCD3抗体を使用した、単球・マクロファージのマーカーとしてCD11b抗体、間質の線維芽細胞のマーカーとして vimentin 抗体、血管内皮マーカーとしてCD34抗体を用いた。

陰性対照は二次抗体のみで行い、すべて陰性であった。

#### 蛍光免疫二重染色

GFP、CD11b、vimentin、CD34抗体を用いて蛍光免疫二重染色を行った。各抗体の希釈はCan Get signalで行った。

二次抗体反応終了後、対比染色としてDAPI  $1 \mu\text{g/ml}$  を3分間反応させた。洗浄後にFluorescence mounting medium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、vimentin陽性細胞について細胞数の計測を行った。細胞質陽性像を陽性判定とし、染色を施した腫瘍組織内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. 研究成果

### (1) GFP 陽性キメラヌードマウスの確立

骨髄移植後4週経過してから、マウスの骨髄を摘出し、GFPの免疫組織化学染色を行ったところ、骨髄細胞のみGFP陽性であった。

この結果から、同マウスは GFP 陽性骨髄幹細胞が生着し、骨髄細胞のみ GFP 陽性のキメラヌードマウスであると考えられた。これにより、ヌードマウスにおける GFP 陽性キメラヌードマウスの作製方法が確立された。

### (2) 腫瘍間質における GFP 陽性細胞の検討

GFP 陽性キメラヌードマウスに HSC2 を移植して得た腫瘍組織内には、多数の GFP 陽性細胞が観察された。また、GFP 陽性細胞は、球形もしくは樹状系の形態をした細胞で、腫瘍辺縁部では紡錘形の形態を示す細胞も観察され、多彩な細胞として観察された。また、GFP 陽性細胞は腫瘍中心部に比べ腫瘍辺縁部で有意に集簇していた ( $p < 0.05$ )。この結果から、骨髄由来細胞は、腫瘍間質に様々な細胞に分化して存在しており、腫瘍辺縁部で多数の集簇がみられることから、腫瘍の浸潤に関与している可能性が示唆された。

### (3) 細胞マーカーによる検討

#### ・ CD11b 陽性細胞

CD11b 陽性細胞は、多くは球形もしくは樹状形の細胞であった。CD11b 陽性細胞は、特に腫瘍辺縁部で多数の集簇がみられ ( $p > 0.05$ ) 腫瘍実質内に浸潤する細胞も観察された。蛍光免疫二重染色では、CD11b 陽性細胞の多くは GFP 陽性で、骨髄由来の細胞と考えられた。CD11b は血球系細胞の単球やマクロファージのマーカーであり、近年では TAM (Tumor associated macrophage) のマーカーとしても知られている。腫瘍の辺縁部に特異的に浸潤する CD11b 陽性細胞は、骨髄由来の TAM である可能性が考えられた。

#### ・ CD3 陽性細胞

CD3 陽性細胞は腫瘍組織内にほとんどみられなかった。CD3 は T 細胞のマーカーであり、本実験系では腫瘍組織間質に T 細胞はほとんど浸潤しないことが明らかとなった。しかし、ヌードマウスは免疫系が不完全であるため、野生型キメラヌードマウスで同様の検討が必要であると考えられた。

#### ・ vimentin 陽性細胞

Vimentin 陽性細胞は、腫瘍辺縁部や実質内の大型の細胞、腫瘍中心部間質など、広い範囲で観察された。Vimentin は間葉系の細胞に広く染色されるマーカーで、特に線維芽細胞や一部のマクロファージに陽性である。GFP との蛍光免疫二重染色では、腫瘍辺縁部の紡錘形細胞と腫瘍実質内の大型の細胞に重染が確認された。辺縁部の紡錘形細胞は線維芽細胞の可能性が考えられ、近年報告されている癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF) である可能性が考えられた。また、腫瘍実質で見られた大型の細胞は、従来報告のない骨髄由来の新たな腫瘍関連間質細胞である可能性が示唆された。

#### ・ CD34 陽性細胞

CD34 は血管内皮細胞のマーカーとして用いた。腫瘍間質内に多数の管腔を形成する CD34 陽性細胞を認められた。しかし、GFP 陽性の CD34 陽性細胞はみられず、腫瘍血管は組織由来であると考えられた。

### まとめ

腫瘍間質内には多数の骨髄由来細胞が存在しており、腫瘍組織内でも、腫瘍の辺縁部と中心部では局在が異なることが明らかとなった。また、TAM や CAF などのマーカーに陽性の細胞が多数観察され、骨髄由来細胞は腫瘍の浸潤に関与している可能性が考えられた。

### 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 3 件)

(1) Kawai Hotaka, Tsujigiwa Hidetsugu, Chong Huat Siar, Nakano Keisuke, Takabatake Kiyofumi, Fujii Masae, Hamada Mei, Tamamura Ryo, Nagatsuka Hitoshi. Characterization and potential roles of bone marrow-derived stromal cells in cancer development and metastasis. International journal of medical science. 2018; in press. (査読あり)

(2) Takebe Yuichiro, Tsujigiwa Hidetsugu, Katase Noki, Siar Chong Hust, Takabatake Kiyofumi, Fujii Masae, Tamamura Ryo, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi. Parenchyma-stromal interactions induce fibrosis by secreting CCN2 and promote osteoclastogenesis by stimulating RANKL and CD68 through activated TGF- $\beta$ /BMP4 in ameloblastoma. J Oral Pathol Med. 2017 Jan;46(1):67-75. doi: 10.1111/jop.12467. (査読あり)

(3) 河合 穂高、伏見 聡一郎、板倉 淳哉、井上 博文、藤井 昌江、武部 祐一郎、松川 昭博. 超音波内視鏡下穿刺吸引術 (EUS-FNA) で得られた gangliocytic paraganglioma の細胞像の検討. 日本臨床細胞学会雑誌第 55 巻第 6 号. J.Jpn.Soc.Clin.Cytol.2016;55(6):376-381 (査読あり)

#### [学会発表](計 9 件)

(1) 小野 早和子、中野 敬介、高畠 清文、河合 穂高、吉田 沙織、浜田 芽衣、藤井 昌江、信長 ひかり、辻極 秀次、長塚 仁「口腔扁平上皮癌の癌化過程における YAP および関連因子の検討」第 106 回日本病理学会総会、2017 年 4 月 27 日、東京

(2) 藤井 昌江、河合 穂高、辻極 秀次、玉村 亮、浜田 芽衣、小野 早和子、中野 敬介、長塚 仁「動物モデルを用いた、腫瘍微小環境における骨髄由来細胞の動態」第26回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2017年8月19日、岡山

(3) 藤井 昌江、井口 貴之、裕 雄麻、河合 穂高、中野 敬介「口腔細胞診における細胞採取方法の検討」第55回日本臨床細胞学会秋期大会、2016年11月18日、大分

(4) 浜田 芽衣、高畠 清文、辻極 秀次、藤井昌江、小野 早和子、信長 ひかり、中野 敬介、長塚 仁「エナメル上皮腫間質性状とCCN2およびYAP局在の分析」第25回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2016年8月19日、東京

(5) 小野 早和子、中野 敬介、高畠 清文、河合 穂高、吉田 沙織、浜田 芽衣、藤井昌江、信長 ひかり、辻極 秀次、長塚 仁「口腔扁平上皮癌におけるYAPの発現」第105回日本病理学会総会、2016年5月14日、宮城

(6) 高畠 清文、松田 寛之、辻極 秀次、于 湊、藤井 昌江、中野 敬介、長塚 仁「異所性骨形成微小環境における骨髄幹細胞の関与」第70回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2016年4月17日、福岡

(7) 河合 穂高、玉村 亮、藤井 昌江、武部 祐一郎、高畠 清文、松田 寛之、浜田 芽衣、辻極 秀次、長塚 仁「腫瘍の微小環境形成における骨髄由来細胞の動態」104回日本病理学会総会、2015年4月30日、愛知

(8) 藤井 昌江、片瀬 直樹、高畠 清文、武部 祐一郎、于 湊、河合 穂高、辻極 秀次、長塚 仁「DKK3の頭頸部扁平上皮癌における発現の検討」第25回日本臨床口腔病理学会 総会・学術大会、2014年8月28日、新潟

(9) 武部 祐一郎、河合 穂高、高畠 清文、于湊、伊藤 聡、藤井 昌江、辻極 秀次、長塚 仁「エナメル上皮腫腫瘍細胞による間質の変化について」第23回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2014年8月21日、台湾

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤井 昌江 (FUJII Masae)  
岡山大学 歯学部  
口腔病理学分野 博士研究員  
研究者番号：30362685

### (2)研究分担者

長塚 仁 (NAGATSUKA Hitoshi)  
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科  
口腔病理学分野 教授  
研究者番号：70237535

武部 祐一郎 (TAKEBE Yuichiro)  
岡山大学 歯学部  
口腔病理学分野 博士研究員  
研究者番号：00714677  
(平成28年4月21日より退職のため削除)

辻極 秀次 (TUJIGIWA Hidetsugu)  
岡山理科大学 理学部 教授  
研究者番号：70335628