



Title	唾液腺多形腺腫の間葉組織構造の由来に関する研究
Author(s)	松本, 由香
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34383
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (松本由香)	
論文題名	唾液腺多形腺腫の間葉組織構造の由来に関する研究
論文内容の要旨	
<p style="text-align: center;">緒言</p> <p>多形腺腫は唾液腺腫瘍で最も頻度が高く、その60%を占める。多形腺腫の組織像は特異で、腺管上皮と腫瘍性筋上皮からなる上皮組織と粘液腫様組織、硝子様組織および軟骨組織からなる間葉組織で構成されている。間葉組織には稀に脂肪組織や骨組織もみられる。これら間葉組織は腫瘍上皮細胞と未分化間葉細胞からの由来が考えられているが、上皮細胞の表現型を有する細胞が存在するという事実から、上皮細胞に由来するという考えが主流になっている。本研究は、多形腺腫の間葉組織が腫瘍上皮細胞に由来するという考えを検証し、加えて、そのメカニズムを明らかにするために行った。</p>	

材料と方法

1. 腫瘍組織

大阪大学歯学部附属病院口腔外科で切除した多形腺腫15例（耳下腺3例、頸下腺3例、小唾液腺9例）の10%ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を作製した。このうち4例（耳下腺1例、小唾液腺3例）からは腫瘍中央部の新鮮組織も得た。

2. 腫瘍細胞

1例の新鮮組織片をcollagenaseで処理して初代細胞培養を行った。クローニングにより初代培養細胞から17種の細胞クローンを得た。このうち長期の継代培養が可能であった3種の細胞クローンを実験に供した。

3. 間葉組織細胞への分化

間葉系幹細胞に準じて細胞クローンに間葉組織細胞への分化刺激を加えた。軟骨細胞への分化はアルシアンブルー染色、aggrecanと2型collagenの免疫組織化学とreal time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) で、骨芽細胞への分化はアリザリンレッドS染色で、脂肪細胞への分化はオイルレッドO染色で判定した。

4. RT-PCRとreal time RT-PCR

新鮮組織と細胞からRNAを抽出し、以下のマーカーについてのRT-PCRとreal time RT-PCRを行った：軟骨細胞分化マーカー (Sox9、aggrecan、2型collagen)、脂肪細胞分化マーカー (PPAR γ 、fatty acid binding protein4、lipoprotein lipase)、骨芽細胞分化マーカー (Runx2、alkaline phosphatase、osteocalcin)、上皮一間葉転換 (EMT) 関連マーカー (E-cadherin、N-cadherin、fibronectin、vimentin、Snai1、Snai2、Zeb1、Zeb2、Twist)、間葉系幹細胞マーカー (CD73、CD90、CD105)。

5. 免疫組織化学

ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を作製し、Sox9、aggrecan、2型collagen、PPAR γ 、Runx2、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、CD73、CD90、CD105の酵素抗体法による免疫組織化学を行った。

6. 免疫細胞化学

冷アセトンあるいは4%パラホルムアルデヒド固定した細胞にcytokeratin、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、CD73、CD90、CD105の蛍光抗体法による免疫細胞化学を行った。

結果

1. 腫瘍組織

すべての症例の間葉組織は粘液腫様組織あるいは粘液腫様組織/軟骨組織で、2例では脂肪組織もみられた。

2. 腫瘍組織の間葉組織細胞分化マーカー発現

RT-PCRでは、すべての間葉組織細胞の分化マーカーのmRNAを検出した。免疫組織化学では、Sox9、aggrecan、

2型collagen、PPAR γ のタンパク質を確認した。Sox9とaggreccanは上皮細胞、粘液腫様組織細胞、軟骨細胞に、2型collagenは軟骨細胞の基質に、PPAR γ は上皮細胞、粘液腫様組織細胞、脂肪細胞に認められた。

3. 腫瘍組織のEMT関連マーカー発現

RT-PCRではE-cadherin、間葉細胞タンパク質(N-cadherin、fibronectin、vimentin)、E-cadherin転写抑制因子(Snai1、Zeb1、Twist)といったEMT関連マーカーのmRNAを検出した。免疫組織化学ではE-cadherin、N-cadherin、vimentinのタンパク質の存在を確認した。E-cadherinとN-cadherinは上皮細胞に、vimentinは上皮細胞、粘液腫様組織細胞、軟骨細胞に認められた。上皮細胞におけるE-cadherinの発現は著しく減弱しており、細胞膜の発現はみられなかった。

4. 腫瘍組織の間葉系幹細胞マーカー発現

RT-PCRと免疫組織化学で間葉系幹細胞マーカーCD73、CD90、CD105のmRNAとタンパク質の発現を認めた。これらは上皮細胞と粘液腫様組織細胞に分布していた。

5. 腫瘍細胞

細胞クローニングは、紡錘形ないしは星形の線維芽細胞様の細胞であったが、免疫細胞染色でcytokeratinの弱い陽性反応があった。

6. 腫瘍細胞の各種マーカー発現

RT-PCRでは、間葉組織細胞分化マーカーとEMT関連マーカーにおいて、すべてのマーカーのmRNAを検出した。免疫細胞化学ではE-cadherin、vimentin、N-cadherin、CD73、CD90、CD105のタンパク質の存在を確認した。なおE-cadherinの免疫反応は微弱で細胞質に限局していた。

7. 腫瘍細胞の間葉組織細胞への分化

3種の細胞クローニングは、分化刺激の有無にかかわらずアリザリンレッドS染色とオイルレッドO染色は陰性であった。一方、アルシンブルー染色とaggreccan免疫染色は陽性で、分化刺激により2種の細胞クローニングで両染色の明らかな増強がみられた。これら2種の細胞のうち1種では、RNAが回収できたため、real time RT-PCRを行った。分化刺激によってaggreccanと2型collagenのmRNAが有意に上昇した。

考 察

多形腺腫では上皮組織、粘液腫様組織、軟骨組織は相互に連続して存在する。この組織構造と腫瘍組織における各種マーカーの発現から、上皮細胞は間葉系幹細胞の形質を獲得して軟骨細胞に分化することが示唆された。また、腫瘍上皮細胞の間葉細胞への分化に際し、EMTが関与している可能性が考えられた。つまり、上皮細胞はEMTを経て、粘液腫様組織細胞となり、上皮細胞と粘液腫様組織細胞は2型collagenを分泌して軟骨細胞の分化が完了することが示唆された。腫瘍組織から得られた細胞は、発現形質より上皮細胞であると考えられ、この細胞は間葉系幹細胞と同様に軟骨細胞に分化することが確認された。さらに、細胞の軟骨細胞への分化に伴って、骨芽細胞マーカーと脂肪細胞マーカーが発現することが確かめられた。

結 論

唾液腺多形腺腫の腫瘍上皮細胞は、間葉系幹細胞のように軟骨細胞に分化すると考えられる。これには、EMTが関与すると思われる。分化はEMTの進展に伴って進行して粘液腫様組織細胞と最終的に軟骨細胞の出現に至ると思われる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 ()		松本由香)
			氏名
論文審査担当者	(職)		
主査	大阪大学教授	由良義明	
副査	大阪大学教授	阪井丘芳	
副査	大阪大学准教授	大倉正也	
副査	大阪大学講師	福田康夫	

論文審査の結果の要旨

本研究は、唾液腺多形腺腫の間葉組織が腫瘍上皮細胞に由来するという仮説の検証と、そのメカニズムを明らかにする目的で、多形腺腫組織、細胞を用いて間葉組織細胞分化マーカー、上皮-間葉転換関連マーカー、間葉系幹細胞マーカーの発現の検証、および分化実験による分化能の評価を行ったものである。

その結果、多形腺腫の腫瘍上皮様細胞は間葉系幹細胞のように軟骨細胞に分化することが明らかになった。さらに、これには上皮-間葉転換の関与が考がえられた。

以上の研究成果は、唾液腺腫瘍の60%を占める多形腺腫についての理解と今後の研究の発展につながるものであり、本研究は博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。