



Title	口腔化学発癌モデルマウスを用いた発癌過程における腫瘍線維芽細胞の解析
Author(s)	奥村, 将
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91839
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 (奥 村 将)	
論文題名	口腔化学発癌モデルマウスを用いた発癌過程における腫瘍線維芽細胞の解析
論文内容の要旨 【研究の目的】 口腔上皮異形成 (oral epithelial dysplasia、以下dysplasia) は、正常粘膜上皮 (以下normal) から発生し、上皮内癌 (carcinoma in-situ、以下CIS) を経て、上皮基底膜を破壊し上皮下結合組織 (間質) に浸潤する口腔の扁平上皮癌 (Squamous cell carcinoma、以下SCC) へと進展する。近年、SCCを含む様々な癌において、癌細胞と、その周囲を取り巻く、線維芽細胞、血管、免疫細胞といった腫瘍微小環境が、腫瘍の進展や化学療法に対する反応性に関与していることが明らかになっている。癌組織中に出現する線維芽細胞は、特にCancer-associated fibroblast (以下CAF) と呼ばれ、間質に浸潤した癌細胞との相互作用を通じて、癌の進展に深く関与している。しかし、基底膜破壊と間質浸潤を伴わないdysplasiaやCISの間質に認められる線維芽細胞に関してはほとんど知られていない。 本研究では、normal-dysplasia-SCCと段階的に進展する口腔癌の自然史を解析可能な化学発癌モデルマウスを用いて、dysplasiaの粘膜下間質に存在する線維芽細胞をdysplasia-associated fibroblast (以下DAF) として、正常線維芽細胞 (normal fibroblast、以下NF) およびCAFと比較することでDAF の特徴を明らかにすると共に、normalからSCCへと進展する過程におけるNFとDAF、DAFとCAFの関わりについて細胞系譜解析法を用いて解明する。 【材料・方法】 1. 実験動物：タモキシフェン (Tx) 依存性に線維芽細胞特異的プロモーターである<i>Col1α2</i>プロモーターの下流にCre組み換え酵素を発現する<i>Col1α2^{CreERT}</i>マウスに、全ての細胞に<i>ZsGreen^{Loxp-STOP-Loxp}</i>を発現するレポーターマウスを交配して得られた、Tx存在下で線維芽細胞を特異的に緑色蛍光 (ZsG) で標識可能な<i>Col1α2^{CreERT}; ZsGreen^{Loxp-STOP-Loxp}</i> (以下<i>Col1α2;ZsG</i>マウス) を作製し実験に使用した。また、必要に応じて野生型のC57BL/6マウスも使用した。 2. 4NQO化学発癌：4-Nitroquinoline-N-oxide (4NQO) 化学発癌マウスモデルの作製にあたっては、生後6週 (以後、マウスの週齢はP6wなどと記す) の<i>Col1α2;ZsG</i>マウスおよびC57BL/6マウスに4NQO添加飲用水を16週間自由飲水 (P6w-P22w) させた後、飲用水を4NQO非添加飲用水に変更し自由飲水させた。発癌過程において、dysplasiaが認められる時期として4NQO非添加飲用水に変更後6週経過した時期 (P28w)、SCCが発生する時期として4NQO非添加飲用水に変更後15週経過した時期 (P37w) を選択して、安楽死の後、舌を採取した。 3. 病理組織標本の作製と組織学的解析と線維芽細胞の形態計測：4NQO化学発癌を行ったマウス舌組織より4%PFA固定パラフィン包埋切片 (以下パラフィン切片) を作製した。パラフィン切片より通法に従い、Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い、病理診断基準に準じて、normal、dysplasia、SCCに分類した。線維芽細胞の形態計測は、4NQO化学発癌モデルマウスの舌および、ヒトの病理組織検体から作成したnormal、dysplasia、SCCのHE染色標本を光学顕微鏡で観察し、間質の紡錘形細胞の核の短軸を計測し、比較検討した。 4. NF、DAF、CAFの回収とRNA発現解析・Gene ontology解析：<i>Col1α2;ZsG</i>マウスよりDAFを得るために、4NQO処理後にdysplasiaが生じたマウス、CAFを得るために4NQO処理後にSCCが生じたマウス、NFを得るために一度も4NQO処理を行っていないマウスを使用した。また、4NQOに暴露されているが形態学的には異常の認められない舌粘膜 (4NQO-normal) の線維芽細胞 (4NQO-Normal fibroblast、以下4NQO-NF) を採取する目的で、発癌実験の1/4期間である4週間の間、4NQO処理後 (P18w-P22w)、6週間経過した<i>Col1α2;ZsG</i>マウス (P28w) を使用した。それぞれのマウスよりDAF、CAF、NFおよび4NQO-NFを採取する1週間前にTxを投与し、1週間後、採取した舌組織より、間質組織を採取し、酵素的に個細胞単位まで分解し、Txにより標識されたZsGを指標にFACSにより、NF、	

4NQO-NF、DAF、CAFを回収したのちに、RNAシーケンス（以下、RNA-seq）を行った。RNA-seqにより得られたNF、4NQO-NF、DAF、CAFの4群のRNA発現解析の結果は、各種ウェブプラットフォームを用いて解析した。

5. 細胞系譜解析：NFをZsG標識し、DAFおよびCAFへの関与を解析するために、P5wにTxを投与し、4NQO処理（P6w-P22w）を行った後、dysplasiaが出現する時期（P28w）と、SCCが出現する時期（P37w）に舌を採取した。さらに、DAFをZsG標識し、CAFへの関与を解析する目的で、4NQO処理後、dysplasiaが出現する時期（P27w）にTxを投与し、1週間後（P28w）と、SCCが出現する時期（P37w）に舌を採取した。また、実験期間内で標識線維芽細胞の細胞系譜がどれほど存在するか、を確認する目的で、Txを投与してNFをZsG標識し（P5w）、4NQO暴露のない状態で、1週後（P6w）および、P37wに舌組織を採取した。

6. 免疫組織化学染色（免疫染色）および蛍光免疫染色：免疫染色、蛍光免疫染色には、一次抗体として、線維芽細胞マーカーである抗S100A4抗体、血管平滑筋/血管周皮細胞マーカーとして抗 α SMA抗体、血管内皮細胞マーカーとして抗Endomucin抗体を用いた。

7. 統計処理：3群以上の検定にはKruskal-Wallis検定を用いて統計学的有意差が確認された後、Dunn's multiple comparisons testにて多重比較を行い、2群の検定にはMann-Whitney検定を用いて2群間の比較を行った本研究では、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

【結果】

1. 線維芽細胞の形態的解析：マウスおよびヒトのNF、DAF、CAFの核の短径を比較したところ、発癌過程の進行に伴って、粘膜下結合組織の線維芽細胞に核腫大が見られることが明らかとなった。線維芽細胞がCAFと呼ばれる段階より早い時期、すなわちDAFの段階より、形態学的な変化が存在することが明らかとなった。

2. 線維芽細胞の遺伝子発現解析：発現遺伝子を基にヒートマップを用いた階層性クラスタリング解析を行ったところ、DAFは、NF、4NQO-NFやCAFと異なる独自の遺伝子発現パターンを有していることが示された。また、非階層性クラスタリング解析を行ったところ、DAFで高発現する遺伝子群では、上皮の分化に関連する遺伝子が多く含まれていた。

3. 細胞系譜解析：

① DAFやCAFがNFに由来するか否かを調べるために、4NQO処理を行う前の*Coll α 2;ZsG*マウスにTx投与し、NFをZsG標識し、その後4NQO処理を行い、dysplasiaが出現する時期、SCCが出現する時期の舌組織を採取し、組織学的解析を行ったところ、dysplasiaとSCCのいずれにおいてもZsG標識細胞が間質に認められた。DysplasiaおよびSCCにおけるS100A4陽性の線維芽細胞数中のZsG標識細胞数をカウントしたところ、それぞれ89%、80%であった。

②癌化の過程において、DAFからCAFへと変化するか否かについて調べるために、4NQO処理後、5週経過し、dysplasiaが生じた *Coll α 2;ZsG*マウスにTxを投与してDAFをZsG標識し、1週間後に舌を採取し、S100A4陽性の線維芽細胞数中のZsG標識DAF数をカウントしたところ、96%であった。その後、SCCの生じた舌を採取して解析したところ、腫瘍実質周囲のS100A4陽性の線維芽細胞数中のZsG標識CAF数の割合は84%であった。

③DAFの段階でZsG標識されたSCC組織に対して、血管平滑筋/血管周皮細胞マーカー（ α SMA）とS100A4に対する抗体により、 α SMA、S100A4と、ZsG標識細胞との共局在を検討したところ、 α SMA陽性で、かつS100A4陽性の血管平滑筋/血管周皮細胞にZsG標識細胞が認められたことから、DAFの一部が、血管平滑筋/血管周皮細胞に分化することが示された。

【結語】

本研究では、dysplasiaにおけるDAFの存在とDAFとNF、CAFとの関係を明らかにするために、4NQO化学発癌モデルマウスを用いて、正常の舌粘膜上皮から早期病変を経てSCCへと進展する各段階の病変における線維芽細胞の形態解析、遺伝子発現解析及び細胞系譜解析を行なった。その結果、DAFは、①NF、CAFとも形態が異なること、②独立した遺伝子発現パターンを有していること、が示された。さらに、細胞系譜解析より、③NFの大部分がDAF、CAFへと分化し、④DAFの一部は扁平上皮癌の血管平滑筋/血管周皮細胞にも分化することが明らかとなった。本研究での結果が、早期病変における病態解明ひいては診断の一助になることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (奥 村 将)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	豊澤 悟
	副 査	教授	田中 晋
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	山下 元三
論文審査の結果の要旨 口腔扁平上皮癌の発癌過程は、正常粘膜上皮から上皮異形成(dysplasia)を経て基底膜を破壊して間質に浸潤する扁平上皮癌（SCC）へと進展する。この過程には、腫瘍性上皮細胞とその周囲の腫瘍微小環境、特に線維芽細胞との相互作用が関与することが報告されている。本研究では、化学発癌モデルマウスを用いた舌粘膜下の線維芽細胞の細胞系譜解析により、正常粘膜下の線維芽細胞(NF)、dysplasia 粘膜下の線維芽細胞(DAF)、SCC 間質の線維芽細胞(CAF)について、各々の特徴を形態および発現遺伝子より検討すると共に、CAF の由来について検討した。 その結果、発癌過程において、DAF と CAF の核は NF の核より大きく、dysplasia の段階から、非腫瘍細胞の線維芽細胞に核腫大が出現すること、また、NF、DAF、CAF は各々が独立した異なる遺伝子発現パターンを示すことが分かった。また、CAF の由来については、その約 80%以上が NF や DAF に由来することが分かった。さらに、SCC 間質の血管構成細胞の一部は DAF 由来である可能性が示された。 以上の結果は、発癌過程では、腫瘍性上皮細胞に加えて、腫瘍微小環境の線維芽細胞にも前癌段階から異常が生じていることを示すもので、発癌に至るメカニズム解明や、前癌病変に対する新たな診断ツールの開発につながる重要な知見を与えるもので、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。			