



Title	口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた上皮間葉転換と腫瘍微小環境の検討
Author(s)	西元, 彩乃
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91843
rights	
Note	

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 （ 西 元 彩 乃 ）	
論文題名	口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた上皮間葉転換と腫瘍微小環境の検討
論文内容の要旨 【緒言】 口腔癌における頸部リンパ節転移の有無は生存率に大きく影響するが、頸部リンパ節転移のメカニズムは未だ不明な点が多い。近年、腫瘍微小環境（tumor microenvironment：TME）が癌の再発、転移、治療抵抗性に関与していることが報告され、注目されている。このTMEの重要な構成要素である腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophages：TAM）はM1-TAMとM2-TAMに分類され、特にM2-TAMが腫瘍形成・転移、血管新生、上皮間葉転換（epithelial to mesenchymal transition：EMT）を促進することが報告されている。 抗癌治療における免疫療法の、腫瘍の免疫逃避能力に対抗するために、TME内の免疫細胞を補助することで抗腫瘍免疫応答を強化するものであり、免疫療法の効果を評価するためには、ヒトの腫瘍と微小環境をモデル化したマウスモデルを確立することが望ましい。 当教室ではヒト口腔癌細胞と免疫不全マウスを用いた研究で、<i>in vivo</i> selectionにより樹立した、頸部リンパ節高転移細胞株を使用することにより、高転移細胞株では上皮間葉転換（epithelial to mesenchymal transition：EMT）が亢進していることを報告してきたが、免疫不全マウスを用いていたため、TMEを含めた解析には不適切だった。一方で、正常免疫マウスに移植可能な同系統マウス由来の癌細胞を利用した同種移植マウスモデルは、癌免疫学研究で再現性のある結果を得ることができる有効なモデルである。 そこで本研究では、口腔癌頸部リンパ節転移のメカニズムを解明するために、マウス由来口腔扁平上皮癌頸部リンパ節高転移細胞株を樹立し、TMEの観察が可能な同種同所移植マウスモデルを利用することにより、TMEと癌の進行について検討することを目的とした。 【方法】 細胞：マウス口腔扁平上皮癌細胞株Sq1979を用いた。 口腔癌頸部リンパ節転移マウスモデル：細胞懸濁液（$5 \times 10^5 \sim 6$ 個/$100 \mu\text{l}$）をC3Hf/Heの舌に接種し、舌腫瘍形成後に舌腫瘍および頸部リンパ節を摘出し、組織学的に解析した。 頸部リンパ節高転移細胞株の樹立：正常免疫マウスであるC3Hf/Heの舌にSq1979（Pa）の細胞懸濁液を接種した。舌腫瘍の増大後、頸部リンパ節を摘出し、バイオマッシャーで破碎後、ディッシュに播種した。転移細胞を継代培養した後、舌へ再接種した。 細胞増殖能評価：細胞を24時間、48時間、72時間、96時間培養後、細胞増殖試薬WST-8で発色させ、吸光度を測定した。 細胞遊走能評価：2層構造トランスウェルチャンバーの上層で細胞を24時間培養後、メンブレンを通過し底面に付着した細胞数を計測した。 細胞浸潤能評価：上層チャンバーの下底に人工基底膜マトリックスであるマトリゲルがコーティングされた、2層構造トランスウェルチャンバーの上層で細胞を60時間培養後、メンブレンを通過し底面に付着した細胞数を計測した。 遺伝子発現・タンパク発現の評価：培養細胞および舌腫瘍からRNAを抽出し、遺伝子発現変化はRT-qPCR法で評価しが。タンパク発現は、培養細胞から抽出したタンパクはWestern Blot法で評価し、その他、免疫細胞染色法、および免疫組織染色法で評価した。 インターロイキン（Interleukin：IL）-6およびSTAT3阻害剤添加実験：細胞にIL-6を添加し、24時間培養後、RNAおよびタンパクを抽出して解析した。また、STAT3阻害剤であるC188-9を、IL-6とともに添加し、24時間培養後、RNAおよびタンパクを抽出して解析した。 【結果】 リンパ節転細胞の舌への再接種を4回繰り返し、頸部リンパ節高転移細胞株であるSq1979-LM4（LM4）を樹立した。Pa	

細胞と比較し、LM4細胞は細胞形態がやや紡錘形に変化した。細胞増殖能に変化は認めなかったが、細胞遊走能および浸潤能はLM4細胞で有意に上昇していた。EMT関連マーカー（E-cadherin、Vimentin、Snail）の発現をRT-qPCR法で評価したところ、上皮系マーカーであるE-cadherinの変化は認めなかったが、間葉系マーカーであるVimentinおよびSnailの発現量がLM4細胞で有意に増加していた。また、免疫細胞染色でタンパクの発現を評価したところ、RNAと同様に、E-cadherinの変化は認めなかったが、VimentinおよびSnailの発現量がLM4細胞で増加していた。

次に、マウスモデルでPaとLM4の舌腫瘍組織を評価したところ、Pa腫瘍は胞巣状の腫瘍塊を複数認めるのに対し、LM4腫瘍は充実性に増殖しており、間質組織が癌細胞間に入り込むような組織像を呈していた。Pa、LM4腫瘍で共にリンパ球浸潤等の炎症所見を認めた。癌細胞を接種して2週間後の舌組織のH&E染色像で腫瘍長径を測定したところ、Pa腫瘍よりもLM4腫瘍の方が腫瘍長径は大きく、腫瘍増殖速度が上昇していた。それぞれのマウスの頸部リンパ節をH&E染色および、Pan-cytokeratinの蛍光免疫組織染色で評価したところ、Pa群では9匹中1匹、LM4群では10匹中9匹に転移を認めた。また、舌腫瘍のリンパ管新生をリンパ管特異的マーカーであるLyve-1の蛍光免疫染色で評価したところ、LM4腫瘍でリンパ管が有意に増加していた。さらに舌腫瘍の炎症をCox-2の免疫組織染色で評価したところ、LM4腫瘍で高発現していた。また、TAMおよびM2-TAMをF4/80およびCd163の免疫組織染色で評価したところ、LM4腫瘍でM2-TAMの増加を認め、 α SMA陽性CAFはLM4腫瘍で高発現していた。

TAMからも分泌され、EMT変化との関与が報告されている炎症性サイトカインであるIL-6を細胞培養液に添加し、24時間処理した後、EMT関連マーカーの発現変化を解析した。その結果、Snailの発現量はPa、LM4細胞で共に上昇し、特にLM4細胞では有意であった。また、Vimentinの発現はLM4細胞で有意に上昇した。また、STAT3阻害剤であるC188-9をLM4細胞に添加したところ、E-cadherinの発現上昇、VimentinおよびSnailの発現低下を認めた。以上より、IL-6刺激により、IL-6/JAK/STAT3伝達経路を介して、LM4細胞のEMTが顕著に促進されることが示された。

さらに、本モデルの有用性を検討するために、LM4腫瘍のTMEでM2-TAMが増加していたことに着目し、IL-6に加え、TAMの遊走や極性誘導との関連が報告されているCCL5について検討したところ、LM4腫瘍で有意に発現上昇していた。癌細胞のmRNAレベルでの発現変化とは一致しなかった。

【結論】

本研究では、正常免疫マウスC3Hf/Heを用いてマウス口腔扁平上皮癌頸部リンパ節高転移細胞株を樹立した。*in vitro*では細胞増殖能に変化は認めなかったが、*in vivo*で腫瘍増殖速度が増加しており、癌細胞とTMEとの相互関係の重要性が示唆された。また、炎症性サイトカインであるIL-6への反応や、腫瘍組織におけるM2-TAMとの関連を示唆するCCL5の発現など、これまでの炎症や腫瘍免疫に関する報告と概ね矛盾しない結果が得られたことから、本モデルはTMEを含んだ口腔癌研究の観察に適しており、腫瘍増殖や、頸部リンパ節転移機構の解明や、新たな治療薬の探索などに有用であると考えられる。

(3134字)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （ 西 元 彩 乃 ）			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	鷗澤 成一
	副 査	教授	豊澤 悟
	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 本研究では、癌細胞の上皮間葉転換（EMT）と腫瘍微小環境（TME）との関連を解明するために、TMEの観察が可能な口腔癌同種同所移植マウスモデルを作製した。同モデルを用いてリンパ節転移能やEMTの亢進したLM4細胞を、<i>in vivo</i> selectionにより樹立し、親株と比較した。その結果、LM4細胞のTMEでは炎症所見が亢進しており、M2型腫瘍関連マクロファージや腫瘍関連線維芽細胞が増加していることが明らかとなった。さらに、LM4細胞におけるEMT誘導はIL-6/STAT3経路が関与している可能性を示した。 以上の結果は、本モデルがTMEを含めた口腔癌研究に適しており、EMT誘導、さらには頸部リンパ節転移機構の解明に有用であることを示している。従って、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。			