

氏名 (本籍)	太和田 昌 宏 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 898 号
学位授与日付	平成 24 年 11 月 21 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Human gastric cancer organizes neighboring lymphatic vessels via recruitment of bone marrow-derived lymphatic endothelial progenitor cells
審 査 委 員	(主査) 教授 原 明 (副査) 教授 森 脇 久 隆 教授 大 沢 匡 毅

論 文 内 容 の 要 旨

胃癌では予後因子としてリンパ節転移の有無は非常に重要である。その転移巣形成には癌周囲のリンパ管構築機構が密接に関与しているものと考えられる。近年、リンパ内皮の特異的マーカーが同定されたことで、癌微小環境におけるリンパ管新生・増殖のメカニズムは徐々に解明されつつある。しかし、胃癌周囲のリンパ管新生メカニズムにはいまだ不明な点が多い。リンパ管組織の構築メカニズムが明らかになれば、それを標的とした新規の治療法開発の端緒となると期待できる。

そこで本研究では、胃癌増殖・転移に関連する新生リンパ内皮の起源が、周囲末梢リンパ管由来のみであるのか、さらに骨髄細胞由来、あるいは腫瘍組織そのものに由来するかについて解析を行った。骨髄細胞の関与を検討するためには、緑色蛍光タンパク質(GFP)陽性骨髄細胞を移植したキメラマウスを作成し、ヒト胃癌細胞(MKN45)を胃粘膜下または背側皮下に移植し、マウス担癌モデルを作製した。

【対象と方法】

1) GFP 陽性骨髄キメラマウスの作成

致死放射線量 (X線, 8.0 Gy) を照射したヌードマウス (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 4~5 週齢) に、GFP 陽性マウス (C57BL/6-Tg-CAG-EGFP, 6 週齢) の骨髄単核球細胞を尾静脈より移植した (6×10^6 個/匹)。対照群のヌードマウスには、野生型マウス (C57BL/6J, 6 週齢) の GFP 陰性骨髄単核球細胞を同数移植した。

2) キメラマウスへのヒト胃癌細胞株の移植

骨髄移植 4 週間後、キメラマウスの胃粘膜下または背側皮下に、ヒト低分化胃癌細胞株 (MKN45) を 2×10^6 個ずつ移植した。MKN45 移植 3 週間後に腫瘍組織を摘出し、凍結保存標本とした。また、GFP 陽性骨髄細胞の生着確認のため、キメラマウスから末梢血と骨髄を採取した。

3) 免疫組織化学的分析

摘出標本から厚さ 6 μ m の凍結切片を作成し、免疫組織染色 (蛍光抗体法) を行った。リンパ内皮細胞の染色には LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) 特異抗体を、細胞核染色には DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) をそれぞれ使用し、蛍光顕微鏡下で評価した。リンパ管密度、そして LYVE-1 陽性または GFP/LYVE-1 共陽性の面積割合の計測には、NIH (National Institutes of Health) Image J software を使用した。同時に、免疫染色部位近傍の切片には HE 染色を行い、組織学的構造を評価した。

【結果】

- 1) GFP 陽性骨髄移植 4 週間後, キメラマウスから採取した末梢血と骨髄は共に GFP 陽性を示し, 移植骨髄の生着を確認した。
- 2) GFP 陽性骨髄キメラマウスの胃壁へ MKN45 細胞を移植したモデルでは, 胃粘膜下に形成された腫瘤の周囲に, LYVE-1/GFP 共陽性の脈管が認められた。本結果より, MKN45 細胞の増殖に伴い誘導された新生リンパ管の形成に, 骨髄由来の細胞が寄与することが示された。
- 3) GFP 陽性骨髄キメラマウスの皮下へ MKN45 細胞を移植したモデルでは, 腫瘤の周囲に豊富な新生リンパ管組織を認めた。また, これらのリンパ内皮細胞の $55.6 \pm 6.7\%$ は LYVE-1/GFP 共陽性であった。本結果より, 皮下移植モデルでも, 腫瘤形成により誘導された新生リンパ管に骨髄由来細胞が存在することが確認された。
- 4) 上記担癌モデルマウスの癌周囲リンパ管組織はすべてヒト LYVE-1 抗体陰性であり, マウス由来であった。

【考察】

本研究では, MKN45 胃癌周囲新生リンパ管組織で骨髄由来細胞の存在を確認したことから, 腫瘍増殖に関連した新生リンパ内皮細胞の一部が, 末梢リンパ管由来のみではなく骨髄細胞に由来することが示唆された。さらに, 腫瘍周囲の血管新生にも骨髄由来前駆細胞の関与が報告されているが, 我々の実験系では MKN45 胃癌周囲新生血管への骨髄由来細胞の取り込みは確認できなかった。また, MKN45 胃癌周囲の新生リンパ管はいずれもマウス由来であったことから, 移植したヒト胃癌細胞が分化転換を行い, リンパ管形成に寄与する可能性は極めて低いと考えられた。

今回の MKN45 移植実験系では, 腫瘍周囲リンパ管新生に骨髄由来リンパ内皮前駆細胞の関与が明らかとなった。

【結論】

MKN45 は, 骨髄由来リンパ内皮前駆細胞を周囲の新生リンパ管に遊走させ, さらに取り込ませることで, 癌周囲の微小環境を構築することが明らかとなった。この知見は, 骨髄由来リンパ内皮前駆細胞の腫瘍周囲新生リンパ管への取り込み阻害を標的とする, 新しい抗腫瘍治療の可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

申請者 太和田 昌宏はマウス移植ヒト低分化胃癌 MKN45 が, 末梢リンパ管のみならず, 骨髄由来リンパ内皮前駆細胞によって癌周囲リンパ管増殖を引き起こすことを確認した。一方, 同じ移植モデルにおいて癌周囲新生血管への骨髄由来細胞の取り込みや, 癌細胞自体の新生リンパ管への分化については, 確認されなかった。以上の結果から, 本研究により胃癌におけるリンパ管新生メカニズムの一端が証明されたことで, 新たな抗腫瘍治療法の可能性を示唆し, 消化器外科学, 臨床腫瘍学の進歩に少なからず貢献するものと認める。

[主論文公表誌]

Masahiro Tawada, Shin-ichiro Hayashi, Shinji Osada, Shigeru Nakashima, Kazuhiro Yoshida:
Human gastric cancer organizes neighboring lymphatic vessels via recruitment of bone marrow-derived lymphatic endothelial progenitor cells.

Journal of Gastroenterology 47, 1057-1060 (2012).