

氏名（本籍）	松浦加奈	（岐阜県）
学位の種類	博士	（医学）
学位授与番号	甲第1198号	
学位授与日付	令和4年3月25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	Choline-deficient-diet Decreases Fibroblasts in the Circulating Tumor Cell (CTC) Microenvironment	
審査委員	（主査）教授	小川 武則
	（副査）教授	前川 洋一 教授 道上 知美

論文内容の要旨

【背景・目的】

腫瘍組織では、腫瘍細胞の増殖とともに線維芽細胞の増殖や免疫細胞の浸潤、さらには血管新生の誘導によって腫瘍微小環境（TME：Tumor microenvironment）が構築されている。また、腫瘍患者の末梢血液中には循環腫瘍細胞（CTC：Circulating tumor cell）が存在するが、CTCも血液中において線維芽細胞とクラスターを形成し、CTC微小環境（CTC microenvironment）を構築することが明らかになっている。腫瘍患者において、CTCは再発や予後不良の指標であり、CTCやCTC microenvironmentを標的にすることは、腫瘍治療成績の向上に繋がる可能性がある。

近年、生活環境の変化に伴い脂肪性肝炎が増加しているが、同病態における腫瘍の転移機序、特にCTCやCTC microenvironmentを構成する細胞が、腫瘍転移において果たす役割については十分に解明されていない。コリン欠乏食（CDD：Choline deficient diet）はメチオニン代謝を阻害し、マウスモデルにおいて脂肪性肝炎を誘発することが明らかとなっている。本研究では、CDD誘発マウス脂肪性肝炎モデルを用いた悪性リンパ腫の新規転移モデルを作成し、CTC microenvironmentが及ぼす影響について検討した。

【対象と方法】

緑色蛍光タンパク質（GFP：Green fluorescent protein）を導入したトランスジェニックマウス（C57BL/6-GFP：8～10週齢）に、4～12週間CDDまたは対照食（CD：Control diet）を投与した。CDD投与によって脂肪性肝炎を誘発した後、赤色蛍光タンパク質（RFP：Red fluorescent protein）を導入したマウス悪性リンパ腫細胞（EL4-RFP： 2×10^6 個）をCDDまたはCD投与マウスの脾臓に移植し、悪性リンパ腫転移マウスモデルを作成した。移植から2週間後にマウスを解剖し、蛍光実体顕微鏡（SZX7）を用いて原発腫瘍（脾臓）および転移性肝腫瘍を観察し、形態を比較した。また、門脈および心臓穿刺にて採取した血液（各々0.2 ml）を用いて塗抹標本作製し、同標本におけるCTCの数を測定し、共焦点顕微鏡（FV1000）で観察した。さらに、CDDおよびCD投与マウスの血中循環細胞を数日間培養し、共焦点顕微鏡にて細胞の形態を観察することで、2群間における血中線維芽細胞の相違を検討した。

【結果】

解剖時、CD および CDD マウスの 2 群間において、脾臓の原発腫瘍の大きさに有意差は認めなかった。肝転移性腫瘍の数は CD マウスより CDD マウスにて減少する傾向を示したが、有意差は認めなかった。また CD マウスと CDD マウスの門脈血および心臓血を比較検討したところ、CTC の数に有意差は認めなかった。採取した血液を培養し血液中の細胞を観察したところ、門脈血の培養における線維芽細胞数は、CD マウスより CDD マウスにて有意に減少していた ($p = 0.029$)。心臓血の培養では、CD マウス、CDD マウスともに線維芽細胞はほとんど観察されなかった。

【考察】

今回の研究では、RFP によって標識されたマウス悪性リンパ腫細胞を GFP トランスジェニックマウスに移植し、腫瘍転移モデルを作成した。本腫瘍転移モデルマウスは、原発腫瘍や転移性肝腫瘍の形態観察に加え、末梢血液中の CTC を評価することが可能であり、CTC および CTC microenvironment の転移における役割を解析するのに非常に有用である。今回の研究結果より、CDD マウスの門脈血中において、CTC とクラスターを形成する線維芽細胞が減少していることが明らかになった。本研究結果は、腫瘍微小環境において腫瘍の増殖、転移を促進する腫瘍関連線維芽細胞が、循環中においても CTC とクラスター形成をすることで、腫瘍の増殖に影響を与えている可能性を示唆するものである。コリンはメチオニンの前駆体であるが、CDD 投与マウスではメチオニンレベルが低下することで、腫瘍の増殖・転移に必要なメチオニン代謝が阻害され、線維芽細胞の移動が抑制された可能性が考えられた。本モデルでは脂肪性肝炎を発症するが、肝脂肪化が腫瘍転移の促進や抑制、さらには CTC/CTC microenvironment に及ぼす影響については、さらなる検討が必要である。

【結論】

CTC とクラスターを形成し腫瘍の増殖・転移に深く関与する線維芽細胞は、メチオニン代謝異常をきたすコリン欠乏食投与マウスの門脈血中において有意に減少していた。メチオニン代謝の異常やリプログラミング、さらには肝内コリンの欠乏は、CTC や CTC microenvironment を制御することで腫瘍の転移を抑制する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 松浦 加奈は、循環腫瘍細胞微小環境 (CTC microenvironment) に着目し、悪性リンパ腫転移マウスモデルを検討し、コリン欠乏食 (CDD: Choline deficient diet) によって循環線維芽細胞が低下することを示した。これらは、悪性リンパ腫における CTC microenvironment の理解と将来の新治療開発の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

KANA MATSUURA, ATSUSHI SUETSUGU, TOMOYUKI SATAKE, MIKI NAKAMURA, TAKAHIRO KUNISADA, MASAHITO SHIMIZU and ROBERT M. HOFFMAN: Choline-deficient-diet Decreases Fibroblasts in the Circulating Tumor Cell (CTC) Microenvironment.

ANTICANCER RESEARCH 39: 4061-4064 (2019) doi:10.21873/anticancerres.13562