

論文の要約

氏名：野 本 翔 太

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：子宮筋腫組織を用いた新たな癌の *in vitro* 浸潤モデルの確立

癌は、わが国の死亡原因の第 1 位を占める疾病であり、歯科においても腫瘍患者数は年々増加の一途をたどっている。腫瘍細胞が有する特徴には高い浸潤能および転移能があり、これらは予後を決定する重要な因子となっている。従って、腫瘍の転移機構を解明することは治療においても重要である。現在、腫瘍細胞の浸潤と転移については、培養細胞を用いた方法や病変部の免疫組織学的検索など数多くの方法で活発に研究が行われている。その結果、腫瘍細胞の周囲組織へ浸潤・転移する初期過程では、腫瘍細胞やその周囲の種々の細胞により、腫瘍細胞間に存在する *cadherin* などの細胞接着因子の発現が低下し、腫瘍細胞間の結合が消失する。その結果、腫瘍細胞は腫瘍胞巣から遊離することが可能となる。その後、腫瘍細胞の周囲に存在する *extracellular matrix (ECM)* を分解する *matrix metalloproteinase (MMP)* を腫瘍細胞や *myofibroblast* が産生し、腫瘍細胞は浸潤を始めると考えられている。腫瘍の浸潤・転移機構を検索する方法には、病変部の組織学的検索法の他、実験的検索方法として、コラーゲンゲル上に癌細胞を播種して浸潤・増殖を観察する 3 次元器官培養法が行われている。この方法は、動物の I 型コラーゲンと線維芽細胞を混入したコラーゲンゲルを基質として用いていること、また、腫瘍間質でみられる他の構成成分を欠落しているため腫瘍微小環境を十分に再現しているとはいえない。近年、腫瘍間質中の *myofibroblast* が、*cancer associated fibroblast (CAF)* と呼ばれ、*ECM* をはじめ *protease, growth factor, chemokine* などを産生し、腫瘍の浸潤・増殖に重要なファクターのひとつであることが示された。したがって、腫瘍の浸潤・転移機構を詳細に解明するためには、よりヒトの組織に近い器官培養法の開発が望まれる。

本研究では、CAF と同様に *myofibroblast* が存在するヒト子宮筋腫の組織片を用いて、よりヒトの生体内に近い微小環境を持った 3 次元器官培養モデルを作製して、口腔癌細胞の浸潤・増殖機構の検討を試みた。子宮筋腫切除組織から生検トレパンで *myoma disk* を作製し、3 次元器官培養に用いた。ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株 (HSC-3)、ヒト歯肉扁平上皮癌由来細胞株 (Ca9-22) および Ca9-22 細胞の *secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)* の発現を欠失させた NUSD-1 細胞をそれぞれ *myoma disk* に播種して、口腔癌の浸潤・増殖の過程を H-E 染色、免疫組織化学、RT-PCR および *gelatin zymography* を用いて検討した。口腔癌の 3 次元器官培養は培養細胞を *myoma disk* 上に播種して 3、7 および 14 日間行った後、各 *myoma disk* をホルマリン固定、パラフィン包埋後、薄切切片を作製して観察した。HSC-3 細胞、Ca9-22 細胞および NUSD-1 細胞は、*myoma disk* 培養 3 日目には *disk* 表層に連続する一層の細胞が生着していた。培養 7 日目では、HSC-3 細胞および Ca9-22 細胞は、*disk* 表層にほぼ連続して配列するようになり、一部で 2~6 層程度の細胞の重層化がみられた。しかし、上皮表層が口腔粘膜のような錯角化や正角化を示すような像は認めなかった。また、重層化部に顆粒細胞も出現していなかった。HSC-3 および Ca9-22 細胞は数十個の小集団を形成して、*myoma disk* 深部へ浸潤増殖する像を多数認めた。培養 14 日目では、Ca9-22 細胞の *disk* 深部への浸潤は、表層から連続性あるいは不連続性に増殖像が観察された。この浸潤細胞は *keratin* 染色で陽性であり、癌細胞が *myoma disk* 内に浸潤することが確認できた。一方、NUSD-1 細胞は *myoma disk* 培養 7 日目には、HSC-3 および Ca9-22 細胞とは異なった組織所見を示した。NUSD-1 細胞は *myoma disk* 表層で 3 層から 7 層の重層を示し、一部で上皮突起のように *myoma disk* 内へ突出する像を認めたが、浸潤増殖する所見は観察できなかった。NUSD-1 細胞は表層で粘膜上皮のように細胞が扁平化する像を示したが、錯角化や正角化は示さなかった。また、厚く重層化した部において基底層の形成や棘細胞への分化などはみられなかった。*Myoma disk* 培養 14 日目では、7 日目とほぼ同様な挙動を示した。癌細胞は時間の経過とともに重層化するが、剥離や壊死を起こすものがみられた。

近年、腫瘍細胞は浸潤するときに形態が紡錘形に変化するとともに、上皮細胞の産生が特徴の *keratin* タンパク発現の低下、一方、間葉系細胞が産生する *vimentin* 産生が増加して *epithelial mesenchymal transition*

(EMT) が起こると報告された。しかし、腫瘍の浸潤・転移機構の詳細は未だ不明な点が多い。本研究の免疫組織化学で、myoma disk 内の浸潤癌細胞が vimentin 陽性を示し、本モデルにおいて EMT による浸潤が起きていることが示唆された。また、Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞の一部は myoma 既存の脈管腔を介して浸潤する可能性もあった。そこで、連続切片を用いた keratin と vimentin の免疫組織化学で検討を行ったところ、keratin 陽性細胞の周囲に vimentin 陽性像を認めず、Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞は脈管腔を介さずに浸潤・増殖することを確認した。

腫瘍の浸潤増殖に際しては、MMP-2 の他、MMP-9 および MMP-13 が活性化され、I, II, III および IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの ECM などの構成成分を破壊することが示されている。また、臨床研究の結果からも MMP-2 の活性化と腫瘍の浸潤・転移とが、正の相関を示す報告がある。本研究において、浸潤能を示した Ca9-22 細胞と非浸潤の NUSD-1 細胞について、ECM を分解する MMP の発現を、現在まで詳細に検討されている MMP-2 と MMP-9 に絞り、PCR による遺伝子発現および gelatin zymography による酵素タンパク発現を検討した。Ca9-22 細胞では MMP-2 遺伝子発現が確認されたが、NUSD-1 細胞では発現を認めなかった。また、Ca9-22 および NUSD-1 細胞ともに MMP-9 遺伝子発現を認めた。Gelatin zymography では、RT-PCR による解析と同様に、Ca9-22 細胞に MMP-2 活性を認めたが、NUSD-1 細胞ではその発現を認めなかった。一方、MMP-9 は Ca9-22 細胞に活性型を、NUSD-1 細胞では非活性型の発現を認めた。

本研究の結果、myoma disk の 3 次元器官培養を用いて行った口腔癌細胞の浸潤過程検討で、浸潤には EMT が関与しており、MMP-2 産生と MMP-9 活性が重要な因子であることが示唆された。また、myoma disk を用いる培養法は、これまで行われてきた線維芽細胞とコラーゲンゲルを用いた母床による 3 次元器官培養法に比べ、よりヒトの腫瘍環境を反映しており、腫瘍の浸潤増殖メカニズムの解析に有用であると考えられた。