

学位論文題名

Bone Marrow-Derived Cells Are Not the Origin of the Cancer Stem Cells in Ultraviolet-Induced Skin Cancer.

(紫外線誘発皮膚癌の癌幹細胞は骨髄由来ではない)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

生体内の組織は組織幹細胞とそれらから生じた成熟組織細胞によって構成されると考えられており、癌においても癌幹細胞の存在が様々な癌組織で証明されている。通常、癌幹細胞は癌を生じた組織の組織幹細胞もしくは前駆細胞が形質転換して生じると考えられていた。しかし最近、ヘリコバクター感染による慢性炎症を基盤として発症する胃癌の癌細胞を調べたところ、骨髄由来であったという報告がなされた (Houghton J, 2004)。炎症により障害を受けた胃粘膜細胞を再生する際に骨髄細胞が動員され胃粘膜細胞の一部に分化するが、このような過程を繰り返した結果生じた胃癌組織を調べたところ、ほぼ全ての癌細胞が骨髄由来であったという報告である。これにより、癌組織の癌幹細胞が骨髄由来である可能性が示唆された。

以上のことから皮膚癌においても癌細胞が骨髄由来である可能性が考えられた。皮膚は外傷や紫外線暴露により障害を受けやすい臓器であり、皮膚癌は非常に頻度の高い癌である。特に紫外線暴露は皮膚癌を生じる上で、最も重要な外的因子であることが知られている。紫外線暴露によって傷害された皮膚組織を再構築するために骨髄細胞が動員される。表皮細胞に分化した骨髄細胞がやがては癌幹細胞となり、癌組織を形成する。この可能性について、骨髄細胞を標識したマウスに紫外線誘発皮膚癌を生じさせ、生じた皮膚癌における骨髄細胞の割合を調べることにより検討した。

【方法・結果】

GFP-Tg マウス、もしくは ROSA-Tg マウスを donor とした骨髄移植を施行し、骨髄細胞を標識したマウスを作成した。このマウスに紫外線 (UVB) を断続的に照射し皮膚癌を生じさせた。採取したマウス皮膚を組織学的構造および個々の細胞の正常をもとに「正常」、「過形成」、「上皮内癌」、「有棘細胞癌」に分類し、各々の組織内における骨髄マーカー陽性細胞の数を評価した。ROSA-Tg マウスを donor とし、骨髄細胞を β -galactosidase で標識したマウスにおいて、紫外線を 5 ヶ月照射した時点でのマウス皮膚には組織学的に「正常」、「過形成」、「上皮内癌」の部位がみられ、各々の組織内にみられた骨髄マーカー陽性細胞の割合は $0.15 \pm 0.21\%$ 、 $0.58\% \pm 0.25\%$ 、 $0.25 \pm 0.20\%$ であった。紫外線を 10 ヶ月照射した時点でのマウス皮膚には組織学的に「過形成」、「上皮内癌」、「有棘細胞癌」の部位がみられ、各々の組織内にみられた骨髄マーカー陽性細胞の割合は、 $0.59 \pm 0.57\%$ 、 $0.15 \pm 0.22\%$ 、 $0.03 \pm 0.06\%$ であった。いずれの組織においても、骨髄マーカー陽性細胞が集簇して存在し、clonal な増殖を示唆する所見は見られなかった。組織内の骨髄マーカー陽性細胞の割合は「過形成」の部分で最も多く、組織学的悪性度が進行するにつれて減少する傾向がみられたが、これは紫外線照射によって障害を受けた皮膚組織を再構築するために骨髄由来細胞が動員され、表皮細胞に分化するが、その後腫瘍性の増殖を示さないために、骨髄由来の表皮細胞の割合が相対的に減少したためと考えた。GFP-Tg マウスを donor とし、骨髄細胞を GFP で標識したマウス皮膚においてはいずれの組織においても組織内に GFP 陽性細胞は見られ

なかったが、これは長期間による紫外線照射によって GFP が退色してしまった可能性が考えられた。

組織内にみられる骨髄マーカー陽性細胞が、表皮細胞に分化した骨髄細胞ではなく浸潤血球細胞である可能性を考え免疫染色を行った。組織内における骨髄マーカー陽性細胞のうち、血球マーカー陽性である細胞の割合は「過形成」、「上皮内癌」、「有棘細胞癌」の組織内において各々 $10.1 \pm 15.3\%$ 、 $27.3 \pm 44.1\%$ 、 $78.7 \pm 27.4\%$ であった。すなわち「有棘細胞癌」の組織内に見られる骨髄マーカー陽性細胞のほとんどは浸潤血球細胞であり、紫外線誘発皮膚癌の組織内において骨髄マーカー陽性の癌細胞はほとんど存在しないことが分かった。

さらに、ごく少数みられる表皮細胞になったと考えられる骨髄由来細胞が、細胞融合により生じた可能性について検討した。オスマウスを donor、メスマウスを recipient として骨髄移植を施行し、骨髄細胞を Y 染色体で標識したマウスにおける紫外線誘発皮膚癌の組織を FISH をもちいて検討したが、組織内に Y 染色体陽性かつ二つ以上の X 染色体陽性の細胞（すなわち細胞融合によって生じたと考えられる表皮細胞）はみられず、骨髄由来細胞が既存の表皮細胞と細胞融合している可能性は低いと考えられた。また、骨髄マーカー陽性の細胞が癌幹細胞であり、成熟癌細胞に分化する過程で、あるいは紫外線の影響で骨髄マーカーを消失した可能性についても検討した。皮膚有棘細胞癌の癌幹細胞マーカーは発見されていないが、癌幹細胞は組織幹細胞マーカーが陽性となる報告が多いことより紫外線誘発皮膚癌組織内における組織幹細胞マーカー (label retaining cells および $\alpha 6$ integrin) と骨髄マーカーの多重染色を行ったが、組織幹細胞マーカー陽性かつ骨髄マーカー陽性細胞は見られなかった。よって、紫外線による皮膚障害を契機に皮膚組織に動員され、表皮細胞に分化した骨髄細胞が皮膚癌の癌幹細胞となっている可能性は極めて低いと考えられた。

【結論】

近年間葉系幹細胞から肉腫が生じたという報告もあり、再生医学の現場で多能性骨髄幹細胞を用いることに否定的な意見もあげられているが、本研究により少なくとも紫外線誘発皮膚癌において、骨髄由来細胞が癌幹細胞となっている可能性は低く、ひいては紫外線誘発皮膚癌の起源となっている可能性も低いと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Bone Marrow-Derived Cells Are Not the Origin of the Cancer Stem Cells in Ultraviolet-Induced Skin Cancer.

(紫外線誘発皮膚癌の癌幹細胞は骨髄由来ではない)

生体内の組織は組織幹細胞とそれらから生じた成熟組織細胞によって構成されると考えられており、癌においても癌幹細胞の存在が様々な癌で証明されている。通常、癌幹細胞は癌を生じた組織の組織幹細胞もしくは前駆細胞が形質転換して生じると考えられていた。しかし最近、ヘリコバクター感染による慢性炎症を基盤として発症する胃癌の癌細胞を調べたところ、骨髄由来であったという報告がなされた (Houghton J, 2004)。炎症により障害を受けた胃粘膜細胞を再生する際に骨髄細胞が動員され胃粘膜細胞の一部に分化するが、このような過程を繰り返した結果生じた胃癌組織を調べたところ、ほぼ全ての癌細胞が骨髄由来であったという報告である。これにより、癌組織の癌幹細胞が骨髄由来である可能性が示唆された。

以上のことから皮膚癌においても癌細胞が骨髄由来である可能性が考えられた。皮膚は外傷や紫外線暴露により障害を受けやすい臓器であり、特に紫外線暴露は皮膚癌を生じる上で、最も重要な外的因子である。紫外線暴露によって傷害された皮膚組織を再構築するために骨髄細胞が動員される。表皮細胞に分化した骨髄細胞がやがては癌幹細胞となり、癌組織を形成する。この可能性について、骨髄細胞を標識したマウスに紫外線誘発皮膚癌を生じさせ、生じた皮膚癌における骨髄細胞の割合を調べることにより検討した。

骨髄移植を施行し、骨髄細胞を蛋白や酵素で標識したマウスを作成した。このマウスに紫外線 (UVB) を断続的に照射し皮膚癌を生じさせた。採取したマウス皮膚を組織学的に「正常」「過形成」「上皮内癌」「有棘細胞癌」に分類し、各々の組織内における骨髄マーカー陽性細胞の数を評価した。組織内の骨髄マーカー陽性細胞の割合は「過形成」の部分で約 0.6% と最も多く、組織学的悪性度が進行するにつれて減少し「有棘細胞癌」の組織においては約 0.01%であった。いずれの組織においても、骨髄マーカー陽性細胞が集簇して存在し、clonal な増殖を示唆する所見は見られなかった。組織内にみられる骨髄マーカー陽性細胞が浸潤血球細胞である可能性を考え免疫染色を行った。組織内における骨髄マーカー陽性細胞のうち、血球マーカー陽性である細胞の割合は「過形成」の組織では約 10%であったが「有棘細胞癌」の組織では約 80%であった。これにより、紫外線誘発皮膚癌の組織内において骨髄マーカー陽性の癌細胞はほとんど存在しないことが分かった。また、骨髄マーカー陽性の癌細胞が癌幹細胞として存在する可能性について免疫染色をもちいて検討した。癌幹細胞は組織幹細胞マーカーが陽性となる報告が多いことより、紫外線誘発皮膚癌組織内における組織幹細胞マーカーと骨髄マーカーの多重染色を行ったが、組織幹細胞マーカー陽性かつ骨髄マーカー陽性細胞は見られなかった。

近年間葉系幹細胞から肉腫が生じたという報告もあり、再生医学の現場で多能性骨髄幹細胞を用いることに否定的な意見もあげられているが、本研究により紫外線誘発皮膚癌において、骨髄由来細胞が癌幹細胞となっている可能性は低く、ひいては紫外線誘発皮膚癌の起源となっている可能性も低いと考えられた。

藤堂教授から 1. 骨髄由来血管について、腫瘍血管は骨髄由来との報告があるが紫外線誘発皮膚癌の血管が骨髄由来であったかどうか、2. 骨髄由来の癌が生じる過程で固形癌と皮膚癌の違いが骨髄由来の癌細胞の割合と関連する可能性はどうか、についての質問があった。次いで野々村教授から 1. 膀胱上皮では 'dysplasia' と 'SCC *in situ*' を同一の状態として扱うが、本研究では組織学的に異なるものとして扱っていた。皮膚科学的な観点からの 'dysplasia' と 'SCC *in situ*' の違いについて、2. 一律に紫外線を照射したにもかかわらず、'SCC' と 'SCC' ではない部位が生じる理由についての質問があった。次いで清水教授から実験の結果が出るまでに長期間かかったこと、その結果がいわゆる negative data であったこと、それを論文としてまとめあげたことに対する質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験を開始する契機となった胃癌の報告やその後報告された癌組織内に含まれる骨髄細胞の割合に関する文献を引用し、また皮膚科領域における前がん病変における病理学的診断および実際の実験手技の方法の説明などを行い、おおむね適切に回答した。

この論文は、紫外線発癌という自然界で生じる発癌過程のマウスモデルを用いて骨髄由来発癌を否定した点で高く評価され、今後、再生医療の場で骨髄細胞が幅広く用いられることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。