

氏名	吉田 沙織
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6148号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Tumor Angiogenic Inhibition Triggered Necrosis (TAITN) in Oral Cancer (口腔癌における腫瘍血管の抑制が誘発する腫瘍壊死について)
論文審査委員	佐々木 朗 教授 松村 達志 准教授 河津 俊幸 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

CXCモチーフケモカイン受容体であるCXCR4はリンパ球や単球、形質細胞などの造血細胞に発現し、増殖や浸潤、接着に関与するケモカイン受容体である。CXCモチーフケモカインリガンド12 (CXCL12) としても知られる間質細胞由来因子のSDF-1と結合し、造血幹細胞を骨髄内に留める役割を果たす。造血細胞の他に血管内皮細胞や腸上皮、肺胞上皮などの非血液系細胞にもCXCR4が発現しており、胎児期には消化器の栄養血管の形成に関わる。また脳腫瘍、肝臓癌、乳癌、食道癌の一部はCXCR4陽性であり、口腔扁平上皮癌 (OSCC) も約60%の症例がCXCR4陽性を示す。CXCR4陽性の症例はリンパ節転移や遠隔転移が生じやすく予後不良であると報告されている。過去の報告では、ヒト扁平上皮癌細胞株を移植したマウスにおいてCXCR4阻害剤を投与すると癌の体積が減少するが、ヒト扁平上皮癌細胞株をCXCR4抑制下で培養しても癌細胞の増殖や生存には影響がないとされている。そこでCXCR4抑制剤がOSCCの治療に有効であるかを明らかにするために、①OSCCにおけるCXCR4の分布 ②OSCC細胞を移植したマウスに対するCXCR4阻害剤の影響について検討した。

### 【材料と方法】

#### ①OSCC手術検体におけるCXCR4の分布の検討

岡山大学病院の舌扁平上皮癌手術検体10症例をランダムに抽出した。CXCR4の免疫組織化学染色を行い、腫瘍部と非腫瘍部でCXCR4の発現を比較した。

#### ②OSCC細胞を移植したマウスに対するCXCR4阻害剤の影響

ヒト扁平上皮癌細胞株HSC2をヌードマウス (n=5)の背部皮下に移植し、1週間の腫瘍生着期間を設けた後、CXCR4阻害剤であるAMD3100を50  $\mu$ g/day腹腔内に連日投与した (以下CXCR4阻害群とする)。対照群には生理食塩水を投与した。薬剤投与を開始して22日目に腫瘍組織を摘出して組織標本を作製し、組織学および免疫組織化学的 (CXCR4、CD34、HIF-1 $\alpha$ ) 検討を行った。必要に応じて画像解析ソフトのImageJを用いて両群の所見を比較した。

### 【結果】

①腫瘍細胞と非腫瘍部の口腔粘膜上皮細胞では、CXCR4の発現に差を認めなかった。腫瘍間質

の血管は一部 CXCR4 陽性であったが、非腫瘍部の血管は CXCR4 陰性であった。血管内皮細胞マーカーとして CD34 を使用し、CXCR4 と CD34 の蛍光免疫二重染色を行ったところ、腫瘍間質の血管内皮細胞の一部が CXCR4 陽性であり、非腫瘍部の血管は CXCR4 陰性であった。

②腫瘍の大きさは CXCR4 阻害群と対照群とで肉眼的に差を認めなかった。組織学的に CXCR4 阻害群と対照群のいずれでも腫瘍細胞の一部は CXCR4 弱陽性、腫瘍間質の血管の一部は CXCR4 陽性を示した。CXCR4 阻害群では腫瘍内に壊死領域が増加しており、特に CXCR4 阻害群ではやや大きな血管とわずかな腫瘍細胞の残存を伴う壊死像を認めた。CXCR4 阻害群は対照群よりも HIF-1 $\alpha$  陽性細胞が増加していた。ImageJ を用いて両群の血管の長さを計測したところ、CXCR4 阻害群における腫瘍間質の血管は対照群よりも細く短かった。

### 【考察】

手術検体において、OSCC の間質に CXCR4 陽性の血管が存在することが明らかとなった。また動物実験では CXCR4 の阻害が OSCC の腫瘍壊死を促進することが示された。以上のことから、CXCR4 陽性血管が腫瘍の生存に関与していると考えられた。CXCR4 と SDF-1 の結合は細胞の遊走や浸潤の促進など、腫瘍の進行に重要な役割を果たすだけでなく、胎児期には消化器の栄養血管の形成にも関わるということが報告されている。これらの報告から、CXCR4 を阻害すると腫瘍間質において血管形成が阻害され、腫瘍壊死が誘発される可能性が考えられた。

本研究では CXCR4 の阻害剤としてアンタゴニストである AMD3100 を用いた。AMD3100 は白血球の増加を目的として HIV の治療用に設計され、現在では主に造血幹細胞移植に使用されている。さらに近年では腫瘍の抗転移療法に AMD3100 が利用可能であるか、各臓器で研究が進められている。

本研究では AMD3100 の投与による血管の抑制が腫瘍壊死を引き起こすことが明らかとなった。本研究によって、CXCR4 の阻害は OSCC 治療における有効な抗腫瘍血管形成戦略となり得ると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

CXC モチーフケモカイン受容体 (CXCR4)は造血細胞に発現し、細胞の移動に関与するほか、血管内皮細胞にも発現し、胎児期には消化器等の血管形成に関わる。また口腔扁平上皮癌 (OSCC)の一部症例は CXCR4 陽性であり、リンパ節転移や遠隔転移が生じやすい。過去の報告では、ヒト OSCC 細胞株移植マウスに CXCR4 阻害剤を投与すると腫瘍の進行や転移が抑制されるものの、培養下では腫瘍細胞自体の増殖や生存に影響はなかった。In vitro と in vivo の差異から腫瘍間質に注目し、CXCR4 阻害剤が間質の血管を抑制して腫瘍に影響を与えると仮説を立てた。OSCC 治療における CXCR4 阻害剤の有効性を明らかにすべく、以下の検討が行われた。

### ①OSCC における CXCR4 の分布

舌扁平上皮癌手術検体における CXCR4 の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、腫瘍間質の血管は一部 CXCR4 陽性であるのに対し、非腫瘍部の血管は CXCR4 陰性であった。

### ②OSCC 細胞を移植したマウスに対する CXCR4 阻害剤の影響

ヒト OSCC 細胞株 HSC2 をヌードマウス (n=5)の背部皮下に移植し、1週間の腫瘍生着期間を設けた後、CXCR4 阻害剤である AMD3100 を  $50 \mu\text{g/day}$  腹腔内に 22 日間投与した (以下 CXCR4 阻害群とする)。対照群には生理食塩水を投与した。腫瘍組織を摘出して組織標本作製し、組織学および免疫組織化学的 (CXCR4、CD34、HIF-1 $\alpha$ ) 検討を行った。その結果、CXCR4 阻害群では腫瘍内に壊死が拡がり、特に血管と周囲のわずかな腫瘍細胞の残存を伴う特徴的な壊死像を認めた。CXCR4 阻害群は対照群よりも HIF-1 $\alpha$  陽性細胞が増加していた。また CXCR4 阻害群における腫瘍間質の血管は対照群よりも細く短かった。

①②の結果から、CXCR4 を阻害すると腫瘍間質において血管形成が阻害され、腫瘍が低酸素状態となり、壊死が誘発される可能性が考えられた。OSCC 治療における CXCR4 の阻害が抗腫瘍血管形成戦略として有効であることが示された。

CXCR4 の発現を検討する際に、腫瘍細胞だけではなく間質の血管にも着目した点に本研究の新規性がみられる。なお、本論文はすでに Cells に受理 (掲載) されており、国際的にも評価されている。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。