

称号及び氏名	博士（獣医学）	小寺 喬
学位授与の日付	平成28年2月29日	
論文名	Pathological Studies on Histogenesis of Stem Cell-Derived Rat Tumors, with Particular References to Cellular Properties of Malignant Fibrous Histiocytoma and Malignant Teratoma (ラットの幹細胞由来腫瘍の組織発生に関する病理学的研究：特に、悪性線維性組織球腫と悪性奇形腫の細胞生物学的特性について)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	久保 喜平
	副査	嶋田 照雅

論文要旨

緒論

幹細胞は、高い自己複製能と多様な細胞に分化する能力を持つ特殊な細胞とされる。幹細胞は、その由来や分化能から、胚性幹細胞（ES細胞）、生殖幹細胞と体性幹細胞に大別され、そのうち体性幹細胞は造血幹細胞や間葉系幹細胞などに細分類される。このような臓器特異的な体性幹細胞は、臓器構成細胞への分化能が高く、ある程度分化の方向性がコミットされた細胞と考えられる。腫瘍は種々の分化段階の細胞からなり、最も増殖能の高い未分化な細胞が腫瘍幹細胞と称され、その幹細胞から多様な分化段階の腫瘍細胞が生じ、腫瘍が形成するとされる（腫瘍幹細胞理論）。腫瘍幹細胞は、ES細胞や体性幹細胞に類似した性状を有する。

腫瘍の組織発生を解明すること、そしてそれに基づいた治療法の探索は腫瘍の基礎研究において最も重要である。本研究では、幹細胞に由来する2種の腫瘍（悪性線維性組織球腫（MFH）と悪性奇形腫）の細胞生物学的特性について、形態学的な解析を行うとともに、腫瘍幹細胞理論の観点から、これらの腫瘍の性状を比較した。

第1章 ラットのMFH由来腫瘍細胞株の多分化能

MFHは、成人で一般的な軟部組織由来の腫瘍であり、線維肉腫、平滑筋肉腫、骨肉腫など多彩な組織像が混在することから、微小環境因子により様々な方向に分化する潜在能を有する細胞が含まれると考えられている。しかし、この腫瘍の組織発生は十分に解明されていない。老齢F344ラットの皮下組織に自然発生したMFHから確立した培養細胞株を用いて、この腫瘍の細胞特性を解析した。

第1節：MFH由来の異なるクローン細胞株（MT-8、MT-9）の特性解析

原発MFHは、組織球様細胞と線維芽細胞様細胞が花筵状に増殖し、MFHに典型的な組織像を呈した。この腫瘍から培養細胞株MT-Pを確立し、さらにクローン細胞株（MT-8、MT-9）を誘導した。これらのクローン細胞株の細胞特性と、特異的に発現する細胞分化に関連する遺伝子について解析した。

MT-8は細胞内小器官に乏しく、MT-9はよく発達した粗面小胞体やリソソームを有した。同系ラットへ皮下接種することにより誘発させた腫瘍では、MT-8は未分化肉腫の組織像を呈したが、MT-9はMFHに特徴的な花筵状の増殖を示した。免疫染色では、MT-9は、MT-8よりは、間葉系の幹細胞や分化マーカーに対してより強く陽性を示し、かつ網羅的遺伝子解析により、培養細胞および誘発腫瘍いずれにおいても、MT-9ではMT-8より細胞分化に関わる遺伝子の発現が多かった。

以上、MT-8はかなり未熟な間葉系の細胞で、MT-9は、MT-8に比してより分化した分化能の高い細胞であることが分かった。

第2節：シスプラチン（CDDP）耐性ラットMFH由来培養細胞株の特性解析

ヒトのMFHでは、抗腫瘍剤の処置により、腫瘍の組織形態が変化することが知られている。そこで、MFH由来クローン細胞株MT-10から抗腫瘍剤であるCDDP耐性株MT-10Rを、また、MT-Pから同様にMT-PRを誘導した。

MT-10の同系ラットにおける誘発腫瘍はMFHの典型的な組織像を示したが、一方、MT-10RとMT-PRの誘発腫瘍は類円形から多角形細胞の密な増殖を示し、MT-PRでは類骨形成がみられた。また、免疫染色とmRNA発現解析で、MT-10RとMT-PRの培養細胞および誘発腫瘍では、MT-10と比較して、骨形成因子の発現が増加していた。MT-10に骨形成因子（BMP-2）を添加すると、カルシウム沈着と骨形成に係る因子のmRNA発現が増加した。

以上、MT-10RとMT-PRは、CDDPの処置により骨形成能を示し、骨肉腫の特性が現れた。また、MT-10の誘発腫瘍は、組織学的にはMT-9に類似し、骨形成因子処置により骨芽細胞に分化し得ることが示された。

第2章：ラットの悪性奇形腫の組織学的特性と分化能の解析

奇形腫は幼若動物の卵巣や精巣に生じる腫瘍で、外胚葉、中胚葉および内胚葉の異なる胚葉組織を有する特徴がある。2カ月齢のSDラットの精巣に自然発生した悪性奇形腫の起源腫瘍とこの腫瘍から確立したクローン細胞株（TSD-B4S）の特性を解析した。

第1節：悪性奇形腫の原発腫瘍の組織学的特性

原発腫瘍には、間葉系組織として骨、軟骨および脂肪組織などが、上皮系組織として皮膚、膵外分泌腺および気管上皮などが、神経系組織として脳実質様組織、末梢神経および神経節などが含まれていた。すなわち、この腫瘍は外胚葉、中胚葉および内胚葉組織から構成され、悪性奇形腫の典型的な組織像を示すことが分かった。

第2節：悪性奇形腫由来細胞株 TSD-B4S の間葉系分化能の解析

TSD-B4S は紡錘形から多角形の形態を示し、電顕的に突起状の細胞質と不規則な核、そして、細胞質には少数のリソソームを有した。免疫染色により、多くの細胞がビメンチン陽性で、間葉系の特性を示した。ヌードマウスの腹腔内に TSD-B4S を接種することにより得た腫瘍は、未分化肉腫の像を呈した。

TSD-B4S に、脂肪細胞分化因子を添加すると脂肪滴が増数し、骨形成因子を添加すると骨芽細胞マーカーの発現やカルシウム沈着が増加した。さらに TGF- β 1 添加で筋線維芽細胞への分化が認められた。

以上、悪性奇形腫から確立した TSD-B4S は、未分化な間葉系細胞の特性を有し、分化因子の処置により間葉系の多分化能を現すことが分かった。

第3章：MFH と悪性奇形腫の細胞特性の比較

腫瘍幹細胞理論では、腫瘍の根源となる細胞が腫瘍幹細胞で、やや分化し分化能が高い細胞を腫瘍前駆細胞としている。

MFH は、間葉系腫瘍の特徴があり、皮下組織に発生していることから、体性幹細胞由来と考えられた。MT-8 は、MT-9 に比して、より未熟な細胞であり、MT-9 は、間葉系への分化能があることから、MT-8 に比して、より高い分化能を有する細胞と考えられた。MT-10 は、MT-9 と組織学的に類似し、環境因子により多様な間葉系細胞に分化することが示された。MFH には分化能の異なる間葉系の未分化な細胞が混在し、MT-9/MT-10 と MT-8 は、それぞれ、MFH の腫瘍前駆細胞と腫瘍幹細胞に相当すると考えられた。

一方、悪性奇形腫は精巣原発であることから、生殖幹細胞が腫瘍幹細胞であると考えられる。また、TSD-B4S は、間葉系への分化能がみられ、その誘発腫瘍は未分化肉腫の像を呈したことから、MT-8 と MT-9 の中間的な性質を有する

腫瘍前駆細胞とみなされた。

まとめ

幹細胞に由来するラットの悪性線維性組織球腫（MFH）と悪性奇形腫の細胞生物学的特性を解析し、以下の成績を得た。

1. MFH 由来のクローン細胞株（MT-8、MT-9）を解析し、MT-8 は未分化肉腫の像を、MT-9 は MFH の典型的な組織像を示すことが分かった。
2. 免疫染色と遺伝子解析により、MT-9 は、MT-8 よりは、間葉系への分化能が高いことが示された。
3. MFH 由来細胞から誘導した抗腫瘍剤（シスプラチン）耐性細胞株（MT-10R、MT-PR）は、骨への分化能が示され、骨肉腫の像を呈した。
4. 悪性奇形腫は、外胚葉、中胚葉および内胚葉からなる悪性奇形腫の典型的な組織像を示した。
5. 悪性奇形腫から確立したクローン細胞株 TSD-B4S は、間葉系の細胞特性と間葉系への多分化能を示した。細胞特性から、MFH の MT-8 と MT-9 の中間的な性格を有する間葉系の幹細胞と考えられた。
6. MFH は体性幹細胞に、悪性奇形腫は ES 細胞類似の生殖幹細胞に由来する腫瘍で、この一連の研究で得られた成果は、腫瘍幹細胞理論に関する基礎研究において有用な情報を提供する。

審査結果の要旨

幹細胞は、高い自己複製能と多様な細胞に分化する能力を持つ特殊な細胞であり、その由来や分化能から、胚性幹細胞（ES 細胞）、生殖幹細胞、体性幹細胞に大別され、さらに体性幹細胞は造血幹細胞や間葉系幹細胞などに細分類される。体性幹細胞は、臓器構成細胞への分化能が高く、ある程度分化の方向性がコミットされた細胞と考えられる。一方、腫瘍にもこれら幹細胞に類似した性状を有する腫瘍幹細胞が存在し、その細胞から多様な分化段階の腫瘍細胞が生じ、腫瘍が形成するとされる（腫瘍幹細胞理論）。腫瘍の細胞特性に基づいた組織発生の解明は、その治療法の基礎研究において最も重要である。本研究では、間葉系幹細胞に由来する悪性線維性組織球腫（MFH）と、生殖幹細胞に由来する悪性奇形腫から確立したクローン細胞株の細胞生物学的特性を解析するとともに、これら細胞株の位置づけをより明確にすることを目的として「腫瘍幹細胞理論」の観点から両者の性状を比較している。

第1章では、ラットのMFH由来腫瘍細胞株の多分化能を詳細に解析している。ラット皮下組織に自然発生したMFHから確立したクローン細胞株MT-8は、細胞内小器官に乏しく、同系ラットにおける誘発腫瘍は未分化肉腫の組織像を呈した。一方、同じMFHから確立したクローン細胞株MT-9は、よく発達した粗面小胞体やリソソームを有し、その誘発腫瘍は組織球様細胞と線維芽細胞様細胞が花筵状に増殖し、MFHの典型像を示した。MT-9の誘発腫瘍は、免疫染色の結果、MT-8より間葉系の幹細胞や分化マーカーに対してより強く陽性反応を示し、網羅的遺伝子解析の結果、MT-8より細胞分化に関わる遺伝子の発現がより高かった。以上より、MT-8はかなり未熟な間葉系の細胞で、MT-9はより分化した多分化能のある間葉系細胞であることを明らかにした。

続いて、MFHは抗腫瘍剤の処置によりその組織像が変化することが知られていることから、MFH由来クローン細胞株MT-10およびクローン細胞株の親株MT-Pを用いてシスプラチンに対する耐性株MT-10RおよびMT-PRをそれぞれ誘導した。MT-10の誘発腫瘍はMFHの典型的な組織像を示したが、シスプラチン耐性株の誘発腫瘍は類円形から多角形細胞の密な増殖を示し、MT-PRの誘発腫瘍では類骨形成がみられた。免疫染色とmRNA発現解析で、MT-10RとMT-PRの培養細胞および誘発腫瘍では、MT-10と比較して、骨形成因子の発現が増加していた。MT-10に骨形成因子(BMP-2)を添加すると、カルシウム沈着と骨形成関連因子のmRNA発現が増加した。以上より、シスプラチン耐性のMT-10RとMT-PRは骨肉腫の特性が現れ、MT-10は骨形成因子の影響により骨芽細胞に分化し得ることを示した。

第2章では、ラットの精巣原発の悪性奇形腫の組織学的特性と、その腫瘍から確立したクローン細胞株TSD-B4Sの分化能について検討している。この原発悪性奇形腫には、外胚葉、中胚葉および内胚葉組織に由来する種々の間葉系、上皮系および神経系組織が含まれており、悪性奇形腫の典型的な組織像を示した。TSD-B4Sは、免疫染色により、間葉系マーカーであるビメンチンに強陽性を示したが、上皮系マーカーには陰性であった。ヌードマウスにおける誘発腫瘍は未分化肉腫の組織像を呈し、ビメンチンに陽性であった。TSD-B4Sにそれぞれの間葉系分化誘導因子を添加すると、脂肪芽細胞、骨芽細胞、筋線維芽細胞への分化能が認められた。以上より、悪性奇形腫の典型的な組織像を示す腫瘍から確立したTSD-B4Sは、未分化な間葉系細胞の特性を有し、分化誘導因子の処置により多様な間葉系細胞への分化能を現すことを示した。

第3章では、「腫瘍幹細胞理論」の観点からMFHと悪性奇形腫の細胞特性を比較解析している。MFH由来クローン細胞株のうち、MT-8はかなり未熟な間葉系幹細胞であり、MT-9およびMT-10は、ある程度分化をコミットされたより高い分化能を有する間葉系幹細胞の性質を有する細胞と考えられた。一方、悪性奇形腫由来クローン細胞株TSD-B4Sは間葉系への分化能がみられ、その誘発腫瘍は未分化肉腫の像を呈したことから、MT-8とMT-9/MT-10の中間的な性

質を有する間葉系幹細胞の性質を有する細胞と考えられた。以上より、**MT-8** および **MT-9/MT-10** はそれぞれ **MFH** の腫瘍幹細胞および腫瘍前駆細胞であり、**TSD-B4S** は悪性奇形腫の腫瘍前駆細胞とみなされることを示した。

本研究は、ラットの幹細胞由来の悪性腫瘍（**MHF** と悪性奇形腫）の細胞特性を「腫瘍幹細胞理論」の観点から明らかにしたもので、得られた知見は腫瘍の組織発生や、それに基づいた治療法の探索に有用な情報を提示していると考えられる。よって、この成果は、獣医学・医学における腫瘍病理学の基礎研究の新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。