

氏 名	木下 一太
(ふりがな)	(きのした いちた)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第40号
学位審査年月日	令和5年1月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Increase in Chymase-Positive Mast Cells in Recurrent Pleomorphic Adenoma and Carcinoma Ex Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland (耳下腺多形腺腫再発と多形腺腫由来癌における キマーゼ陽性肥満細胞の増加について)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 萩森 伸一 教授 矢野 貴人

## 学位論文内容の要旨

### 《目的》

多形腺腫 (pleomorphic adenoma : PA) は良性腫瘍であるが、ときに再発することがある (多形腺腫再発 ; recurrent pleomorphic adenoma : RPA)。再発原因としては手術手技要因や腫瘍側要因が指摘されている。また PA は長期間の経過で悪性化 (多形腺腫由来癌 ; carcinoma ex pleomorphic adenoma : CXPA) する可能性がある。しかし条件に当てはまる症例全例が再発・悪性化するわけではなく、RPA・CXPA 症例には強い腫瘍活性があると考えられる。

肥満細胞に含まれるキマーゼは腫瘍活性、浸潤・転移、血管新生を促す各種メディエーターを活性化する。これまで他癌腫とキマーゼの関連について報告はあるが、耳下腺腫瘍

とキマーゼの関係についての報告はない。

今回 PA と RPA および CXPA におけるキマーゼとその関連物質の発現や分布特徴を比較検討し、腫瘍活性の生物学的なメカニズムに対する解明を試みた。

#### 《対 象》

1999 年から 2020 年の間に当院にて手術加療を行った PA26 例、RPA17 例、CXPA17 例を対象とした。

#### 《方 法》

手術標本から染色標本を作製した。一般組織染色はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マロリー・アザン染色、トルイジンブルー (TB) 染色とした。免疫組織染色はキマーゼ、トリプターゼ、幹細胞因子 (SCF) 、transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$ 1、von Willebrand factor (vWF)、ビメンチン、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を対象として行った。200 倍視野にて 1 切片につき 5 か所で細胞数計測を行った。また、同手術標本を用いて real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。トリプターゼ、キマーゼ、vascular endothelial growth factor (VEGF) を対象として mRNA レベルを測定した。

#### 《結 果》

##### ① 一般組織染色による観察

HE 染色で PA 組織を観察すると腺組織と線維性組織で構成されていた。RPA は多結節性であり、組織構成は PA と類似していた。CXPA は PA 成分と癌成分から構成されていた。マロリー・アザン染色にて中程度の青色染色が腫瘍実質組織に確認でき、癌組織の壊死後瘢痕組織や PA 由来の遺残線維性組織と考えられた。

##### ② 線維芽細胞と癌関連線維芽細胞 (CAFs) の同定

PA 組織のビメンチン陽性細胞のほとんどは $\alpha$ -SMA 陽性細胞と重複しており、間質細胞

の多くが筋線維芽細胞であることが示された。一方 RPA 組織ではビメンチン陽性細胞のほとんどは $\alpha$ -SMA を発現しておらず、間質細胞のほとんどが線維芽細胞と考えられた。CXPA 組織中のビメンチン陽性細胞は癌化組織中やその周囲の線維性組織領域内に散在していたが、そのほとんどが $\alpha$ -SMA も発現しており、CXPA における CAFs の出現を示唆するものであった。

### ③ 血管新生と細胞増殖の検討

PA と比較して、RPA と CXPA における VEGF 発現は上昇傾向を認めた。vWF の免疫染色でも、新生血管密度は RPA と CXPA で高い傾向であった。

PCNA 陽性細胞数は PA、RPA、CXPA の間で有意差を認めなかった。しかし、PA や RPA では主に腺組織の上皮細胞および線維芽細胞様紡錘形細胞に PCNA の発現を認めたのに対し、CXPA では癌細胞や CAFs 様細胞に発現を認めた。

### ④ 肥満細胞の表現型の同定

TB 染色で測定した肥満細胞数は PA と比べて RPA で有意に多く、CXPA でも上昇傾向を示した。トリプターゼ陽性細胞数およびその mRNA 発現レベルは RPA と CXPA とも PA に比べて有意な上昇を認めた。キマーゼ陽性細胞数およびその mRNA 発現レベルも RPA と CXPA で上昇傾向もしくは有意な上昇を示した。肥満細胞には、トリプターゼとキマーゼの両方を顆粒中に貯蔵している MC<sub>Tc</sub>型とトリプターゼしか含まない MC<sub>T</sub>型が存在する。TB 染色により同定された肥満細胞の多くはキマーゼ陽性細胞とトリプターゼ陽性細胞の局在と重なっており、キマーゼとトリプターゼが同一の肥満細胞内に発現していることが分かった。また、肥満細胞、キマーゼ陽性細胞、トリプターゼ陽性細胞の発現数に有意差はなかった。これらから各腫瘍組織中に発現している肥満細胞のほとんどが MC<sub>Tc</sub>型であることが示唆された。

### ⑤ SCF と TGF- $\beta$ 1 の発現

SCF は PA と RPA においては主に腺上皮細胞、CXPA においては主に癌細胞で陽性染色像を示していた。一方、TGF- $\beta$ 1 は PA、RPA、CXPA のいずれの群においても、主に線維芽細胞様の紡錘形細胞で陽性染色像を認めていた。

## 《考 察》

本研究ではMC<sub>TC</sub>型肥満細胞がRPAやCXPAの組織中に集積していることが分かった。MC<sub>TC</sub>型肥満細胞からキマーゼが脱顆粒されるとアンジオテンシン (Ang) I から Ang II を生成する。Ang II は VEGF の発現を増加し、血管新生とリンパ管新生に寄与する。更に血流増加による栄養素の供給増加が腫瘍の増大にもつながる。今回 VEGF 発現は PA と比較して RPA と CXPA で増加を認めており、それに伴う微小毛細血管密度の増加も認めた。

また、キマーゼは細胞間質で TGF- $\beta$  1 を活性化する機能を有する。TGF- $\beta$ 1 は臓器の線維化だけでなく、癌の環境調節や細胞形質転換においても重要である。TGF- $\beta$ 1 の上昇は T 細胞の抗癌作用の抑制、増殖阻害、免疫監視機能の低下を引き起こす。また CAFs の収縮作用を促し、癌細胞の浸潤や転移を容易にさせる。本研究では腫瘍組織に発現している TGF- $\beta$ 1 や CXPA における CAFs を同定した。キマーゼは TGF- $\beta$ 1 を介して CXPA の癌環境の形成や、RPA の微小環境形成に積極的に関与する可能性がある。

今回は各腫瘍組織に SCF の発現を確認できた。SCF は肥満細胞の遊走因子として作用するだけでなく、肥満細胞同士の接着、増殖促進、恒常性維持、分化、成熟などに寄与する。更にキマーゼ自体が SCF を活性させる性質を有しており、RPA や CXPA における MC<sub>TC</sub>型肥満細胞増加は、SCF を介して更に肥満細胞を増加させていることが示唆された。

上述のように、キマーゼは腫瘍の進展・増殖に深く関与する。RPA や CXPA で MC<sub>TC</sub>型肥満細胞の発現が上昇傾向であることから、キマーゼは耳下腺腫瘍においても強い腫瘍活性を与えている可能性が高い。本研究は今後、耳下腺腫瘍の腫瘍活性の解明に礎となると考えられる。

## 《結論》

PA と比較して RPA や CXPA でキマーゼ陽性肥満細胞数とキマーゼ遺伝子発現が増加する傾向にあった。Ang II、TGF- $\beta$ 1、SCF 等に対するキマーゼの作用を鑑みると、キマーゼが直接的もしくは間接的に RPA や CXPA の病態生理に関与している可能性が示唆された。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

耳下腺腫瘍の中で多形腺腫 (pleomorphic adenoma : PA) は最も多い組織型であり良性腫瘍ではあるものの、手術加療を行っても再発 (recurrent pleomorphic adenoma : RPA) を生じたり、長期間の経過で悪性転化 (carcinoma ex pleomorphic adenoma : CXPA) することがある。しかし、条件に当てはまる症例の全例が再発、悪性化するわけではなく、RPA や CXPA の症例は強い腫瘍活性を有していると考えられる。キマーゼと腫瘍に関する研究は近年注目を浴びているが、症例数が少ない RPA や CXPA とキマーゼの関係についての報告はない。

そこで申請者は、PA、RPA、CXPA におけるキマーゼに着目して研究を行った。具体的には、PA 26 例、RPA 17 例、CXPA 17 例を対象として、一般組織染色・免疫組織染色および Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) を行い、キマーゼとその関連因子の測定を行った。RPA や CXPA は、PA に比し、キマーゼ陽性肥満細胞やキマーゼ遺伝子の発現が増加傾向にあった。また、RPA や CXPA では、幹細胞因子や腫瘍活性に関わる Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、vascular endothelial growth factor (VEGF) といったキマーゼ関連因子の発現も亢進していた。

本研究は、肥満細胞由来のキマーゼが直接的もしくは他のメディエーターと共に RPA や CXPA の病態生理に積極的に関与している可能性を示唆するものである。これは RPA や CXPA の病態解明へ貢献しうる新たな知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International journal of molecular science

22(23): 12613, 2021 Nov. 23

doi: 10.3390/ijms222312613