



# Transcutaneous carbon dioxide application suppresses the expression of cancer-associated fibroblasts markers in oral squamous cell carcinoma xenograft mouse model

田所, 慶誠

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8889号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490114>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Transcutaneous carbon dioxide application suppresses  
the expression of cancer-associated fibroblasts markers in  
oral squamous cell carcinoma xenograft mouse model

口腔扁平上皮癌マウスモデルにおけるがん関連線維芽細胞マーカーの発現  
に着目した経皮的炭酸ガス投与による抗腫瘍効果の検討

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻明石昌也教授)

田所 慶誠

## 【緒言】

口腔癌は、全悪性腫瘍の 2%程度ながら頸部リンパ節転移症例では 5 年生存率が 50%程度であり、患者の審美性の低下や顎口腔機能障害を惹起する特異な疾患である。がん関連線維芽細胞(CAFs)とは腫瘍微小環境を構築する主要な線維芽細胞であり、CAFs マーカーの高発現が様々ながん患者の生命予後不良と有意に関連していることが報告されている。CAFs は腫瘍微小環境を低酸素状態へ誘導し、がんの浸潤や転移の促進、抗がん剤への抵抗性の獲得に寄与するだけでなく、低酸素状態もまた CAFs を増殖および活性化させる。

腫瘍組織内の低酸素環境を改善する方法として、われわれは以前よりヒト口腔癌移植マウスモデルを用いて、経皮的炭酸ガス投与の有用性について報告してきた。炭酸ガスは、血流増加および人工的に Bohr 効果を誘起しヘモグロビンからの酸素解離を促進させることで、組織内の低酸素環境を改善できる。

CAFs に対する治療法は近年注目されており、さまざまな研究が報告されている。本研究では、腫瘍組織内での CAFs マーカーの発現に着目し、経皮的炭酸ガス投与の抗腫瘍効果について検討した。

## 【材料と方法】

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞(HSC-3)  $1 \times 10^6$  個および正常ヒト皮膚線維芽細胞(Normal Human Dermal Fibroblasts)  $0.5 \times 10^6$  個を 7 週齢雄性ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) の背部皮下に同時に注入し、口腔癌背部皮下移植マウスモデルを作成した後、対照群と経皮的に炭酸ガスを投与された CO<sub>2</sub> 群とに無作為に振り分けた。CO<sub>2</sub> 群では、背部の移植した腫瘍周囲皮膚に炭酸ガス吸収促進ゲルを塗布し、同部を含む範囲をポリエチレンバッグで被覆したのち、100%CO<sub>2</sub> を 20 分間投与された。移植 7 日目から 25 日目までの間、1 週あたり 2 回ずつを 3 週間、計 6 回炭酸ガスが投与された。炭酸ガス投与の際、両群におけるマウスの体重および腫瘍径を測定した。腫瘍体積 V は、 $V = \pi/6 \times a^2 \times b$  (a: 腫瘍短径、b: 腫瘍長径) に従って計算して求めた。治療終了 24 時間後に、腫瘍を摘出した。

CAFs マーカーは、alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、fibroblast activation protein (FAP)、podoplanin (PDPN)、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を用いた。CAFs マーカーの発現は、Real-time PCR 法および免疫組織化学染色を用いて評価した。免疫組織化学的評価について、以下のように分類した。(1) 線維芽細胞における免疫組織化学染色の強度 (スコア 0=なし、スコア 1=弱陽性、スコア 2=中等度陽性、スコア 3=強陽性) および (2) 全線維芽細胞に対する各抗体陽性線維芽細胞の割合 (スコア 1<20%、スコア 2<21-39%、スコア 3<40-59%、スコア 4<60-79%、スコア 5>80%)。 (1) と (2) をかけ合わせたものを Immunoreactive Score (IRS) とした。なお、染色部位は Hybrid cell count BZ-H3C ソフトウェア (Keyence)を用いて半定量化を行った。

結果は、Mann-Whitney U 検定および Steel-Dwass 検定を用いて統計分析を行った。有意水準は 5%に設定した。

## 【結果】

はじめに、腫瘍組織内における CAFs マーカーの発現を評価するために、対照群において移植後 7 日目、14 日目、21 日目、25 日目における CAFs マーカーの発現を、Real-time PCR 法および免疫組織化学染色法を用いて評価した。その結果、 $\alpha$ SMA、FAP、PDPN、TGF- $\beta$  それぞれの経時的な発現上昇が認められた。なお、免疫組織化学染色の結果、染色強度および CAFs マーカー陽性線維芽細胞割合の両方において経時的に上昇する傾向が確認された。

経皮的炭酸ガス投与開始後、CO<sub>2</sub> 群では腫瘍体積の増大が有意に抑制され、移植後 25 日目における CO<sub>2</sub> 群の腫瘍の成長抑制は明らかであった。また、マウスの体重については対照群と CO<sub>2</sub> 群との間で有意差はみられなかった。また、各 CAFs マーカーの発現は CO<sub>2</sub> 群で有意に抑制された。免疫組織化学染色分析では、染色強度および CAFs マーカー陽性線維芽細胞割合の両方が CO<sub>2</sub> 群において減少する傾向が確認された。

## 【考察】

本研究により、がん細胞と正常線維芽細胞が同時に注入されたヒト口腔癌移植マウスモデルにおいて正常線維芽細胞が CAFs へ形質転換すること、経皮的炭酸ガス投与によって CAFs マーカーの発現を抑制できることが示唆された。

低酸素環境では、がん細胞が TGF- $\beta$  を分泌し低酸素誘導経路を活性化することで、正常線維芽細胞が CAFs へ転換する。また、CAFs は TGF- $\beta$  を分泌し PDPN 陽性がん細胞の TGF- $\beta$  の分泌を亢進させることで、同転換を促進する。経皮的炭酸ガス投与により、腫瘍組織内の低酸素環境を改善することで、正常線維芽細胞の CAFs への転換が抑制できることが推察された。CAFs マーカーはがん浸潤部で強発現していることから、経皮的炭酸ガス投与により同マーカーの発現を抑制することで、腫瘍の増大や進展の抑制、化学療法への抵抗性の改善、手術における切除範囲の縮小化など多くの効果が期待できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3384 号	氏 名	田所 慶誠
論文題目 Title of Dissertation	<p>Transcutaneous carbon dioxide application suppresses the expression of cancer-associated fibroblasts markers in oral squamous cell carcinoma xenograft mouse model</p> <p>口腔扁平上皮癌マウスモデルにおけるがん関連線維芽細胞マーカーの発現に着目した経皮的炭酸ガス投与による抗腫瘍効果の検討</p>		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	丹生 健一	
	副 査 Vice-examiner	寺師 浩人	
	副 査 Vice-examiner	榎 地 吾 弘	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 【緒言】

口腔癌は、全悪性腫瘍の2%程度ながら頸部リンパ節転移症例では5年生存率が50%程度であり、審美性の低下や顎口腔機能障害を来す。がん関連線維芽細胞(CAFs)は腫瘍微小環境を構築する主要な線維芽細胞であり、CAFs マーカーの高発現が様々ながん患者の生命予後不良と有意に関連していることが報告されている。CAFs は腫瘍微小環境を低酸素状態へ誘導し、がんの浸潤や転移の促進、抗がん剤への抵抗性の獲得に寄与し、低酸素状態もまた CAFs を増殖および活性化させる。

我々は以前より、腫瘍組織内の低酸素環境を改善する方法として、ヒト口腔癌移植マウスモデルを用いて、経皮的炭酸ガス投与の有用性について報告してきた。炭酸ガスは、血流増加および人工的に Bohr 効果を誘起し、ヘモグロビンからの酸素解離を促進させることで、組織内の低酸素環境を改善できる。本研究では、腫瘍組織内での CAFs マーカーの発現に着目し、経皮的炭酸ガス投与の抗腫瘍効果について検討した。

## 【材料と方法】

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞(HSC-3)  $1 \times 10^6$  個および正常ヒト皮膚線維芽細胞(Normal Human Dermal Fibroblasts)  $0.5 \times 10^6$  個を7週齢雄性ヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu)の背部皮下に同時に注入し、口腔癌背部皮下移植マウスモデルを作成し、対照群と経皮的に炭酸ガスを投与されたCO<sub>2</sub>群とに無作為に振り分けた。CO<sub>2</sub>群では、背部の移植した腫瘍周囲皮膚に炭酸ガス吸収促進ゲルを塗布し、同部を含む範囲をポリエチレンバッグで被覆したのち、100%CO<sub>2</sub>を20分間投与した。移植7日目から25日目までの間、1週あたり2回ずつ3週間、計6回炭酸ガスを投与した。炭酸ガス投与の際、両群におけるマウスの体重および腫瘍径を測定した。腫瘍体積Vは、 $V = \pi/6 \times a^2 \times b$  (a: 腫瘍短径、b: 腫瘍長径) に従って計算して求めた。治療終了24時間後に、腫瘍を摘出した。

CAFs マーカーは、alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、fibroblast activation protein (FAP)、podoplanin (PDPN)、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を用いた。CAFs マーカーの発現は、Real-time PCR 法および免疫組織化学染色を用いて評価した。免疫組織化学的評価について、以下のように分類した。(1) 線維芽細胞における免疫組織化学染色の強度 (スコア0=なし、スコア1=弱陽性、スコア2=中等度陽性、スコア3=強陽性) および (2) 全線維芽細胞に対する各抗体陽性線維芽細胞の割合 (スコア1<20%、スコア2<21—39%、スコア3<40—59%、スコア4<60—79%、スコア5>80%)。 (1) と (2) をかけ合わせたものを Immunoreactive Score (IRS) とした。なお、染色部位は Hybrid cell count BZ-H3C ソフトウェア (Keyence) を用いて半定量化を行った。結果は、Mann-Whitney U 検定および Steel-Dwass 検定を用いて統計分析を行った。有意水準は5%に設定した。

## 【結果】

まず、腫瘍組織内における CAFs マーカーの発現を評価するために、対照群において移植後7日目、14日目、21日目、25日目における CAFs マーカーの発現を、Real-time PCR 法および免疫組織

化学染色法を用いて評価したところ、 $\alpha$ SMA、FAP、PDPN、TGF- $\beta$ それぞれの経時的な発現上昇が認められた。一方、経皮的炭酸ガス投与開始後、CO<sub>2</sub>群では腫瘍体積の増大が有意に抑制され、移植後25日目におけるCO<sub>2</sub>群の腫瘍の成長抑制は明らかであった。マウスの体重は対照群とCO<sub>2</sub>群との間で有意差はみられず、各CAF<sub>s</sub>マーカーの発現はCO<sub>2</sub>群で有意に抑制された。免疫組織化学染色分析では、染色強度およびCAF<sub>s</sub>マーカー陽性線維芽細胞割合の両方がCO<sub>2</sub>群において減少する傾向が確認された。

### 【考 察】

本研究により、がん細胞と正常線維芽細胞が同時に注入されたヒト口腔癌移植マウスモデルにおいて正常線維芽細胞がCAF<sub>s</sub>へ形質転換すること、経皮的炭酸ガス投与によってCAF<sub>s</sub>マーカーの発現を抑制できることが示唆された。

低酸素環境では、がん細胞がTGF- $\beta$ を分泌し低酸素誘導経路を活性化することで、正常線維芽細胞がCAF<sub>s</sub>へ転換する。また、CAF<sub>s</sub>はTGF- $\beta$ を分泌しPDPN陽性がん細胞のTGF- $\beta$ の分泌を亢進させることで、同転換を促進する。経皮的炭酸ガス投与により、腫瘍組織内の低酸素環境を改善することで、正常線維芽細胞のCAF<sub>s</sub>への転換が抑制できることが推察された。CAF<sub>s</sub>マーカーはがん浸潤部で強発現していることから、経皮的炭酸ガス投与により同マーカーの発現を抑制することで、腫瘍の増大や進展の抑制、化学療法への抵抗性の改善、手術における切除範囲の縮小化など多くの効果が期待できる可能性が示唆された。

### 【結 論】

本論文は口腔扁平上皮癌マウスモデルにおける経皮的炭酸ガス投与による抗腫瘍効果を検討したものであるが、がん関連線維芽細胞マーカーの発現を抑制することで抗腫瘍効果が期待できる可能性を見出した価値ある業績の集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。