Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Biological and clinical significance of the YKL-40/osteopontin-integrin β4-p70S6K axis induced by macrophages in early oesophageal squamous cell carcinoma

浦上，聡

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2023-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第8728号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485912

※ 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

Biological and clinical significance of the YKL-40/osteopontin-integrin β4-p70S6K axis induced by macrophages in early oesophageal squamous cell carcinoma

マクロファージとの相互作用により誘導されるYKL-40/osteopontin-integrin β4-p70S6K経路の早期食道扁平上皮癌における生物学的・臨床的な意義

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

（指導教員：横崎　宏　教授，児玉　裕三　教授）

浦上　聡

【背景・目的】

癌微小環境は、食道扁平上皮癌(ESCC)を含む多くの癌の進展に深く寄与し、その主な構成細胞であるマクロファージは腫瘍進展を抑制する M1 マクロファージと促進する M2 マクロファージ(M2)に大別される。申請者の研究室では、M2 が ESCC の進展に寄与することを報告してきたが、発癌初期段階における M2 の役割に関しては未解明である。内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)による ESCC 切除検体にて、M2 マーカーである CD163 と CD204 陽性炎症細胞の浸潤数が、非腫瘍領域と比べ腫瘍領域で、上皮・間質において有意に増加している事がわかり、M2 が発癌初期段階でも腫瘍進展に寄与する可能性が示唆された。そこで、上皮内腫瘍モデルであるヒト食道扁平上皮細胞株(Het-1A)と、末梢血由来マクロファージとの間接共培養系を確立し、共培養後の Het-1A の悪性形質、シグナル伝達、遺伝子発現の変化を解析した。

【材料と方法】

ヒト末梢血から CD14 陽性単球を自動磁気細胞分離装置により選択的に回収した。さらにサイトカインを用いて種々のマクロファージへ分化誘導させ、Het-1A と間接共培養を行い、シグナル伝達、増殖能・運動能を解析した。細胞内のシグナル伝達はウエスタンブロット、増殖能は MTS 試薬を用いた 492nm の吸光度の測定、運動能は transwell migration assay で評価した。共培養後のリン酸化シグナル変化はホスホキナーゼアレイ、サイトカイン分泌の変化は培養上清を用いたサイトカインアレイと ELISA で測定した。さらに、Het-1A に p70S6K 阻害剤、recombinant human YKL-40 (rhYKL-40)、recombinant human osteopontin (rhOPN)を作用させ、シグナル伝達、増殖能・運動能の変化を検討した。Binding assay に関しては、Het-1A から抽出した蛋白質に抗 integrin β4(β4)抗体を混合して免疫沈降させ、その沈殿物に rhYKL-40 と rhOPN を添加してβ4 と結合しているかをウエスタンブロットで確かめた。β4 のノックダウンは、siRNA(siITGB4)と Lipofectamine RNAiMAX を用いて行った。ESCC に対する ESD 切除標本 83 例での CD68、CD163、CD204、β4 の免疫組織化学は Leica Bond-Max automation と Leica Refine detection kit を用いた。Carcinoma *in situ* (CIS)領域の上皮・間質の炎症細胞浸潤数、及び腫瘍細胞の発現強度をそれぞれ low 群と high 群に分けて臨床病理学因子との関連を検討した。また Kaplan-Meier 法を用いて、累積の ESD 後再発率との関連を検討した。

【結果】

サイトカインで誘導した種々のマクロファージと Het-1A を共培養すると、M2 と共培養した

Het-1A で運動能・増殖能が最も亢進していた。ホスホキナーゼアレイを用いてリン酸化シグナルの変化を網羅的に検索すると、M2 と共培養した Het-1A においてリン酸化 p70S6K の亢進がみられ、ウエスタンブロットでも mTOR-p70S6K 経路の活性化を確認した。また、M2 と Het-1A との相互作用を介在する液性因子を検索するため、培養液の上清を用いたサイトカインアレイ及び ELISA を行い、Het-1A と M2 の単独培養と比較して Het-1A/M2 の共培養の培養液において YKL-40 と OPN の分泌が有意に上昇していた。さらに rhYKL-40 と rhOPN を Het-1A に作用させると、mTOR-p70S6K 経路を介して運動能・増殖能が亢進した。続いて Het-1A における YKL-40 と OPN の受容体の検索を行った。両者に共通する有名な受容体はインテグリン・ファミリーであり、integrin sampler kit を用いた網羅的な発現解析をウエスタンブロットで行ったところ、種々のマクロファージと共培養した Het-1A における活性化 p70S6K シグナル伝達分子と同様の発現パターンを示した β4 に注目した。免疫沈降を用いた binding assay にて、YKL-40 と OPN が β4 に結合する事が示された。また、2 重蛍光免疫染色では、Het-1A において YKL-40 又は OPN が β4 と共局在することがわかった。これらから、YKL-40 と OPN は β4 と複合体を形成して p70S6K 経路を活性化する可能性が示唆された。この仮説の検証のため、siITGB4 を用いたノックダウン実験を行なった。β4 をノックダウンした Het-1A に rhYKL-40 と rhOPN を作用させると、いずれのリコンビナント蛋白による p70S6K 経路の活性化も β4 のノックダウンによりキャンセルされた。以上より食道扁平上皮発癌初期段階において YKL-40 と OPN が β4 を介して p70S6K 経路を活性化させると考えた。

ESCC の ESD 切除標本の免疫組織化学において、YKL-40 及び OPN 陽性炎症細胞の浸潤数は、非腫瘍領域と比較して CIS 領域で有意に増加した。そこで、浸潤数を中央値により low 群と high 群に分けて解析すると、ESD 後再発の有無と有意な相関を示した。また、腫瘍細胞における β4 の発現強度を low 群と high 群に分けて解析すると、ESCC 発生のリスク因子として知られている多発ヨード不染域(まだら食道)や ESD 後再発の有無と有意な相関を示した。さらに、Kaplan−Meier 法の解析では、YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の高い浸潤数、及び β4 の高発現とまだら食道を組み合わせると、より明瞭に ESD 後再発の有無を見出せた。

【考察】

本研究では、サイトカインで誘導した M2 と上皮内腫瘍モデルとしての Het-1A を間接共培養することで、マクロファージとの相互作用により誘導される YKL-40/OPN-β4-p70S6K 経路が食道扁平上皮の発癌初期段階で重要な役割を果たしている可能性を見出した。また、早期

ESCC 切除検体の免疫組織化学により、実際の癌組織においても、その経路の活性化を確認できた。

YKL-40、OPN ともにマクロファージから分泌され、様々な癌種の進展に寄与する事が知られている。また、β4 は生理学的には基底細胞と基底膜に存在し、腫瘍の進展に伴い発現が亢進するとされる。申請者らは、YKL-40 と OPN が β4 に結合することを binding assay と蛍光 2 重免染で確かめた。食道上皮内腫瘍～早期食道癌において、YKL-40 と OPN が β4 に結合して癌進展に寄与する報告はなく、本研究が初の報告になる。

ESD 後のサーベイランスにおいて、厳重なモニタリングが必要な患者を抽出するためのバイオマーカーは、まだら食道以外にほとんど報告はない。本研究において、YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の浸潤数と腫瘍細胞における β4 の発現強度が、ESD 後の再発率と有意な相関が示された。これらが、ESD 後のサーベイランスを決定する上で、有用な指標となり得る可能性が示唆された。

本研究の limitation は、不死化したヒト食道扁平上皮細胞株である Het-1A を上皮内腫瘍モデルとして扱ったこと、YKL-40/OPN-β4-p70S6K 経路に対する阻害剤や遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 実験を行なっていないことが挙げられる。

【結論】

ヒト食道扁平上皮細胞株 Het-1A とサイトカインで誘導したマクロファージとの間接共培養により、YKL-40/OPN-β4-p70S6K 経路が食道扁平上皮の発癌初期段階で重要な役割を果たす可能性を見出した。また、YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の浸潤数と腫瘍細胞における β4 の発現強度は、ESD 後再発を予測する新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲　第3317号	氏　　名	浦上 聡
論文題目 Title of Dissertation	マクロファージとの相互作用により誘導されるYKL-40/osteopontin- integrin β4-p70S6K 経路の早期食道扁平上皮癌における生物学的・臨床的な意義 Biological and clinical significance of the YKL-40/osteopontin-integrin β4-p70S6K axis induced by macrophages in early oesophageal squamous cell carcinoma		
審査委員 Examiner	主　　査 Chief Examiner 掛地吾弘 副　　査 Vice-examiner 丹生健一 副　　査 Vice-examiner 伊藤 裕雄		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景・目的】申請者の研究室では、M2 マクロファージ(M2) が ESCC の進展に寄与することを報告してきたが、発癌初期段階における M2 の役割に関しては未解明である。上皮内腫瘍モデルであるヒト食道扁平上皮細胞株(Het-1A)と、末梢血由来マクロファージとの間接共培養系を確立し、共培養後の Het-1A の悪性形質、シグナル伝達、遺伝子発現の変化を解析した。

【材料と方法】ヒト末梢血から CD14 陽性単球を自動磁気細胞分離装置により選択的に回収した。さらにサイトカインを用いて種々のマクロファージへ分化誘導させ、Het-1A と間接共培養を行い、シグナル伝達、増殖能・運動能を解析した。さらに、Het-1A に p70S6K 阻害剤、 recombinant human YKL-40 (rhYKL-40)、recombinant human osteopontin (rhOPN)を作用させ、シグナル伝達、増殖能・運動能の変化を検討した。β4 のノックダウンは、siRNA(siITGB4)と Lipofectamine RNAiMAX を用いて行った。ESCC に対する ESD 切除標本 83 例での CD68、CD163、CD204、β4 の免疫組織化学は Leica Bond-Max automation と Leica Refine detection kit を用いた。Carcinoma in situ (CIS)領域の上皮・間質の炎症細胞浸潤数、及び腫瘍細胞の発現強度をそれぞれ low 群と high 群に分けて臨床病理学因子との関連を検討した。また Kaplan-Meier 法を用いて、累積の ESD 後再発率との関連を検討した。

【結果】サイトカインで誘導した種々のマクロファージと Het-1A を共培養すると、M2 と共培養した Het-1A で運動能・増殖能が最も亢進していた。ホスホキナーゼアレイを用いてリン酸化シグナルの変化を網羅的に検索すると、M2 と共培養した Het-1A においてリン酸化 p70S6K の亢進がみられ、ウエスタンブロットでも mTOR-p70S6K 経路の活性化を確認した。また、M2 と Het-1A との相互作用を介在する液性因子を検索するため、培養液の上清を用いたサイトカインアレイ及び ELISA を行い、Het-1A と M2 の単独培養と比較して Het-1A/M2 の共培養の培養液において YKL-40 と OPN の分泌が有意に上昇していた。さらに rhYKL-40 と rhOPN を Het-1A に作用させると、mTOR-p70S6K 経路を介して運動能・増殖能が亢進した。続いて Het-1A における YKL-40 と OPN の受容体の検索を行った。両者に共通する有名な受容体はインテグリン・ファミリーであり、integrin sampler kit を用いた網羅的な発現解析をウエスタンブロットで行ったところ、種々のマクロファージと共培養した Het-1A における活性化 p70S6K シグナル伝達分子と同様の発現パターンを示した β4 に注目した。免疫沈降を用いた binding assay にて、YKL-40 と OPN が β4 に結合する事が示された。また、2 重蛍光免疫染色では、Het-1A において YKL-40 又は OPN が β4 と共局在することがわかった。これらから、YKL-40 と OPN は β4 と複合体を形成して p70S6K 経路を活性化する可能性が示唆された。この仮説の検証のため、siITGB4 を用いたノックダウン実験を行なった。β4 をノックダウンした Het-1A に rhYKL-40 と rhOPN を作用させると、いずれのリコンビナント蛋白による p70S6K 経路の活性化も β4 のノックダウンによりキャンセルされた。

以上より食道扁平上皮発癌初期段階においてYKL-40 と OPN がβ4 を介して p70S6K 経路を活性化させると考えた。

ESCC の ESD 切除標本の免疫組織化学において、YKL-40 及び OPN 陽性炎症細胞の浸潤数は、非腫瘍領域と比較して CIS 領域で有意に増加した。そこで、浸潤数を中央値により low 群と high 群に分けて解析すると、ESD 後再発の有無と有意な相関を示した。また、腫瘍細胞における β4 の発現強度を low 群と high 群に分けて解析すると、ESCC 発生のリスク因子として知られている多発ヨード不染域(まだら食道)やESD後再発の有無と有意な相関を示した。さらに、Kaplan–Meier 法の解析では、YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の高い浸潤数、及び β4 の高発現とまだら食道を組み合わせると、より明瞭に ESD 後再発の有無を見出せた。

【考察】本研究では、サイトカインで誘導した M2 と上皮内腫瘍モデルとしての Het-1A を間接共培養することで、マクロファージとの相互作用により誘導される YKL-40/OPN-β4-p70S6K 経路が食道扁平上皮の発癌初期段階で重要な役割を果たしている可能性を見出した。また、早期 ESCC 切除検体の免疫組織化学により、実際の癌組織においても、その経路の活性化を確認できた。YKL-40、OPN ともにマクロファージから分泌され、様々な癌種の進展に寄与する事が知られている。また、β4 は生理学的には基底細胞と基底膜に存在し、腫瘍の進展に伴い発現が亢進するとされる。申請者らは、YKL-40 と OPN が β4 に結合することを binding assay と蛍光 2 重免染で確かめた。食道上皮内腫瘍～早期食道癌において、YKL-40 と OPN が β4 に結合して癌進展に寄与する報告はなく、本研究が初の報告になる。ESD 後のサーベイランスにおいて、厳重なモニタリングが必要な患者を抽出するためのバイオマーカーは、まだら食道以外にほとんど報告はない。本研究において、YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の浸潤数と腫瘍細胞における β4 の発現強度が、ESD 後の再発率と有意な相関が示された。これらが、ESD 後のサーベイランスを決定する上で、有用な指標となり得る可能性が示唆された。

【結論】ヒト食道扁平上皮細胞株 Het-1A とサイトカインで誘導したマクロファージとの間接共培養により、YKL-40/OPN-β4-p70S6K 経路が食道扁平上皮の発癌初期段階で重要な役割を果たす可能性を見出した。また、YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の浸潤数と腫瘍細胞における β4 の発現強度は、ESD 後再発を予測する新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

以上、本研究は、ヒト食道扁平上皮細胞とマクロファージとの相互作用により誘導される YKL-40/OPN-β4-p70S6K 経路が食道扁平上皮の発癌初期段階で重要な役割を果たしていることを明らかにした。YKL-40/OPN 陽性炎症細胞の浸潤数と腫瘍細胞における β4 の発現強度が、ESD 後再発を予測する新たなバイオマーカーとなる可能性など重要な知見を得ており、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。