



Periostin in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by Enhancing Cancer and Stromal Cell Migration

都, 鍾智

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8870号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490095>

※ 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

Periostin in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma
Progression by Enhancing Cancer and Stromal Cell Migration

癌関連線維芽細胞におけるペリオスチンは癌細胞と間質細胞の遊走を促進することにより
食道扁平上皮癌の進行を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
(指導教員:横崎 宏 教授、掛地 吉弘 教授)

都 鍾智

背景・目的

癌微小環境 (TME) は腫瘍の進展に重要な役割を担っており、その中の主要な構成細胞の一つである癌関連線維芽細胞 (CAF) は、食道扁平上皮癌 (ESCC) をはじめとする多くの癌の進展に寄与することが知られている。申請者の研究室では、CAF の起源の一つであるヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を ESCC 細胞株と間接共培養することで CAF 様細胞を作製する方法を確立し、CAF 様細胞において発現量が上昇する CCL-2、IL-6、PAI-1、MT2A などの様々な因子が ESCC の進展に関与することを報告してきた。今回、CAF による ESCC 進展のメカニズムをさらに解明するため、ESCC 細胞株と MSC の直接共培養法を確立し、「単培養した MSC」と「ESCC との直接共培養によって作製した MSC 由来の CAF 様細胞」の間で cDNA マイクロアレイ解析を行い、CAF 様細胞で高発現する遺伝子を同定し、ESCC の新たな治療標的や予後因子となりうるかを検討した。

材料と方法

MSC と ESCC 細胞株 (TE-9, TE-10, TE-15) の直接共培養は 4 日間行い、自動磁気細胞分離装置 (autoMACS[®]) により、上皮マーカーである EpCAM を標的とするマイクロビーズを用いて、共培養後の ESCC 細胞株と CAF 様細胞を選択的に分離した。またコントロールとしてそれぞれの単培養である MSC と ESCC 細胞株も autoMACS[®] を経由した。単培養後および共培養後の ESCC 細胞株の間でシグナル伝達、生存能、増殖能、運動能を解析した。細胞内の各因子の発現は RT-PCR や qPCR、シグナル伝達は western blotting、生存能と増殖能は MTS 試薬を用いた 492nm の吸光度の測定、運動能は Transwell migration assay と Wound healing assay で評価した。cDNA マイクロアレイ解析は、3D-Gene[®] Human Oligo chip 25k を用いて単培養の MSC と直接共培養後の CAF 様細胞の間で行った。CAF 様細胞から分泌されるサイトカインは ELISA で測定した。さらに ESCC 細胞株に recombinant human periostin (rhPOSTN) を作用させ、シグナル伝達、生存能、増殖能、運動能を解析した。直接共培養下において、periostin の knock down を siRNA (siPOSTN) と Lipofectamine RNAiMAX を用いて行い、生存能、増殖能、運動能を評価した。また rhPOSTN を添加した ESCC 細胞株に Akt 阻害剤 (LY294002) または Erk 阻害剤 (PD98059) を加え、運動能を解析した。ESCC 細胞株における integrin $\beta 4$ の knock down は、siRNA (siITGB4) と Lipofectamine RNAiMAX を用いて行い、生存能、増殖能、運動能を評価した。MSC あるいはヒト末梢血単球由来のマクロファージに

rhPOSTN を 2 日間作用させて、それぞれの性質と運動能の変化を評価した。ESCC に対する外科的切除標本 69 例で periostin の免疫組織化学を Leica Bond-Max automation と Leica Refine detection kit を用いて行った。Periostin の染色範囲により Low 群と High 群に分け、 χ^2 検定を用いて臨床病理学的因子との関連を検討した。また Kaplan–Meier 法を用いて、ESCC 患者の生存率との関連を検討した。

結果

MSC と ESCC 細胞株との直接共培養において、直接共培養後の MSC は CAF マーカーである FAP が高発現を示し、直接共培養後の ESCC 細胞は単培養の ESCC 細胞と比べて、生存能、増殖能、運動能が亢進した。また共培養後の ESCC 細胞と CAF 様細胞において、リン酸化 Akt、リン酸化 Erk の亢進を確認した。MSC と CAF 様細胞の間で cDNA マイクロアレイ解析を行い、直接共培養下で作製された CAF 様細胞でのみ発現が上昇する因子として、periostin を見出した。CAF 様細胞では MSC と比較して、POSTN mRNA が高発現しており、CAF 様細胞の培養上清中には periostin の分泌が有意に上昇していた。Periostin を knock down した MSC と直接共培養を行った ESCC 細胞では生存能および運動能の亢進がキャンセルされた。RhPOSTN を作用させた ESCC 細胞は Akt と Erk シグナル伝達経路の活性化を認め、生存能および運動能の亢進を認めた。そこで Akt または Erk の阻害剤を加えると、亢進した運動能が抑制された。ESCC 細胞において periostin の受容体の一つである integrin $\beta 4$ の発現を確認すると、共培養後の ESCC 細胞では mRNA レベルとタンパクレベルで発現が亢進していた。Integrin $\beta 4$ を knock down した ESCC 細胞に rhPOSTN を添加すると、periostin により亢進した生存能および運動能がキャンセルされ、Akt、Erk のシグナル伝達経路の活性化も減弱した。MSC およびヒト末梢血単球由来のマクロファージに rhPOSTN を作用させると、それぞれの細胞で運動能が亢進し、マクロファージにおいては M2 様の性質を獲得した。

ESCC の外科的切除標本を用いた periostin の免疫組織化学において、癌間質全体における染色範囲で Low 群と High 群に分けて解析すると、High 群は OS、DFS、CSS のいずれにおいても有意に予後が不良であった。また periostin の染色範囲が高度であることは、壁深達度 ($P < 0.001$)、リンパ管侵襲 ($P = 0.001$)、脈管侵襲 ($P < 0.001$)、病理学的病期 ($P = 0.025$) と正の相関を示し、CAF マーカーである α SMA ($P < 0.001$)、FAP ($P < 0.001$)、またマクロファージ浸潤数を示す CD68 ($P = 0.012$)、CD163 ($P = 0.001$)、CD204 ($P < 0.001$) とも正の相関を示した。

考察

直接共培養法は、細胞接着分子、ギャップ結合、ナノチューブを介した異種細胞間の直接的なシグナル伝達を可能にしつつ、生体内の複雑性を比較的容易に再現することができる。従来の間接共培養法に比べ、より実際の TME に近く、間接共培養法では見出だせないプロモーターやサプレッサーを検出できる。本研究では、ESCC 細胞株と MSC の直接共培養を行った後、EpCAM を標的とした autoMACS®を用いて、それぞれを分離する方法を確立した。また直接共培養法は、間接共培養法と同様に、ESCC 細胞株の生存能、増殖能、運動能などの悪性表現型を促進した。

Periostin は、直接共培養法で有意に発現が上昇し、間接共培養法で発現に変化のなかった遺伝子であった。Periostin は様々な固形上皮性腫瘍で過剰発現が報告されており、種々の integrin ファミリーの受容体との相互作用が、癌の進行を促進する細胞内シグナル伝達経路を活性化しているという報告が多い。Periostin は標的細胞表面の integrin $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha 6\beta 4$ に結合し、複数のシグナル伝達経路を活性化することが知られている。Integrin $\beta 4$ は、 $\alpha 6$ のみとヘテロ二量体を形成するサブユニットであり、腫瘍の進展に伴い発現が亢進するとされる。申請者らは、ESCC の CAF から分泌される periostin が ESCC 細胞において integrin $\beta 4$ を介し、Akt、Erk のシグナル伝達経路を活性化させ、ESCC の進行を促進することを報告した。また periostin は MSC の運動を促進し、さらにマクロファージにおいては、M2 マクロファージの極性を示す IL10 の高発現と IL12 の低発現、腫瘍関連マクロファージ (TAM) 様特性の獲得を示す CD163 と CD204 の高発現を示し、マクロファージの運動の亢進も認めた。ESCC において periostin が integrin $\beta 4$ を介して癌進展に寄与する報告はなく、加えて periostin が MSC やマクロファージの運動を促進し、TAM の活性化を誘導することは、本研究が初の報告となる。

ESCC 組織における periostin の高発現は、腫瘍深達度、脈管浸潤、リンパ管浸潤、病理学的病期と正の相関を示した。今回初めて、periostin の高発現が α SMA および FAP の発現と相関することが示され、periostin が CAF マーカーである可能性が示唆された。汎マクロファージマーカーである CD68、TAM マーカーである CD163 と CD204 は、periostin の高発現と正の相関を示し、マクロファージの遊走と TAM 様特性の獲得を促進する in vitro の結果を支持した。

結論

ESCC 細胞と MSC の直接共培養系を確立した。CAF から分泌される periostin は、ESCC 細胞の生存と運動、MSC とマクロファージの運動、マクロファージの TAM 様性質の獲得を促進し、TME の発達に寄与した。癌間質における periostin の高発現は、ESCC 患者における臨床病理学的因子の進行および生存率の低下と正の相関があった。periostin は ESCC に対する新しい治療標的となる可能性が示唆された。

(スペース込み:3884 文字)

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3365 号	氏 名	都 鐘智
論 文 題 目 Title of Dissertation	<p>Periostin in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by Enhancing Cancer and Stromal Cell Migration</p> <p>癌関連線維芽細胞におけるペリオスチンは癌細胞と間質細胞の遊走を促進することにより食道扁平上皮癌の進行を促進する</p>		
審 査 委 員 Examiner	<p>主 査 Chief Examiner 真 庭 謙 昌</p> <p>副 査 Vice-examiner 児 玉 裕 三</p> <p>副 査 Vice-examiner 堀 口 正 也</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

癌微小環境 (TME) 中の癌関連線維芽細胞 (CAF) は、食道扁平上皮癌 (ESCC) をはじめとする多くの癌の進展に寄与する。本研究では、ESCC 細胞株と MSC の直接共培養法を確立し、「単培養した MSC」と「ESCC との直接共培養によって作製した MSC 由来の CAF 様細胞」の間で cDNA マイクロアレイ解析を行い、CAF 様細胞で高発現する遺伝子を同定し、ESCC の新たな治療標的や予後因子となりうるかを検討した。用いた材料と方法は次のごとくである。

MSC と ESCC 細胞株 (TE-9, TE-10, TE-15) の直接共培養は 4 日間行い、自動磁気細胞分離装置 (autoMACS®) により、共培養後の ESCC 細胞株と CAF 様細胞を選択的に分離した。各細胞内の因子の発現は RT-PCR や qPCR、分泌されるサイトカインは ELISA、シグナル伝達は western blotting、生存能と増殖能は MTS 試薬を用いた 492nm の吸光度の測定、運動能は Transwell migration assay と Wound healing assay で評価した。cDNA マイクロアレイ解析は、3D-Gene® Human Oligo chip 25k を用いて単培養の MSC と直接共培養後の CAF 様細胞の間で行った。さらに recombinant human periostin (rhPOSTN) を作用させた細胞を用いた解析や、MSC で periostin を、或いは ESCC 細胞で integrin $\beta 4$ を knock down した細胞を用いた解析を行った。ESCC に対する外科的切除標本 69 例で periostin の免疫組織化学を行い、染色範囲により Low 群と High 群に分け、臨床病理学的因子との関連と ESCC 患者の生存率との関連を検討した。得られた結果は以下のごとくである。

MSC と ESCC 細胞株との直接共培養において、直接共培養後の MSC は CAF マーカーである FAP が高発現を示し、直接共培養後の ESCC 細胞は生存、増殖、運動が亢進した。また共培養後の ESCC 細胞と CAF 様細胞において、リン酸化 Akt、リン酸化 Erk の亢進を確認した。MSC と CAF 様細胞の間で cDNA マイクロアレイ解析を行い、直接共培養下で作製された CAF 様細胞でのみ発現が上昇する因子として、periostin を見出し、CAF 様細胞ではその分泌が有意に上昇することを確認した。Periostin を knock down した MSC と直接共培養を行った ESCC 細胞は生存および運動の亢進がキャンセルされた。RhPOSTN を作用させた ESCC 細胞は Akt と Erk シグナル経路の活性化を認め、生存および運動の亢進を認めたが、それらは Akt または Erk の阻害剤で抑制された。共培養後の ESCC 細胞では periostin の受容体の一つである integrin $\beta 4$ の発現が亢進していた。Integrin $\beta 4$ を knock down した ESCC 細胞に rhPOSTN を添加すると、periostin により亢進した生存および運動がキャンセルされ、Akt、Erk のシグナル伝達経路の活性化も減弱した。MSC およびヒト末梢血単球由来のマクロファージに rhPOSTN を作用させると、それぞれの細胞で運動が亢進し、マクロファージにおいては TAM 様の性質を獲得した。

ESCC の外科的切除標本を用いた periostin の免疫組織化学において、癌間質全体における染色範囲で Low 群と High 群に分けて解析すると、periostin の高発現は、腫瘍深達度、脈管浸潤、リンパ管浸潤、病理学的病期と正の相関を示し、CAF マーカーである α SMA および FAP の発現と、また汎マクロファージマーカーである CD68、TAM マーカーである

CD163 と CD204 とともに正の相関を示した。Periostin の高発現は OS、DFS、CSS のいずれの生存解析においても有意に予後不良であった。

MSC は ESCC 細胞株との直接共培養法により CAF 様細胞へ分化した。直接共培養により ESCC の生存、増殖、運動が亢進した。CAF 様細胞からは periostin が分泌され、periostin は ESCC 細胞に発現する integrin $\beta 4$ を介して、Akt、Erk のシグナル伝達経路を活性化し、ESCC の進行を促進した。Periostin は MSC とマクロファージの運動を促進し、さらにマクロファージにおいては、TAM 様性質の獲得に寄与した。CAF 由来の periostin が、ESCC 細胞、CAF、マクロファージで構成される TME の形成に寄与することで、ESCC の進展を促進する可能性が示唆された。Periostin は ESCC の新規治療標的分子やバイオマーカーとして発展が期待される。

本研究は、食道癌の進展における Periostin の役割について検討した研究であるが、癌細胞との直接接触により誘導された CAF 様細胞から発現される Periostin が癌細胞の生存能や増殖能を著明に亢進させることを明らかにした価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。