



IFI16 Induced by Direct Interaction between Esophageal Squamous Cell Carcinomas and Macrophages Promotes Tumor Progression via Secretion of IL-1 α

安積, 佑樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8871号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490096>

※ 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

IFI16 Induced by Direct Interaction between Esophageal Squamous Cell

Carcinomas and Macrophages Promotes Tumor Progression via Secretion of

IL-1 α

食道扁平上皮癌とマクロファージとの直接的な相互作用により発現誘導される

IFI16 は IL-1 α の分泌を介して腫瘍進展を促進する

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)

安積 佑樹

腫瘍微小環境の主要な構成細胞である腫瘍関連マクロファージ (TAM) は食道扁平上皮癌 (ESCC) の進展に寄与し、不良な予後と関連することが知られている。申請者の研究室ではヒト ESCC 細胞株とマクロファージとの直接共培養系を確立し、共培養により ESCC 細胞の生存能・増殖能・運動能といった悪性形質を促進することをこれまでに報告した。このことから癌細胞とマクロファージの直接接触を介した相互作用が ESCC の悪性度に寄与することが示唆されたが、その詳細な機序については不明な点が多い。インターフェロンは様々なシグナル伝達を介して、免疫反応だけでなく腫瘍進展への関連が報告されている。そこで、インターフェロンにより誘導される遺伝子群として HIN-200 ファミリーが ESCC とマクロファージとの直接共培養を介した悪性形質の促進にどのように関与するかを解析した。用いた材料と方法は以下のごとくである。

ヒト末梢血から自動磁気細胞分離装置 (autoMACS®) により、CD14 陽性単球を選択的に回収した。さらに M-CSF を添加して 6 日間培養させることでマクロファージに分化させ、ヒト ESCC 細胞株 (TE-11) と 2 日間直接共培養を行った。上皮マーカーである EpCAM に対するマイクロビーズを用いて腫瘍細胞のみを分離した。単独培養した TE-11 と直接共培養した TE-11 との間で cDNA microarray 解析を行い、網羅的に遺伝子の発現変化を比較した。siRNA を用いて ESCC 細胞株における IFI16 の knock down を行い、シグナル伝達、生存能・増殖能・運動能を解析した。細胞内のシグナル伝達は western blotting、生存能・増殖能は MTS 試薬を用いた 492 nm の吸光度の測定、運動能は Transwell migration assay で評価した。IFI16 を knock down することによる ESCC 細胞株からのサイトカイン分泌の変化を cytokine array と ELISA を用いて評価した。さらに、直接共培養した ESCC 細胞株に IL-1 α の中和抗体を添加し、生存能・増殖能・運動能の変化を評価した。Recombinant human IL-1 α (rhIL-1 α) を ESCC 細胞株に添加してリン酸化シグナル変化や生存能・増殖能・運動能の変化を評価した。さらに rhIL-1 α を添加した ESCC 細胞株に Erk の阻害剤 PD98059 または NF- κ B の阻害剤 BAY11-7082 を加え、生存能・増殖能・運動能の変化を評価した。ESCC に対する外科的切除標本 69 例での IFI16 の免疫染色は Leica bond-Max automation と Leica Refine detection kit を用いた。IFI16 の染色強度により low 群と high 群に分け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、IFI16 の発現強度と ESCC 患者の生存率との関連を検討した。得られた結果は次のごとくである。

cDNA microarray 解析を用いて単独培養した TE-11 とマクロファージと直接共培養した TE-11 との間で HIN-200 ファミリーに属する遺伝子の発現量を比較し、共培養後の ESCC 細胞株において IFI16 が最も著明に発現が上昇していることを発見した。ESCC 細胞株 (TE-9、TE-10、TE-11) において IFI16 を knock down すると生存能・増殖能・運動能が抑制され、Erk 及び NF- κ B のリン酸化が減少した。さらに cytokine array を用いてサイトカイン分泌の変化を検索すると、IFI16 の knock down によって IL-1 α の分泌低下を認めた。直接共培養した ESCC 細胞株 (TE-9、TE-10、TE-11) に IL-1 α の中和抗体を添加すると、亢進していた生存能・増殖能・運動能が抑制された。rhIL-1 α を ESCC 細胞株 (TE-9、TE-

10、TE-11) に添加すると生存能及び運動能の亢進を認め、Erk 及び NF- κ B のリン酸化が増加した。rhIL-1 α を添加した ESCC 細胞株 (TE-9、TE-10、TE-11) に Erk または NF- κ B の阻害剤を加えると、生存能・増殖能・運動能の抑制を認めた。

ESCC の外科的切除標本を用いた IFI16 の免疫組織化学では、IFI16 は癌細胞の核において陽性となった。IFI16 の染色強度により low 群と high 群に分けて解析すると、high 群は low 群と比較して disease-free survival が予後不良な傾向 ($P = 0.083$) を示し、また IFI16 の発現は壁深達度 ($P = 0.042$) やリンパ節転移 ($P = 0.039$)、マクロファージ浸潤数 (CD68; $P = 0.009$, CD204; $P = 0.015$) と有意に正の相関を示した。

IFI16 はウイルス感染の際に DNA センサーとして機能するタンパク質である。最近では、IFI16 は自己免疫疾患の患者の血中において抗 IFI16 抗体が検出されることが報告されている。IFI16 はリンパ球やマクロファージ、血管内皮細胞および上皮細胞に発現している。B リンパ球における IFI16 の発現は B リンパ球の分化制御と相関しているが、血管内皮細胞や上皮細胞における IFI16 の働きは明らかではない。

IFI16 の腫瘍進展における役割は様々である。これまでに IFI16 が腫瘍の増殖を阻害することや、STING と I 型インターフェロンを介したシグナル経路により腫瘍細胞における DNA 修復を阻害することで抗腫瘍効果を示すことが報告されている。一方で、IFI16 により誘導された STING 経路は制御性 T 細胞といった免疫寛容細胞の浸潤を起こして腫瘍促進的に働くことが報告されている。また IFI16 は NOD 受容体と結合してインフラマソームを形成することで腫瘍促進に関与することが報告されている。IFI16 は癌腫によって腫瘍抑制的に働くものや、腫瘍促進的に働くものが報告されている。

ESCC において IFI16 は様々なサイトカインの分泌制御に関与していることが報告されている。申請者らは ESCC 細胞とマクロファージとの autocrine または paracrine 的な相互作用によって誘導される IFI16 が、ESCC の IL-1 α 分泌を制御することを示した。IL-1 α が IFI16 の制御下で ESCC 細胞株の悪性形質を促進することは申請者らが初めて明らかにした。

ESCC 切除標本の免疫染色における IFI16 の高発現は壁深達度やリンパ節転移と正の相関を示した。さらに、IFI16 の高発現はマクロファージ浸潤数と正の相関を示し、申請者らの in vitro における ESCC とマクロファージの相互作用との関連を示唆するものと考えられた。また、IFI16 を高発現する症例は disease-free survival の予後不良な傾向を示した。本研究の limitation としては、IL-1 α がマクロファージの表現型に与える影響を評価できていないこと、マウスなどを用いた in vivo の実験を行っていないこと、解析した ESCC の切除標本数が比較的少ないことが挙げられる。

本研究では、マクロファージとの直接的な相互作用が ESCC 細胞における IFI16 発現を上昇させることを発見した。IFI16 発現の増加は ESCC 細胞の生存能・増殖能・運動能などの悪性形質を促進し、それは NF- κ B と Erk シグナル伝達経路を介した IL-1 α 発現の制御に起因していた。以上の成果は、ESCC の進展における IFI16 と IL-1 α の関連を明らかにし

た最初の報告である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3366 号	氏 名	安積 佑樹
論文題目 Title of Dissertation	<i>IFI16</i> Induced by Direct Interaction between Esophageal Squamous Cell Carcinomas and Macrophages Promotes Tumor Progression via Secretion of IL-1α 食道扁平上皮癌とマクロファージとの直接的な相互作用により発現誘導される <i>IFI16</i> は IL-1α の分泌を介して腫瘍進展を促進する		
審査委員 Examiner	主 査 福 本 巧 Chief Examiner 副 査 江 下 良 平 Vice-examiner 副 査 南 博 信 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

腫瘍微小環境の主要な構成細胞である腫瘍関連マクロファージ (TAM) は食道扁平上皮癌 (ESCC) の進展に寄与し、不良な予後と関連することが知られている。申請者の研究室ではヒト ESCC 細胞株とマクロファージとの直接共培養系を確立し、共培養により ESCC 細胞の生存能・増殖能・運動能といった悪性形質が促進することをこれまでに報告した。このことから癌細胞とマクロファージの直接接触を介した相互作用が ESCC の悪性度に寄与することが示唆されたが、その詳細な機序については不明な点が多い。今回、インターフェロンにより誘導される遺伝子群として HIN-200 ファミリーに着目し、ESCC とマクロファージとの直接共培養を介した悪性形質の促進にどのように関与するかを解析した。

材料と方法は以下の通りである。ヒト末梢血から自動磁気細胞分離装置 (autoMACS®) により、CD14 陽性単球を選択的に回収した。さらに M-CSF を添加し培養させることでマクロファージに分化させ、ヒト ESCC 細胞株 (TE-11) と直接共培養を行った。上皮マーカーである EpCAM に対するマイクロビーズを用いて autoMACS® によって腫瘍細胞のみを分離した。単独培養した TE-11 と直接共培養した TE-11 との間で cDNA microarray 解析を行い、網羅的に遺伝子の発現変化を比較した。siRNA を用いて ESCC 細胞株における IFI16 の knock down を行い、シグナル伝達、生存能・増殖能・運動能を解析した。細胞内のシグナル伝達は western blotting、生存能・増殖能は MTS 試薬を用いた吸光度の測定、運動能は Transwell migration assay で評価した。IFI16 を knock down することによる ESCC 細胞株からのサイトカイン分泌の変化を cytokine array と ELISA を用いて評価した。さらに、直接共培養した ESCC 細胞株に IL-1 α の中和抗体を添加し、生存能・増殖能・運動能の変化を評価した。Recombinant human IL-1 α (rhIL-1 α) を ESCC 細胞株に添加してリン酸化シグナル変化や生存能・増殖能・運動能の変化を評価した。さらに rhIL-1 α を添加した ESCC 細胞株に Erk の阻害剤または NF- κ B の阻害剤を加え、生存能・増殖能・運動能の変化を評価した。ESCC に対する外科的切除標本 69 例において IFI16 の免疫染色を行い、IFI16 の染色強度により low 群と high 群に分け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、IFI16 の発現強度と ESCC 患者の生存率との関連を検討した。

結果は以下の通りである。cDNA microarray 解析を用いて単独培養した TE-11 とマクロファージと直接共培養した TE-11 との間で HIN-200 ファミリーに属する遺伝子の発現量を比較し、共培養後の ESCC 細胞株において IFI16 が最も著明に発現が上昇していることを発見した。ESCC 細胞株において IFI16 を knock down すると生存能・増殖能・運動能が抑制され、Erk 及び NF- κ B のリン酸化が減少した。さらに cytokine array を用いてサイトカイン分泌の変化を検索すると、IFI16 の knock down によって IL-1 α の分泌低下を認めた。直接共培養した ESCC 細胞株に IL-1 α の中和抗体を添加すると、亢進していた生存能・増殖能・運動能が抑制された。rhIL-1 α を ESCC 細胞株に添加すると生存能及び運動能の亢進を認め、Erk 及び NF- κ B のリン酸化が増加した。rhIL-1 α を添加した ESCC 細胞株に Erk または NF- κ B の阻害剤を加えると、生存能・増殖能・運動能の抑制を認めた。

ESCC の外科的切除標本を用いた IFI16 の免疫組織化学では、IFI16 は癌細胞の核において陽性となった。IFI16 の染色強度により low 群と high 群に分けて解析すると、high 群は low 群と比較して disease-free survival が予後不良な傾向 ($P = 0.083$) を示し、また IFI16 の発現は壁深達度 ($P = 0.042$) やリンパ節転移 ($P = 0.039$)、マクロファージ浸潤数 (CD68; $P = 0.009$, CD204; $P = 0.015$) と有意に正の相関を示した。

本研究ではがん微小環境について、マクロファージとの直接的な相互作用が ESCC 細胞における IFI16 発現を上昇させることを発見した。IFI16 発現の増加は ESCC 細胞の生存能・増殖能・運動能などの悪性形質を促進し、それは NF- κ B と Erk シグナル伝達経路を介した IL-1 α 発現の制御に起因していた。以上の成果は、ESCC の進展における IFI16 と IL-1 α の関連を明らかにした最初の報告であり、重大な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。