



## GDF15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways

Urakawa, Naoki

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6372号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006372>

※ 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。



## 学位論文の内容要旨

**GDF15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways**

食道扁平上皮癌微小環境下における腫瘍関連マクロファージ由来 GDF15 は PI3K/Akt および MEK/Erk 経路を活性化することで腫瘍進展に関与する

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)

(指導教員：掛地 吉弘 教授)

裏川 直樹

## 背景と目的

癌微小環境下には腫瘍細胞のみならず、マクロファージや線維芽細胞など多くの間質を構成する細胞が存在し、腫瘍細胞との相互関係により腫瘍増殖や浸潤、血管新生などに関与するとされる。癌微小環境下に存在するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) と呼ばれ、腫瘍促進的機能を持つとされる。マクロファージは骨髄由来単球が組織内に動員され、微小環境の影響により免疫を賦活する M1 マクロファージ、免疫を抑制する M2 マクロファージの 2 系統に分化することが知られており、TAM は癌微小環境の影響により M2 様の性質を獲得し、M2 特異的表面マーカーである CD163 や CD204 を持つとされる。

食道癌は予後不良の難治性癌の一つであり、早期発見が難しいとされる。特に日本を含むアジア地域では扁平上皮癌の発生頻度が高く、アルコールや喫煙、さらには TP53 や ALDH2 遺伝子が発癌に関与することが知られている。食道扁平上皮癌微小環境に関する研究報告は稀であり、腫瘍進展機構における TAM を含む間質細胞の役割に関する詳細な機能解析は行われていない。このような背景から、過去の研究においてヒト食道扁平上皮癌組織中における CD204 陽性マクロファージ数と臨床病理学的因子および予後不良との関連性を報告し、さらに *in vitro* においてヒト急性白血病由来単球細胞株 THP-1 にヒト食道扁平上皮癌細胞株培養上清液を添加した TAM 様細胞を作成し、M2 マーカーである CD204 や血管新生に関与する VEGFA の発現誘導を明らかにしてきた。

本研究では、食道扁平上皮癌微小環境下における TAM の役割をさらに詳細に検討するため、ヒト末梢血から分離した単球にヒト食道扁平上皮癌細胞株培養上清液を添加し、ヒト末梢血由来 TAM 様細胞を作成し機能解析を行った。さらに、cDNA マイクロアレイ解析により TAM に発現誘導される腫瘍関連遺伝子を網羅的に検討した。

## 材料と方法

食道扁平上皮癌細胞株は TE-8, TE-9, TE-15 の 3 種類を用いた。ヒト食道扁平上皮癌細胞株培養上清液は、10cm ディッシュに食道扁平上皮癌細胞株  $5 \times 10^6$  個を播種し、24 時間後に 10% human AB serum を添加した DMEM 培地に交換、2 日後に上清液の回収を行った。ヒト末梢血単球は、健常者から採取した末梢血を自動磁気細胞分離装置で分離した CD14 陽性単球を使用した。単球  $1 \times 10^5$  個/mL にヒト組換えタンパク M-CSF (rhM-CSF) 25 ng/mL を 6 日間添加し、マクロファージ様細胞を作成した。さらに 50% 食道扁平上皮癌細胞株培養上清液を 2 日間添加し、TAM 様細胞を作成した。TAM の機能解析に関しては、real-time PCR や蛍光免疫染色法、cDNA マイクロアレ

イ解析を用いて評価を行った。cDNA マイクロアレイ解析により着目した腫瘍関連遺伝子については、PCR や ELISA、二重蛍光免疫染色法にて確認を行い、食道扁平上皮癌細胞株への作用解析については Western blotting と細胞増殖試験 (MTS 法) を用いた。

さらに神戸大学医学部附属病院にて外科的に切除され術前放射線および化学療法未治療の食道扁平上皮癌 70 例について、マクロファージマーカーや着目した腫瘍関連遺伝子の免疫染色を行い、臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。統計学的評価は Student's *t* test や one-way ANOVA,  $\chi^2$  test, log-rank 検定を用い、 $P < 0.05$  を統計学的有意差とした。

## 結果

### 1. *In vitro* における TAM の機能解析について

ヒト末梢血由来マクロファージ様細胞と、さらに 2 日間食道扁平上皮癌細胞株 TE-8, TE-9, TE-15 の培養上清液を添加した TAM 様細胞の比較検討を行った。Real-time PCR 法において M2 マーカーである CD163 や CD204 の発現上昇を確認し、二重蛍光免疫染色法においてマクロファージマーカーである CD11b と CD163 や CD204 の共発現を認めた。また、TAM に特異的傾向とされる IL-10 の発現上昇および IL-12 の発現低下を確認し、血管新生に関与する VEGFA や浸潤に関与する MMP-2, MMP-9 の発現上昇も確認した。さらに cDNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現比較検討により、233 個の遺伝子がマクロファージに比較して 4 倍以上の発現上昇を認め、232 個の遺伝子が 0.25 倍以下の発現低下を認めた。発現上昇した遺伝子の中には、IL-6 や IL-8, CXCL1 など腫瘍進展に関連する遺伝子が含まれていた。

### 2. TAM 様細胞およびヒト食道扁平上皮癌組織における GDF15 の発現について

cDNA マイクロアレイ解析により発現上昇した因子の中から、腫瘍増殖や浸潤に関与するとされる *growth differentiation factor 15* (GDF15) に着目した。まず、TAM 様細胞において mRNA レベルおよびタンパクレベルで GDF15 の発現上昇を確認した。一方で、食道扁平上皮癌細胞株 TE-8 と TE-15 においては GDF15 の発現を認めなかったが、TE-9 においては発現を認めた。ヒト食道扁平上皮癌組織切片を用いて二重蛍光免疫染色法を行ったところ、GDF15 を発現する腫瘍細胞も認めたが、GDF15 と CD204 を共発現する TAM が散見された。

### 3. 食道扁平上皮癌組織における GDF15 発現と臨床病理学的因子およびマクロファージマーカーとの関連について

ヒト食道扁平上皮癌 70 例の腫瘍胞巣浸潤部の GDF15 発現レベルを非腫瘍部上皮との発現比較において大別したところ、high 群 25 例と low 群 45 例であった。High 群では深達度やリンパ節転移、静脈侵襲、リンパ管侵襲、進行度の間に有意な相関を認め、さらにマクロファージマーカー CD68 や M2 マクロファージマーカー CD163、CD204 陽性細胞数 high 群と有意な相関性を示した。また、GDF15 発現 high 群では全生存期間および無再発生存期間で有意に予後不良であった。

### 4. PI3K/Akt および MEK/Erk シグナル経路を介した食道扁平上皮癌細胞株に対する GDF15 の増殖効果について

rhGDF15 を食道扁平上皮癌細胞株に添加したところ、濃度依存性に細胞数の増加を認め、100 ng/mL 添加ではいずれの TE 細胞株においても有意に増加を認めた。細胞増殖に関与するとされる PI3K/Akt および MEK/Erk シグナル経路の活性化を評価したところ、rhGDF15 100 ng/mL 添加 10 分後に Akt および Erk のリン酸化を認めた。さらに、PI3K および MEK の阻害剤である LY294002 と PD98059 を用いて細胞増殖活性を評価したところ、いずれの阻害剤を添加した食道扁平上皮癌細胞株においても rhGDF 添加による増殖効果は認めなかった。

## 考察

本研究では、食道扁平上皮癌細胞株培養上清により分化したヒト末梢血由来 TAM 様細胞は M2 マクロファージ様性質を獲得し、cDNA マイクロアレイ解析により発現上昇を認めた GDF15 を産生することを見出した。様々な癌微小環境下に存在する TAM は腫瘍増殖や血管新生などの腫瘍促進作用を持つことが知られており、食道扁平上皮癌微小環境においても IL-10 や VEGFA、MMPs などを産生し腫瘍進展機構に関与することが示唆された。GDF15 は TGF-β スーパーファミリーの一つとされ、正常組織においては胎盤や脳などに発現を認める。癌組織においては大腸癌や前立腺癌などに発現し、増殖や浸潤に関与することが報告されているが、食道扁平上皮癌微小環境下における GDF15 に関する詳細な報告は認めない。近年の前立腺癌微小環境に関する研究において、間質細胞である腫瘍関連線維芽細胞からの GDF15 産生が報告され、増殖や浸潤に関与することが報告された。本研究も同様に、腫瘍細胞のみならず間質細胞の一つである TAM からの GDF15 産生を確認し、*in vitro* において rhGDF15 は食道扁平上皮癌細胞株に対し PI3K/Akt および MEK/Erk シグナル経路を介して濃度依存性に増殖に関与することが示された。以上より、食道扁平上皮癌微小環境下における TAM 由来 GDF15 は腫瘍増殖に関与することが示唆された。

免疫組織化学において、GDF15 強発現と多くの臨床病理学的因子は相関性を示し、

生存率や再発率も予後不良の結果であった。近年、食道癌患者における血清 GDF15 濃度高値と臨床病理学的因子は相関するとした報告がなされたが、本研究における免疫組織化を用いたヒト食道扁平上皮癌組織の臨床解析と相違の無い結果であると推察される。以上より、食道癌患者における GDF15 の存在は、腫瘍進行度の指標となりうる可能性が示唆された。

#### 結語

以上から、食道扁平上皮癌微小環境下に存在する TAM は腫瘍促進的性質を獲得し、さらに GDF15 を産生することで腫瘍細胞内の PI3K/Akt および MEK/Erk シグナル経路を活性化し腫瘍増殖や予後不良に関与すると考えられた。今後、GDF15 は食道癌患者の診断および進行度評価に対する新規バイオマーカーとなる可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2486号	氏名	裏川 直樹
論文題目 Title of Dissertation	<p>食道扁平上皮癌微小環境下における腫瘍関連マクロファージ由来 GDF15 は PI3K/Akt および MEK/Erk 経路を活性化することで腫瘍進展に関与する</p> <p>GDF15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 伊藤 審司 Chief Examiner</p> <p>副査 木 葉介 Vice-examiner</p> <p>副査 真庭 謙司 Vice-examiner</p>		

癌微小環境下に存在するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) と呼ばれる。マクロファージは免疫を賦活する M1 マクロファージ、免疫を抑制する M2 マクロファージの 2 系統が知られており、TAM は M2 様の性質を獲得し、M2 特異的表面マーカーである CD163 や CD204 を持つ。しかし、これまで、食道癌における TAM の役割に関する詳細な機能解析は行われていない。

研究者の解析では、ヒト末梢血由来マクロファージ様細胞と、さらに 2 日間食道扁平上皮癌細胞株 TE-8, TE-9, TE-15 の培養上清液を添加した TAM 様細胞は Real-time PCR 法において M2 マーカーである CD163 や CD204 の発現上昇がみられ、二重蛍光免疫染色法において CD11b と CD163 や CD204 の共発現を認めた。また、TAM に特異的傾向とされる IL-10 の発現上昇および IL-12 の発現低下がみられ、VEGFA や MMP-2, MMP-9 の発現上昇も確認した。さらに cDNA マイクロアレイ解析では、233 個の遺伝子がマクロファージに比較して 4 倍以上の発現上昇を認め、232 個の遺伝子が 0.25 倍以下の発現低下を認めた。発現上昇した遺伝子の中には、IL-6 や IL-8, CXCL1 など腫瘍進展に関連する遺伝子が含まれていた。研究者はさらに growth differentiation factor 15 (GDF15) に着目した。まず、TAM 様細胞では mRNA レベルおよびタンパクレベルでの GDF15 の発現上昇を確認した。一方で、食道扁平上皮癌細胞株 TE-8 と TE-15 においては GDF15 の発現を認めなかたが、TE-9 においては発現を認めた。ヒト食道扁平上皮癌組織切片を用いて二重蛍光免疫染色法を行ったところ、GDF15 を発現する腫瘍細胞も認めたが、GDF15 と CD204 を共発現する TAM が散見された。

食道扁平上皮癌症例 70 例の腫瘍浸潤部の GDF15 を免疫染色にて検討したところ、high expression 群 25 例と low expression 群 45 例であった。High 群では深達度やリンパ節転移、静脈侵襲、リンパ管侵襲、進行度との間に有意な相関がみられた。さらに CD68 や CD163、CD204 陽性細胞数は high 群と有意な相関性を示した。また、GDF15 発現 high 群では全生存期間および無再発生存期間で有意に予後不良となった。

rhGDF15 を食道扁平上皮癌細胞株に添加した際には、細胞数の増加を認め、濃度依存性も確認された。100 ng/mL 添加ではいずれの株も有意に増加を認めた。PI3K/Akt および MEK/Erk シグナル経路の活性化を評価したところ、rhGDF15 100 ng/mL 添加 10 分後に Akt および Erk のリン酸化がみられた。さらに、PI3K および MEK の阻害剤である LY294002 と PD98059 を添加した食道扁平上皮癌細胞株においても rhGDF 添加による増殖効果は認めなかった。

以上、研究者は食道扁平上皮癌微小環境下に存在する TAM が腫瘍促進的性質を獲得し、さらに GDF15 を産生することで腫瘍細胞内の PI3K/Akt および MEK/Erk シグナル経路を活性化し腫瘍増殖や予後不良に関与すること明らかにし、今後、GDF15 は食道癌患者の診断および進行度評価に対する新規バイオマーカーとなる可能性があると考えられた。従来ほとんど行われなかつた重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。