Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-21

NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells

Takase, Nobuhisa

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2016-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6719号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006719

※ 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

NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells

食道癌微小環境におけるNCAM/FGF-2 を介したFGFR1シグナルは、腫瘍関連マクロファージおよび癌細胞の生存・遊走を制御する

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)

高瀬　信尚

存アッセイを用いて確認するとともに、NCAMの関連遺伝子についても同様に解析した。

さらに神戸大学医学部附属病院において、外科的に切除されたESCC 70例を用いた免疫組織化学的解析を行い、着目した遺伝子の発現強度による主要な臨床病理学的因子・MΦマーカー・予後との相関性について検討した。統計学的評価にはカイ二乗検定、*t*-testを用い、$P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

結果

1. TECMの刺激によるTAM様細胞への分化によりNCAMの誘導ならびに遊走・生存が促進される。

cDNAマイクロアレイ解析の妥当性を証明するため、PCR法・ウエスタンブロット法・蛍光抗体法を用いて、TAM様細胞におけるNCAMの有意な発現誘導を確認した。また二重蛍光免染によって、葉状仮足の箇所でファロイジンとNCAMが共局在し、NCAMが細胞運動能に関与する可能性が示唆された。これらの表現型解析では、TAM様細胞に分化することによるPI3K-Aktを介した遊走・生存の有意な促進が確認された。

2. NCAMはPI3K-Aktシグナルを介したTAM様細胞の生存・遊走に関与する。

siRNAを用いてTE-9のTECMを作用させたTAM様細胞のNCAM発現をノックダウンし、細胞遊走能・細胞生存能の変化と、リン酸化チロシンキナーゼ抗体アレイによる解析を行った。NCAMをノックダウンしたTAM様細胞では、PI3K-Akt-p70S6Kのリン酸化減弱を伴う有意な生存・遊走の低下が認められた。

3. TAM様細胞におけるNCAM/FGF-2 を介したFGFR1シグナルはFGFR1のリン酸化を制御する。

TAMにおけるNCAMとFGFR1の相互作用について解析を行った。TE-9のTECMを作用させたTAM様細胞は、二重蛍光免疫染色によってNCAMとFGFR1の共局在所見を呈した。ウエスタンブロット解析では、TAM様細胞のNCAM発現をノックダウンすることでFGFR1のリン酸化が減弱した。興味深いことに、MΦ様細胞からTAM様細胞への分化によってもFGFR1の発現およびリン酸化が亢進した。

さらに癌微小環境におけるFGFR1の役割を解析するため、その主要なリガンドであるFGF-2との関連についても解析した。まずウエスタンブロット解析によってTAM様細胞でのFGF2発現を確認するとともに、ELISA法によってTEでのFGF-2分泌が認められため、TAM様細胞におけるFGF-2の傍分泌作用によるFGFR1シグナルの影響を検討した。24時間血清飢餓としたTAM様細胞にヒト組み換えタンパクFGF-2 (rhFGF-2; 5 ng/mL)を作用させると、FGFR1・Akt・Ernkが活性化し、FGFR阻害剤SU5402 (50 μM)の処理によりそれらのシグナルは有意に阻害された。さらにrhFGF-2の刺激で細胞生存・遊走が促進され、SU5402の作用によりそれらは有意に阻害された。

本研究により、ESCC 微小環境における TAM での NCAM 発現は、TAM 自身の FGFR1 発現および活性化を制御するとともに、FGF-2 を介した FGFR1 シグナルの活性化によっても TAM ならびに癌細胞の生存・遊走が促進されることを明らかとした。以上より、これらの分子を用いた新規分子標的治療の開発、および新規の予後予測バイオマーカーが ESCC の治療に有用であ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2621号	氏　名	高瀬 信尚
論文題目 Title of Dissertation	食道癌微小環境における NCAM/FGF-2 を介した FGFR1 シグナルは、腫瘍関連マクロファージおよび癌細胞の生存・遊走を制御する NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenviroment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 伊藤 壽一 副　査 Vice-examiner 具 英成 副　査 Vice-examiner 真庭 謙昌		

腫瘍微小環境における主要な構成要素の１つであるマクロファージ（MΦ)は、腫瘍抑制的に作用する M1 型と腫瘍促進的に作用する M2 型に分けられ、腫瘍関連 MΦ （TAMs）は主に M2 型に分化している。一般に M2 MΦ は IL-10^{high}、IL-12^{low} の表現型を示すとともに、スカベンジャー受容体である CD163 や CD204 を高発現し、M2 MΦ の浸潤は患者の不良な予後と相関することが食道扁平上皮癌（ESCC)を含めた様々な腫瘍で報告されている。本研究では ESCC における TAM の役割を解明するため、ヒト末梢血より作成した MΦ 様細胞をヒト食道扁平上皮癌細胞株の培養上清（TECM)の刺激により TAM 様細胞へ分化させることで誘導される遺伝子を、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、接着因子である *NCAM*(*neural cell adhesion molecule*)に着目した。
得られた結果は以下の如くである。

(1) TECM の刺激による TAM 様細胞への分化により NCAM の誘導ならびに遊走・生存が促進される。

cDNA マイクロアレイ解析の妥当性を証明するため、PCR 法・ウエスタンブロット法・蛍光抗体法を用いて、TAM 様細胞における NCAM の有意な発現誘導を確認した。また二重蛍光免染によって、葉状仮足の箇所でファロイジンと NCAM が共局在し、NCAM が細胞運動能に関与する可能性が示唆された。表現型解析では、TAM 様細胞への分化により PI3K-Akt を介した遊走・生存が有意に促進した。

(2) NCAM は PI3K-Akt シグナルを介した TAM 様細胞の生存・遊走に関与する。

siRNA を用いて TAM 様細胞の NCAM をノックダウンし、細胞遊走能・細胞生存能の変化と、リン酸化チロシンキナーゼ抗体アレイによる解析を行った。NCAM をノックダウンした TAM 様細胞において PI3K-Akt-p70S6K のリン酸化減弱を伴う有意な生存・遊走の低下が認められた。

(3) TAM 様細胞における NCAM/FGF-2 を介した FGFR1 シグナルは FGFR1 のリン酸化を制御する。

NCAM は非古典的な FGFR1 経路のリガンドとして知られている。本研究では、TAM における NCAM と FGFR1 の相互作用について解析を行った。TAM 様細胞は、二重蛍光免疫染色によって NCAM と FGFR1 の共局在所見を呈した。ウエスタンブロット解析では、TAM 様細胞の NCAM 発現をノックダウンすることで FGFR1 のリン酸化が減弱した。興味深いことに、MΦ 様細胞から TAM 様細胞への分化によっても FGFR1 の発現およびリン酸化が亢進した。

さらに癌微小環境における FGFR1 の役割を解析するため、古典的な FGFR1 経路のリガンドである FGF-2 との傍分泌メカニズムについても解析した。24 時間血清飢餓とした TAM 様細胞にヒト組み換えタンパク FGF-2（rhFGF-2; 5 ng/mL)を作用させると

FGFR1・Akt・Erk が活性化し、FGFR 阻害剤 SU5402 (50 μM)の処理によりそれらのシグナルは有意に阻害された。さらに rhFGF-2 の刺激で細胞生存・遊走が促進され、それらは SU5402 の作用により有意に阻害された。

(4) ヒト食道扁平上皮癌における腫瘍間質の FGF-2 発現は、悪性度および M2MΦ の浸潤数と相関する。

癌細胞における自己分泌メカニズムを確認するため、rhFGF-2 (20 ng/mL)を TE-9 に作用させると、主として Erk の活性化を介して生存・遊走が促進された。さらに蛍光免疫組織学的解析によって、FGF-2 陽性 CD204 陽性 MΦ の存在が確認されたため、切除標本 70 例を用いて TAM との関連も含めた FGF-2 の発現強度による臨床病理学的解析を行った。その結果、腫瘍間質における FGF-2 陽性細胞の浸潤数は深達度・ 血管浸潤・Stage が不良である症例との有意な相関が得られるとともに、M2 MΦ マーカーである CD163 陽性 MΦ・CD204 陽性 MΦ の浸潤数とも有意な相関が得られた。

本研究により、ESCC 微小環境における TAM での NCAM 発現は TAM 自身の FGFR1 発現および活性化を制御するとともに、FGF-2 を介した FGFR1 シグナルの活性化によっても TAM ならびに癌細胞の生存・遊走が促進されることを明らかとした。以上より、これらの分子を用いた新規分子標的治療の開発、および新規の予後予測バイオマーカーが ESCC の治療に有用である可能性が示唆され、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。