



## CXCL8 derived from tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression by promoting migration and invasion of cancer cells

Hosono, Masayoshi

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7130号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007130>

※ 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。



## 背景・目的

### 学位論文の内容要旨

CXCL8 derived from tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression by promoting migration and invasion of cancer cells

腫瘍関連マクロファージおよび食道扁平上皮癌由来の CXCL8 は癌細胞の運動能および浸潤能を亢進し腫瘍進展に寄与する

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)

細野 雅義

腫瘍と腫瘍微小環境との相互作用が腫瘍の進展を促進することが知られている。腫瘍微小環境の中でマクロファージ (MΦ) は最も多く存在する炎症細胞であり、腫瘍抑制的に働く M1 型と腫瘍促進的に働く M2 型に分化する。一般的に M2 型 MΦ は IL-10<sup>high</sup>、IL-12<sup>low</sup> の表現型を示すとともに、ヘモグロビンスカベンジャー受容体である CD163 や、クラス A スカベンジャー受容体である CD204 を高発現する。腫瘍微小環境に浸潤した MΦ は腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage)、通称 TAM と呼ばれ、M2 型 MΦ と類似した性質を獲得し、腫瘍の浸潤や血管新生の促進などを介して腫瘍の進展に関与している。

世界的に食道癌は全癌関連死の中で第 6 位であり、死亡者数は 40 万人に上る。欧米では食道腺癌が大きい割合を占めるが、日本を含めアジア圏においては食道扁平上皮癌が食道癌の 90% 以上を占める。申請者らはこれまでに神戸大学医学部附属病院で手術切除した食道扁平上皮癌の標本の免疫組織化学を用いて、癌組織中に CD204 陽性 MΦ が多く浸潤した症例は、臨床病理学的因子や予後不良と有意に相關することを明らかとした。また *in vitro*においても、ヒト末梢血単球より作成した MΦ にヒト食道扁平上皮癌細胞株の培養上清 conditioned medium of the TE series human ESCC cell line (TECM) を作用させ作成した TAM 様細胞で、IL-10・CD163・CD204・VEGFA・MMP2・MMP9 のような M2 型 MΦ マーカーが有意に誘導されることを明らかにしている。

そこで食道扁平上皮癌と TAM との相互作用を追及するためヒト末梢血由来 MΦ と TECM を添加して作製した TAM 様 MΦ からそれぞれ mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ解析を行った。本研究では MΦ と比較して TAM 様 MΦ で高発現していた遺伝子のうち *C-X-C motif chemokine ligand 8* (CXCL8) に着目し、食道扁平上皮癌の腫瘍微小環境に遊走した TAM 由来の CXCL8 が食道扁平上皮癌に及ぼす生物学的メカニズムの解析を行った。

## 材料と方法

ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE-8、TE-9、TE-15) は理研バイオリソースセンターから購入した。ヒト食道扁平上皮細胞株 (Het-1A) は American Type Culture Collection より購入した。ヒト末梢血から autoMACS を用いて単離した CD14<sup>+</sup> 単球に rhM-CSF を作用

させて作製した MΦ に TE 細胞株の培養上清を添加して TAM 様 MΦ を作製した。RT-PCR、qRT-PCR、ELISA、western blotting、蛍光免疫染色を用いて TAM 様 MΦ における CXCL8 の発現および分泌、TE 細胞株における CXCL8 受容体である CXCR1、CXCR2 の発現を確認した。rhCXCL8 添加時の TE 細胞株の生存能および増殖能に対する影響を MTS assay、運動能に対する影響を transwell migration assay、浸潤能に対する影響を matrigel invasion assay を用いて検討した。PI3K 阻害薬 (LY294002)、MEK1/2 阻害薬 (PD98059)、CXCR1、CXCR2 に対する siRNA および中和抗体を用いて rhCXCL8 添加時の TE 細胞株の phenotype の変化を検討した。腫瘍微小環境モデルとして TE 細胞株と TAM 様 MΦ の間接共培養を行い TE 細胞株の運動能および浸潤能を検討した。そこに LY294002、PD98059 および CXCL8、CXCR1、CXCR2 に対する中和抗体を用いて TE 細胞株の phenotype の変化を検討した。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食道扁平上皮癌 70 症例を用いて CXCL8、CXCR1、CXCR2 の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  $\chi^2$  検定、t 検定、COX 比例ハザードモデル、Log-rank test を用いて  $P < 0.05$  を統計学的有意差とした。

## 結果

### 1. MΦ と比較し、TAM 様 MΦ において CXCL8 の発現および分泌が亢進する

はじめに、qRT-PCR、蛍光免疫染色、ELISA を用いて MΦ と比較して TAM 様 MΦ において CXCL8 の発現および分泌が亢進していることを確認した。次に RT-PCR、western blotting を用いて TE 細胞株に CXCL8 受容体である CXCR1、CXCR2 が発現していることを確認した。

### 2. CXCL8 は食道扁平上皮癌の Akt および Erk1/2 シグナル経路のリン酸化を介して TE 細胞株の運動能および浸潤能を促進する

次に細胞内シグナルを検討するために TE 細胞株に rhCXCL8 を添加すると、添加後 10 分をピークとし Akt および Erk1/2 のリン酸化が亢進した。TE 細胞株に rhCXCL8 を添加すると、生存能および増殖能には影響を及ぼさなかったが、運動能・浸潤能を有意に亢進させた。

### 3. LY294002 または PD98059、および CXCR1/CXCR2 のノックダウンまたは中和抗体は CXCL8 に誘導される TE 細胞株の運動能および浸潤能を抑制した

LY294002 および PD98059 を用いると rhCXCL8 に誘導される運動能および浸潤能の亢進が抑制された。さらに siRNA を用いて TE 細胞株の CXCR1 および CXCR2 をノックダウン行ったところ rhCXCL8 に誘導される TE 細胞の運動能および浸潤能の亢進が抑制された。CXCR1 および CXCR2 の中和抗体を用いると rhCXCL8 に誘導される TE 細胞の運動能および浸潤能は抑制された。

### 4. LY294002、PD98059 および CXCL8、CXCR1、CXCR2 に対する中和抗体は TAM に誘導される TE 細胞株の運動能および浸潤能を抑制する

TE 細胞株を TAM 様 MΦ と間接共培養すると TE 細胞株の運動能および浸潤能が有意に亢進した。この共培養系に LY294002、PD98059 および CXCL8、CXCR1、CXCR2 に対する中和抗体を添加すると TAM 様 MΦ に誘導される TE 細胞株の運動能および浸潤能が抑制された。

### 5. ヒト食道扁平上皮癌および TAM での CXCL8 の発現はリンパ節転移および予後と相関する

神戸大学医学部附属病院で切除した食道扁平上皮癌標本を用いて、CXCL8 の免疫組織化学および二重蛍光免疫染色を行った。蛍光二重免疫染色では、癌細胞だけでなく TAM においても CXCL8 の発現が上昇していることを *in vivo* で確認した。CXCL8 の免疫組織化学は正常扁平上皮の発色をコントロールとし、CXCL8 の発現なし、低発現、高発現の 3 グループに分類した。CXCL8 の発現と臨床病理学的因子との関係を検討したところ、食道扁平上皮癌微小環境での CXCL8 の発現は有意にリンパ節転移の有無、CXCR2 の発現程度、CD204 陽性 MΦ の浸潤数と相関した。また食道扁平上皮癌微小環境において CXCL8 が高発現する症例は Disease Free Survival での予後不良と有意に相関した。

## 考察

CXCL8 は C-X-C motif chemokine family のひとつで interleukin-8 としても知られる。受容体である CXCR1、CXCR2 は 7 回膜貫通型の G 蛋白結合受容体で、CXCR1 は CXCL8 のほかに CXCL6 の受容体として働き、CXCR2 は CXCL8 のほかに CXCL1、CXCL2、

CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7 の受容体として働くことが知られている。これまでに、前立腺癌・乳癌・胃癌・非小細胞肺癌・大腸癌・悪性黒色腫において CXCL8 が腫瘍の進展に寄与することが明らかとされている。食道扁平上皮癌については血清や癌組織での CXCL8 の発現の上昇が予後不良と相関することが示されているが、生物学的なメカニズムは明らかとされていない。

本研究では TAM 由来の CXCL8 が Akt および Erk1/2 のリン酸化を介して TE 細胞株の運動能および浸潤能を亢進することを明らかとした。これまでに Fang らは甲状腺乳頭癌において TAM から分泌される CXCL8 が癌細胞株の浸潤能を亢進させ、予後不良に関与することが報告している。申請者らは TE 細胞株と TAM との共培養系において、CXCR1、CXCR2、CXCL8 に対する中和抗体を作用させると癌細胞株の運動能・浸潤能が有意に抑制されたことより、食道扁平上皮癌の腫瘍微小環境下において CXCL8-CXCR1/CXCR2 の系が癌細胞の運動・浸潤能に重要な役割を果たすことを明らかとした。また、CXCR2 は CXCL8 に加え、種々の C-X-C motif chemokine の受容体として働いているため、CXCR2 を標的的とすることが癌細胞株の運動能および浸潤能の抑制に対してより効果的であると考えられた。

これまでに、Ogura らは食道扁平上皮癌切除標本を用いて CXCL8 と CXCR2 の発現が予後不良に関係することを明らかとしている。また Sui らは食道扁平上皮癌細胞における CXCR2 の高発現が予後不良と相関することを明らかとした。本研究では食道扁平上皮癌切除標本を用いて食道扁平上皮癌および TAM での CXCL8 の高発現がリンパ節転移および予後不良と相関することを明らかとした。一方 CXCR1、CXCR2 の発現は予後とは相関せず、さらなる症例の集積の検討が望ましいと考えられた。

#### 結語

TAM 様 MΦ 由来の CXCL8 は食道扁平上皮癌細胞株の CXCR1・CXCR2 を活性化させ、Akt および Erk1/2 シグナルのリン酸化を介して癌細胞株の運動能および浸潤能を有意に亢進させた。*in vivo* では TAM および食道扁平上皮癌細胞における CXCL8 の発現がリンパ節転移を通じて予後不良に相関することを明らかとした。以上より CXCL8-CXCR1/CXCR2 の系を標的とした新たな治療が食道扁平上皮癌に対して有効となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2753号	氏名	細野 雅義
論文題目 Title of Dissertation	<p>CXCL8 derived from tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression by promoting migration and invasion of cancer cells</p> <p>腫瘍関連マクロファージおよび食道扁平上皮癌由来の CXCL8 は癌細胞の運動能および浸潤能を亢進し腫瘍進展に寄与する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 林 祥 国</p> <p>副査 Vice-examiner 福本 功</p> <p>副査 Vice-examiner 田中 博</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

要旨

腫瘍と腫瘍微小環境との相互作用が腫瘍の進展を促進することが知られている。腫瘍微小環境の中でマクロファージ(MΦ)は最も多く存在する炎症細胞であり、腫瘍抑制的に働くM1型と腫瘍促進的に働くM2型に分化する。一般的にM2型MΦはIL-10<sup>high</sup>、IL-12<sup>low</sup>の表現型を示すとともに、ヘモグロビンスカベンジャー受容体であるCD163や、クラスAスカベンジャー受容体であるCD204を高発現する。腫瘍微小環境に浸潤したMΦは腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophage)、通称TAMと呼ばれ、M2型MΦと類似した性質を獲得し、腫瘍の浸潤や血管新生の促進などを介して腫瘍の進展に関与している。本研究ではMΦと比較してTAM様MΦで高発現していた遺伝子のうち C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8) に着目し、食道扁平上皮癌の腫瘍微小環境に遊走したTAM由来の CXCL8 が食道扁平上皮癌に及ぼす生物学的メカニズムの解析を行った。

ヒト食道扁平上皮癌細胞株(TE-8、TE-9、TE-15)、ヒト食道扁平上皮細胞株(Het-1A)を用いた。また、ヒト末梢血から単離した CD14<sup>+</sup> 単球に rhM-CSF を作用させて作製した MΦ に TE 細胞株の培養上清を添加して TAM 様 MΦ を作製した。RT-PCR、qRT-PCR、ELISA、western blotting、蛍光免疫染色を用いて TAM 様 MΦ における CXCL8 の発現および分泌、TE 細胞株における CXCL8 受容体である CXCR1、CXCR2 の発現を確認した。rhCXCL8 添加時の TE 細胞株の生存能および増殖能に対する影響を MTS assay、運動能に対する影響を transwell migration assay、浸潤能に対する影響を matrigel invasion assay を用いて検討した。PI3K 阻害薬(LY294002)、MEK1/2 阻害薬(PD98059)、CXCR1、CXCR2 に対する siRNA および中和抗体を用いて rhCXCL8 添加時の TE 細胞株の phenotype の変化を検討した。腫瘍微小環境モデルとして TE 細胞株と TAM 様 MΦ の間接共培養を行い TE 細胞株の運動能および浸潤能を検討した。そこに LY294002、PD98059 および CXCL8、CXCR1、CXCR2 に対する中和抗体を用いて TE 細胞株の phenotype の変化を検討した。

はじめに、qRT-PCR、蛍光免疫染色、ELISA を用いて MΦ と比較して TAM 様 MΦ において CXCL8 の発現および分泌が亢進していることを確認した。次に RT-PCR、western blotting を用いて TE 細胞株に CXCL8 受容体である CXCR1、CXCR2 が発現していることを確認した。

次に細胞内シグナルを検討するために TE 細胞株に rhCXCL8 を添加すると、添加後 10 分をピークとした Akt および Erk1/2 のリン酸化が亢進した。TE 細胞株に rhCXCL8 を添加すると、生存能および増殖能には影響を及ぼさなかったが、運動能・浸潤能を有意に亢進させた。

LY294002 および PD98059 を用いると rhCXCL8 に誘導される運動能および浸潤能の亢進が抑制された。さらに siRNA を用いて TE 細胞株の CXCR1 および CXCR2 をノックダウン行ったところ rhCXCL8 で誘導される TE

細胞の運動能および浸潤能の亢進が抑制された。CXCR1 および CXCR2 の中和抗体を用いると rhCXCL8 で誘導される TE 細胞の運動能および浸潤能は抑制された。

TE 細胞株を TAM 様 MΦ と間接共培養すると TE 細胞株の運動能および浸潤能が有意に亢進した。この共培養系に LY294002、PD98059 および CXCL8、CXCR1、CXCR2 に対する中和抗体を添加すると TAM 様 MΦ に誘導される TE 細胞株の運動能および浸潤能が抑制された。

神戸大学医学部附属病院で切除した食道扁平上皮癌標本を用いて、CXCL8 の免疫組織化学および二重蛍光免疫染色を行った。蛍光二重免疫染色では、癌細胞だけでなく TAM においても CXCL8 の発現が上昇していることを *in vivo* で確認した。CXCL8 の免疫組織化学は正常扁平上皮の発色をコントロールとし、CXCL8 の発現なし、低発現、高発現の 3 グループに分類した。CXCL8 の発現と臨床病理学的因子との関係を検討したところ、食道扁平上皮癌微小環境での CXCL8 の発現は有意にリンパ節転移の有無、CXCR2 の発現程度、CD204 陽性 MΦ の浸潤数と相關した。また食道扁平上皮癌微小環境において CXCL8 が高発現する症例は Disease Free Survival での予後不良と有意に相關した。TAM 由来の CXCL8 が Akt および Erk1/2 のリン酸化を介して TE 細胞株の運動能および浸潤能を亢進することを明らかにした。申請者らは TE 細胞株と TAM との共培養系において、CXCR1、CXCR2、CXCL8 に対する中和抗体を作用させると癌細胞株の運動能・浸潤能が有意に抑制されたことより、食道扁平上皮癌の腫瘍微小環境下において CXCL8-CXCR1/CXCR2 の系が癌細胞の運動・浸潤能に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、CXCR2 は CXCL8 に加え、種々の C-X-C motif chemokine の受容体として働いているため、CXCR2 を標的とすることが癌細胞株の運動能および浸潤能の抑制に対してより効果的であると考えた。また、食道扁平上皮癌切除標本を用いて食道扁平上皮癌および TAM での CXCL8 の高発現がリンパ節転移および予後不良と相關することを明らかとした。一方 CXCR1、CXCR2 の発現は予後とは相關せず、さらなる症例の集積の検討が望ましいと考えられた。

本研究は、TAM 様 MΦ 由来の CXCL8 が CXCL8-CXCR1/CXCR2 の系、Akt および Erk1/2 のリン酸化を介して食道扁平上皮癌細胞株の運動能および浸潤能を有意に亢進することを見出し、その新たな治療応用として CXCL8-CXCR1/CXCR2 の系を標的とした分子標的治療法が食道扁平上皮癌に対して有効となる可能性を示唆し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。