Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-06-17

Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretions of CCL2 and IL6 in the esophageal squamous cell carcinoma

Higashino, Nobuhide

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2019-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7464号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007464

※ 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

Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretions of CCL2 and IL6 in the esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌における fibroblast activation protein 陽性線維芽細胞は CCL2 と IL6 の分泌を介して癌の進展に関与する

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：掛地　吉弘教授、横崎　宏教授）

東野　展英

【背景・目的】

食道癌は世界で 8 番目に多く、癌関連死因の第 6 位である。北米やヨーロッパでは腺癌が多い一方、アフリカや南米、本邦を含むアジアでは扁平上皮癌が多くを占める。食道扁平上皮癌（esophageal squamous cell carcinoma: ESCC）は悪性度が高い癌であり、治癒切除後でも高頻度で再発が見られる。腫瘍微小環境は、様々な非腫瘍性細胞によって構成されており、中でも多数を占める線維芽細胞は、癌関連線維芽細胞（cancer associated fibroblast: CAF）とも呼ばれ、組織固有の線維芽細胞の他、骨髄由来間葉系幹細胞や造血細胞、上皮細胞や内皮細胞等から分化すると考えられている。 CAF の特異的なマーカーは未だ確立されていないが、alpha smooth muscle actin (αSMA) や fibroblast activation protein (FAP) 等が CAF を同定するために用いられている。CAF は直接腫瘍の進展に関わる他、腫瘍関連マクロファージ（tumor associated macrophage: TAM）等と相互作用し、腫瘍促進的に働くことがいくつかの癌で知られている。しかしながら、食道扁平上皮癌において CAF がどのように癌の進展に関わるかについては未だ不明な点が多く、これを明らかにするために以下の研究を行った。

【材料と方法】

70 例の ESCC 切除切片において αSMA、FAP の免疫組織化学を行い、臨床病理学的因子との比較や全生存期間、無病生存期間との相関を検討した。ESCC 細胞株（TE-8、TE-9、TE-15）は理研バイオリソースセンター、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）は ATCC 社から購入した。ヒト末梢血から autoMACS® を用いて単離した CD14 陽性単球に rhM-CSF を作用させてマクロファージ様細胞を作製した。Transwell cell culture insert (0.4 μm pore size filter) の上層に ESCC 細胞株、下層に MSC を播種し、7 日間間接共培養させて CAF 様細胞を作製し、RT-qPCR、western blotting、蛍光免疫染色を用いて CAF 様細胞における αSMA や FAP の発現を確認した。CAF 様細胞が ESCC 細胞やマ

クロファージ様細胞に与える影響を増殖能については MTS assay、遊走能については transwell migration assay を用いて評価した。CAF 様細胞と共培養したマクロファージ様細胞の遺伝子発現変化について、CD163、MSR1（CD204）や IL10 といった M2 マクロファージマーカーや、CD274（PD-L1）の発現を RT-qPCR にて評価した。 cytokine array や ELISA を用いて CAF 様細胞の分泌する液性因子を MSC と比較検討した。CAF 様細胞における FAP を siRNA にて knockdown し、サイトカイン分泌量の変化や ESCC、マクロファージ様細胞への影響の変化、細胞内シグナルの変化を検討した。

統計解析は SPSS Statistics ver. 22 を用いて行った。実験結果の比較解析については、2 群間では two-sided Student's *t*-test を、他群間では Tukey-Kramer test を使用した。臨床病理学的因子と免疫組織化学との関連については χ^2-test を用いて検討した。無病生存期間や全生存期間の生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、log-rank test を用いて比較検討した。予後に対する各因子の関連は Cox proportional hazard regression model を用いて行った。p 値が 0.05 以下を有意差ありと判定した。

【結果】

70 例の ESCC 切除切片において、αSMA および FAP の免疫組織化学を行ったところ、αSMA および FAP の染色強度は腫瘍の深達度や脈管侵襲、TAM の浸潤数と有意に正の相関を示した。さらに FAP を高発現する症例は全生存期間や無再発生存期間とも有意に不良であった。次に、*in vitro* での実験を行った。MSC を TE-8、TE-9 や TE-15 の 3 種類の ESCC 細胞株と間接共培養し、MSC における CAF マーカーの発現について検討したところ、それぞれで FAP の有意な発現誘導を認め、これを CAF 様細胞と定義した。中でも最も強く FAP の発現誘導が見られた TE-9 との間接共培養で作製した CAF 様細胞を CAF9、FAP の発現が弱かった TE-8 との共培養で作成した CAF 様細胞を CAF8 とし、以後の実験に用いた。CAF8、CAF9 は共に ESCC 細胞やマクロファージ様細胞の増

殖能と遊走能を亢進させたが、CAF9 は CAF8 と比較して ESCC 細胞の遊走能やマクロファージ様細胞の増殖能と遊走能を有意に強く促進した。また、CAF9 はマクロファージ様細胞において、CD163、MSR1 や IL10 等の M2 マクロファージマーカーや、CD274 の発現を惹起した。CAF9 は MSC と比較して CCL2、IL6 や CXCL8 を有意に多く分泌しており、このうち CCL2 と IL6 に対する中和抗体を添加すると CAF9 による ESCC 細胞株の遊走能促進効果は抑制された。CAF9 における FAP を siRNA を用いて knockdown すると、共培養した ESCC 細胞やマクロファージ様細胞の遊走能が抑制され、またマクロファージ様細胞における CD163、MSR1 や CD274 の発現を抑制した。また、FAP の knockdown により CAF9 における CCL2、IL6 や CXCL8 の分泌が有意に抑制された。細胞内シグナルについて検討を行ったところ、MSC から CAF9 へ分化することで PTEN/Akt や MEK/Erk シグナルの発現が亢進したのに対し、CAF9 の FAP を knockdown することにより、これらのシグナルが抑制された。これらのシグナルに対する阻害剤を CAF9 に投与すると、サイトカインの分泌量低下を認め、FAP がこれらのシグナルを介してサイトカイン分泌に関わっていると考えられた。

【考察】

癌間質での CAF マーカーの発現は、いくつかの癌で予後因子であることが報告されており、FAP は非小細胞肺癌において不良な予後と相関していた。ESCC においては、Ha らは αSMA、FSP-1 や PDGFR-α を高発現している患者の予後が不良であることを報告している。本研究では、FAP の発現が不良な予後と相関していたが、これらの結果の差は、FAP 高発現群の判定基準が違うことや、本研究では比較的早期の癌が多かったことに因ると考えられる。早期の ESCC では、FAP の発現がより重要であることが示唆された。

In vitro では、ESCC 細胞と共培養することで MSC における FAP の発現誘導が見られ、この FAP 陽性 CAF 様細胞は、CCL2 や IL6、CXCL8 といったサイトカインを分泌

することで、腫瘍の進展を促進する表現型を持っていた。これらのサイトカインは、腫瘍細胞を活性化するのみならず、TAM や骨髄由来免疫抑制細胞等に作用することで、免疫抑制的な微小環境を形成すると報告されている。本研究においても、CAF 様細胞は腫瘍細胞やマクロファージ様細胞を活性化し、M2 マクロファージへの分化を促進しており、これらの報告と合致する結果となった。

CAF や TAM は、それぞれ独立して癌の進展に関わるが、様々な癌でその相互作用が報告されている。これらの報告では、CAF が単球を腫瘍組織に引き入れ、M2 マクロファージへと分化させることが述べられている。本研究では、ESCC 組織中の αSMA や FAP の発現強度が M2 マクロファージの浸潤数と相関しており、蛍光免疫染色でも CAF と M2 マクロファージの共存が確認できた。さらに、*in vitro* では CAF 様細胞はマクロファージ様細胞の増殖、遊走を促進し、M2 マクロファージへの分化を誘導した。これらより、CAF は TAM との相互作用において中心的な役割を担っていると考えられた。

また、本研究では CAF における FAP 発現の重要性が示された。FAP は CAF のマーカーとなるだけではなく、線維芽細胞や腫瘍細胞での発現が腫瘍の進展にかかわるといった報告がみられ、本研究でも FAP が PTEN/Akt や MEK/Erk シグナルを介して β-catenin や NF-κB を活性化し、サイトカインの分泌を促進していた。FAP からこれらのシグナルにつながる詳細な機構は不明であるが、線維芽細胞において β-catenin や NF-κB がサイトカインの分泌に関わるといった報告は見られており、本研究の結果と一致していた。

【結論】

ESCC における FAP 陽性 CAF が腫瘍の進展を促進し、免疫を抑制する機構を明らかにした。FAP は ESCC における予後予測因子として有用であり、抗腫瘍療法の特異的な標的となる可能性が示唆された。