Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Metallothionein 2A Expression in Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression

清水，将来

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2022-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8305号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008305

※ 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

Metallothionein 2A Expression in Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression

癌関連線維芽細胞および癌細胞で発現する Metallothionein 2A は食道扁平上皮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：横崎　宏　教授，掛地　吉弘　教授）

清水　将来

【背景・目的】

食道癌による死亡数は 2020 年の統計では世界で年間 500,000 人を超え、がんによる死亡原因の第 6 位に位置している。食道癌は食道扁平上皮癌（ESCC）と食道腺癌（EAC）の二つの組織型に分類され、北米や欧州では EAC が多く見られるが、世界的にみると ESCC が食道癌の 90%を占める。食道は粘膜下層に豊富な網状リンパ管が存在し、漿膜を欠くため、比較的早期の症例でもリンパ節転移を高頻度に認め、進行した症例では大動脈、気管、心嚢など主要隣接臓器に浸潤しやすい。これらの組織学的、解剖学的理由により食道癌は難治性であり、それゆえにその進展機構を解明することは重要である。

癌微小環境中の線維芽細胞は癌関連線維芽細胞（CAF）と呼ばれ、種々の癌に対して促進的な役割を果たすことが知られている。申請者の研究室では ESCC 組織において CAF マーカーの一つである FAP の発現量が不良な予後と相関することを報告し、また CAF の起源の一つである骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を ESCC 細胞と間接共培養することで FAP の発現が亢進することを確認し、これを CAF 様細胞と定義した。さらに MSC と CAF 様細胞との間で cDNA マイクロアレイ解析を施行し、CAF 様細胞において発現、分泌が亢進する IL-6、CCL2、PAI-1 が ESCC 細胞の悪性形質を促進することを示した。本研究では ESCC 微小環境における CAF の役割をさらに解明するために、上記の cDNA マイクロアレイ解析の結果を検証し CAF 様細胞において最も発現が亢進していた metallothionein2A (MT2A)の機能解析を行うことにした。

【材料と方法】

ヒト ESCC 細胞（TE-8、TE-9、TE-10、TE-11、TE-15）は理研バイオリソースセンター、ヒト骨髄由来 MSC は ATCC から購入した。Transwell cell culture insert（0.4 μm pore size filter, BD Biosciences）の上層に ESCC 細胞を下層に MSC を播種し、7 日間間接共培養させ、qRT-PCR、western blotting を用いて FAP の発現を確認した。ESCC 細胞株の増殖能については MTS assay、運動能は transwell migration assay、浸潤能は Corning BioCoatTM Matrigel Invasion Chamber（Corning）を用いて評価した。Human IGFBP-2 Quantikine ELISA Kit（R&D Systems）を用いて CAF 様細胞の分泌する IGFBP2 を測定した。CAF 様細胞および ESCC 細胞の MT2A ノックダウンには siRNA targeting human MT2A（Santa Cruz）を用いた。69 例の ESCC 切除標本について MT2A の免疫組織化学を Leica Bond-Max automation と Leica Refine Detection kit (Leica Biosystems)を用いて行い、癌間質、癌胞巣における発現強度をスコアリングし、臨床病理学的因子との比較検討を行った。予後の検討には Kaplan-Meier 法を用いた。

【結果】

MSC と 3 種類の ESCC 細胞（TE-8、TE-9、TE-15）を間接共培養し、CAF マーカーである FAP が高発現していることを確認した上で、これらの細胞を CAF 様細胞（CAF8、CAF9、CAF15）として以下の実験に用いた。単独培養した MSC と CAF 様細胞との間で行なった cDNA マイクロアレイ解析において CAF 様細胞で高発現することを見出した MT2A が、CAF 様細胞において mRNA レベルやタンパク質レベルで発現が亢進していることを確認した。CAF 様細胞における MT2A の機能を解析するために、siRNA を用いて CAF 様細胞の MT2A 発現を抑制し、CAF 様細胞から分泌

される液性因子への影響をサイトカインアレイによって確認した。MT2A の発現変化によって影響を受けるサイトカインとして insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)を見出した。IGFBP2 は MSC と比べて 3 種類の CAF 様細胞において発現、分泌が亢進し、MT2A を発現抑制した CAF 様細胞では発現、分泌が低下することを確認した。CAF 様細胞から分泌される液性因子の ESCC 細胞に対する影響を調べるため、CAF 様細胞と ESCC 細胞を間接共培養し、ESCC 細胞株の運動能、浸潤能を調べた。CAF 様細胞と共培養した ESCC 細胞では運動能、浸潤能が亢進し、そこに IGFBP2 の中和抗体を添加すると CAF 様細胞との共培養によって亢進した ESCC 細胞の運動能、浸潤能は抑制された。また IGFBP2 の ESCC 細胞への影響を検討するため recombinant human IGFBP2 protein (rhIGFBP2)を ESCC 細胞に添加すると、Akt、Erk、NFκB 経路の活性化を介して運動能、浸潤能を亢進させた。さらに Akt、Erk、NFκB の阻害剤を添加すると rhIGFBP2 の添加により亢進した運動能、浸潤能が抑制された。

次に ESCC 細胞における MT2A の役割を明らかにするために MT2A が高発現していた 2 種類の ESCC 細胞(TE-10、TE-11)において MT2A の発現をノックダウンしたところ、細胞形態は円形で密な増殖様式に変化し、さらに運動能、浸潤能、増殖能の低下を認めた。一方、MT2A をノックダウンした ESCC 細胞では細胞間接着分子 E-cadherin の発現上昇を認め、その下流のシグナル伝達分子であるβ-catenin の転写活性の不活化に関与するリン酸化の亢進を認めた。さらに蛍光抗体法では MT2A ノックダウン ESCC 細胞において E-cadherin の細胞膜上での発現とβ-catenin の共局在を認めた。

最後に 69 例の ESCC 手術検体に対し MT2A の免疫組織化学を行い、癌間質、癌胞巣における MT2A の発現強度を低発現と高発現の 2 群に分け、臨床病理学的因子との関連を検討した。癌間質における MT2A 高発現は壁深達度($p = 0.001$)、リンパ管侵襲($p < 0.001$)、脈管侵襲($p = 0.008$)、リンパ節転移($p = 0.031$)、病期($p = 0.031$)、αSMA($p < 0.001$)や FAP($p < 0.001$)の発現強度、CD163 陽性($p = 0.004$)や CD204 陽性($p < 0.001$)マクロファージの浸潤数と有意に相関を認めた。また癌胞巣における MT2A の高発現は壁深達度と相関する傾向を認めた($p = 0.07$)。また Kaplan-Meier 解析では癌間質における MT2A 高発現は全生存期間において有意に不良な予後($p = 0.046$)を示し、無病生存率においてもその傾向を認めた($p = 0.066$)。また癌胞巣における MT2A 高発現は癌特異的生存率において有意に不良な予後($p = 0.015$)を示した。

【考察】

MT2A は分子量約 6kDa の低分子タンパク質で、豊富なチオール基を有することで必須微量元素の恒常性維持や亜鉛などの重金属と結合することで解毒の役割があると考えられている。癌における MT2A の役割は不明な点も多く、本研究は ESCC 微小環境における CAF や癌細胞で発現する MT2A の役割についての最初の報告である。

本研究では CAF における MT2A が IGFBP2 の発現、分泌を調整していることを明らかにした。MT2A は NFκB などの転写因子の活性を調整するという報告があり、何らかの転写因子を介して IGFBP2 の発現、分泌を調整している可能性が考えられた。また本研究において IGFBP2 の受容体は特定できなかったが、IGFBP2 は他癌種においてはインテグリンや EGFR と結合することで腫瘍を促進すると報告されている。

E-cadherin の発現は zinc finger E-box binding homeobox (ZEB)によって抑制されており、MT2A は亜鉛供給体として働くことで zinc finger 蛋白質を介した E-cadherin の発現調整を行なっている可能性がある。また E-cadherin は細胞質においてβ-catenin と結合することで細胞接着をより強固にしているが、E-cadherin と結合していない細胞質のβ-catenin は Wnt 存在下で核内移行し転写因子として働き、Wnt 非存在下では 45 番目のセリンなどのいくつかの部位でリン酸化を受けた後に分解される。本研究では MT2A をノックダウンした ESCC 細胞で E-cadherin とβ-catenin の発現増加と細胞膜上での共局在を認めたことから、高発現した E-cadherin によりβ-catenin が捕捉されることによって転写活性が抑制され、腫瘍細胞の悪性形質が抑制されたと考えた。以上から ESCC における MT2A の高発現は E-cadherin/β-catenin 経路を介して腫瘍進展に関与していることが示唆された。

【結論】

本研究では癌胞巣と癌間質における MT2A の高発現が腫瘍進展に寄与することを明らかにした。MT2A は CAF においては IGFBP2 の発現、分泌を調整することで、ESCC においては E-cadherin/β-catenin 経路を介して腫瘍促進的に働くことが示され、MT2A と IGFBP2 は ESCC の新規治療標的となりうると考えられた。(3891 文字)

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 3156 号	氏 名	清水 将来
論文題目 Title of Dissertation	Metallothionein 2A Expression in Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression 癌関連線維芽細胞および癌細胞で発現する Metallothionein 2A は食道扁平上皮癌の進展に関与する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 福本 巧 副 査 Vice-examiner 児玉 良典 副 査 Vice-examiner 佐々木 良平		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

〔背景・目的〕

癌微小環境において癌関連線維芽細胞（CAF）は腫瘍促進的な役割を果たすことが知られている。申請者の研究室では食道扁平上皮癌（ESCC）組織において CAF マーカーである FAP の発現量が不良な予後と相関することを示した。また骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を用いた CAF 様細胞の作成法を確立し、CAF 様細胞において発現が亢進する IL-6、CCL2、PAI-1 が ESCC 細胞の悪性形質を促進することを示した。本研究では ESCC 微小環境における CAF の役割をさらに解明するために、MSC と CAF 様細胞との間で cDNA マイクロアレイ解析を行い CAF 様細胞において最も発現が亢進していた metallothionein2A (MT2A)の機能解析を行った。

〔方法〕

研究に使用した細胞は ESCC 細胞として TE-8、TE-9、TE-10、TE-11、TE-15 と MSC である。Transwell cell culture insert の上層に TE-8、TE-9、TE-15 を下層に MSC を播種し、7 日間間接共培養した。共培養 MSC における FAP の発現上昇を qRT-PCR、western blotting を用いて確認し、これらの細胞を CAF 様細胞（CAF8、CAF9、CAF15）と定義した。ESCC 細胞の増殖能については MTS assay、運動能は transwell migration assay、浸潤能は Corning BioCoatTM Matrigel Invasion Chamber を用いて評価した。Human IGFBP-2 Quantikine ELISA Kit を用いて CAF 様細胞の分泌する IGFBP2 を測定した。CAF 様細胞および ESCC 細胞の MT2A ノックダウンには siRNA targeting human MT2A を用いた。69 例の ESCC 切除標本について MT2A の免疫組織化学を行い、癌間質、癌胞巣における発現強度をスコアリングし2群にわけ、臨床病理学的因子との相関を解析した。Kaplan-Meier 法にて予後を検討した。

〔結果〕

MT2A の CAF 様細胞における機能解析のため、siRNA を用いて CAF 様細胞の MT2A 発現を抑制し、CAF 様細胞から分泌される液性因子への影響を antibody array によって確認した。MT2A の発現変化に影響を受ける液性因子として insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)を見出した。CAF 様細胞から分泌される液性因子の ESCC 細胞に対する影響を調べるため、CAF 様細胞と ESCC 細胞を共培養し運動能、浸潤能を調べたところ、共培養した ESCC 細胞では運動能、浸潤能が亢進し、そこに IGFBP2 の中和抗体を添加すると亢進した運動能、浸潤能は抑制された。また recombinant human IGFBP2 を ESCC 細胞に添加すると Akt、Erk、NFκB 経路の活性化を介して運動能、浸潤能を亢進させ、そこに各種シグナルの阻害剤を添加すると亢進した運動能、浸潤能が抑制された。

次に ESCC 細胞における MT2A の機能を解析するため、MT2A 高発現株 TE-10、TE-11 の MT2A をノックダウンしたところ、細胞形態は円形で密な増殖様式に変化した。さらに運動能、浸潤能、増殖能の低下を認め、細胞間接着分子 E-cadherin の発現上昇とその下流のシグナル伝達分子である β-catenin の不活化を認めた。蛍光抗体法では MT2A ノックダウン ESCC 細胞において E-cadherin の細胞膜上での発現と β-catenin の共局在を認めた。

最後にESCC手術検体を用いて臨床病理学的因子との関連を検討した。癌間質におけるMT2A高発現は壁深達度、リンパ管侵襲、脈管侵襲、リンパ節転移、病期、αSMAやFAPの発現強度、CD163、CD204陽性マクロファージの浸潤数と有意に相関を認め、癌胞巣においては壁深達度と相関傾向を認めた。またKaplan-Meier解析では癌間質におけるMT2A高発現症例は全生存期間において有意に予後不良で、無病生存率においてもその傾向を認めた。また癌胞巣でMT2Aを高発現する症例には癌特異的生存率の予後が有意に不良であった。

〔総括〕

本研究はESCC微小環境におけるCAFや癌細胞で発現するMT2Aについて、その機能を研究したものである。MT2AはCAFにおいてはIGFBP2の発現、分泌を調整することで、ESCCにおいてはE-cadherin/β-catenin経路を介して腫瘍促進的に働くことを示した重要な知見であり、またMT2AとIGFBP2はESCCの新規治療標的となりうる点で価値ある業績であると認める。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。