

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09000

研究課題名（和文）CD40陽性食道扁平上皮癌と血小板の液性因子相互パラクリンによる癌増悪機序の解明

研究課題名（英文）Research on the mutual paracrine effect by MMP-9 and sCD154 between CD40 positive ESCC cells and platelets

研究代表者

佐々木 勝則（Sasaki, Katsunori）

北海道大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：60336394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、CD40陽性食道扁平上皮癌（ESCC）が産生するMMP-9が腫瘍周囲の細胞外マトリックスを消化する作用のみならず、活性化血小板に作用し、CD154のsheddingに寄与することで、CD154とMMP-9が介在するmutual paracrine effectによる癌悪性のスパイラル・モデルを明らかにした。CD40陽性ESCC細胞株をrhCD154あるいは活性化血小板で刺激すると、MMP-9 mRNAおよびタンパク質ともに有意に増大した。一方、MMP-9を含むESCC細胞株培養上清を活性化した血小板に添加すると、血小板からのshedding sCD154量が増大した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの癌種でCD40の発現が確認され、そのリガンドであるCD154の刺激により癌が増悪するといわれている。本研究では、CD40陽性食道扁平上皮癌（ESCC）が産生するMMP-9の新たな作用部位・標的としてCD154の産生源である血小板を挙げ、CD154/MMP-9液性因子を介したmutual paracrine effectによるCD40陽性ESCCと血小板との増悪メカニズムを提唱し、その解明に努めてきた。得られた癌悪性のスパイラル・モデルは他のCD40陽性癌に対しても普遍的に適用できるものであり、多くのCD40陽性難治性癌に対する新たな治療法開発に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：Cluster of Differentiation 40 (CD40) is a costimulatory molecule expressed in antigen presenting cells and plays an important role in the immune system. Recently, it is reported that CD40 expression on Esophageal cancer (EC) cells correlates poor prognosis, however, the role of CD40 expression in EC is still unclear. We analyzed the molecular function of CD40 in EC cell lines and examined the mechanism contributing to cancer cell biology. Additionally, we focused and evaluated the relationship of platelet and CD40 positive EC cells, since activated platelets are closely associated with cancer cell proliferation in the tumor microenvironment and are involved in CD154 (CD40 ligand) secretion. The MMP-9 derived from EC cells increased CD154 cleavage from activated platelet. Furthermore, platelet-derived soluble CD154 increased MMP-9 secretion in EC cells. Mechanism of cancer invasion by contribution of platelets to EC has the potential to be a new therapeutic target for EC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：CD40 CD154 MMP-9 食道がん 血小板

1. 研究開始当初の背景

食道がんが転移・再発を起こしやすい癌種である理由の一つに上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition; EMT) メカニズムが存在する。EMT 関連分子の中でも、周囲の基質を分解する基質メタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) の発現に着目した研究によると、1) 食道扁平上皮癌 (ESCC) の浸潤最先端部における MMP-9 発現が強陽性であること、2) ESCC 患者の術後無病生存期間に MMP-9 発現が有意に係わっていること、3) ESCC 患者の血清 MMP-9 濃度が癌の臨床ステージおよび腫瘍サイズに連動していることなどの報告があり、癌の悪性と MMP-9 との関係が示唆されてきた。近年、MMP-9 に対する中和抗体を用いた癌治療が有望視されているが、未治療の胃癌もしくは食道胃接合部癌に対し、mFOLFOX6 に抗 MMP-9 抗体である andecapiximab を併用しても、mFOLFOX6 に比べて全生存期間 (OS) は改善されないことがランダム化二重盲検多施設共同フェーズ 3 試験 GAMMA-1 で明らかになった。そこで、ESCC における MMP-9 の産生機序に視点を変えてみたところ、他癌種の研究ではあるが、CD40 陽性子宮頸癌細胞を CD40 リガンド (以下 CD154) で刺激すると MMP-9 の発現が誘導されることを報告している。これらの事象から、ESCC における MMP-9 産生にも CD40-CD154 interaction が関与していることが予想される。食道がんを対象とした研究によると、ESCC の CD40 陽性率は 36.9% であり、悪性度が高いステージ III/IV の CD40 陽性 ESCC 患者の OS が CD40 陰性 ESCC 患者の OS に比べて有意に短かった。この結果から、CD40 陽性 ESCC 患者の予後不良の要因として CD154 刺激による MMP-9 産生が示唆される。

2. 研究の目的

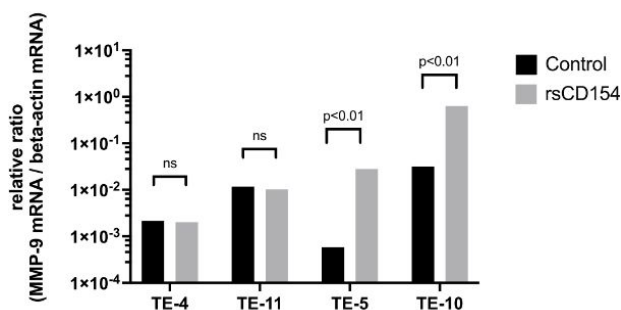
CD40 陽性 ESCC 細胞と血小板との間を液性因子、sCD154 と MMP-9 が介在する mutual paracrine effect による癌の悪性化メカニズムを解明する。

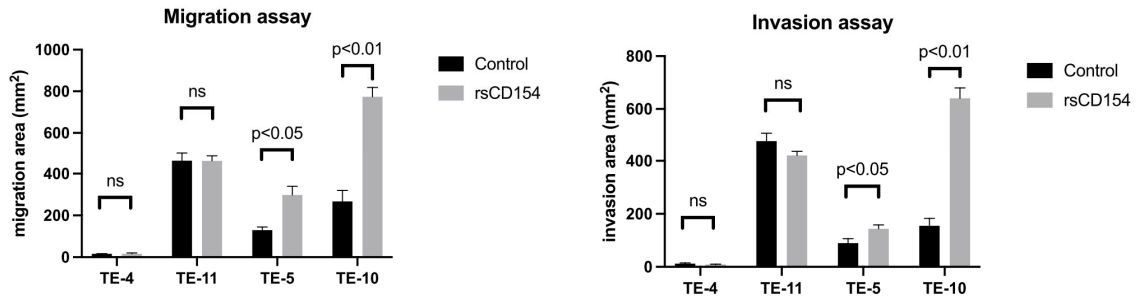
3. 研究の方法

[1] CD40 陽性 ESCC 細胞株 (TE-5、TE-10) CD40 陰性 ESCC 細胞株 (TE-4、TE-11) および活性化血小板を用いて以下の *in vitro* 実験を実施する。[1] sCD154 刺激による MMP-9 産生増大を示す。sCD154 刺激 48 時間後の細胞から total RNA を精製し、TaqMan Gene Expression Assay にて MMP-9 mRNA を定量する。同時に培養上清を回収し、ELISA (Human CD40 Ligand /TNFSF5 Quantikine ELISA Kit, R&D systems) にて MMP-9 蛋白の分泌量を定量する。[2] sCD154 刺激による機能促進を示す。Transwell insert (8.0 μ m pore) を使用し、sCD154 刺激による遊走細胞数の変化を示す。さらに、Matrigel invasion chamber (Corning BioCoat) を用い浸潤細胞数の変化を示す。[3] MMP-9 タンパク質の血小板への直接作用を示す。分離した血小板を Thrombin にて活性化した後、有機水銀化合物 APMA (proMMP-9 を活性化する) 処理した ESCC 細胞株の培養上清を添加し、血小板由来 sCD154 量を ELISA にて示す。[4] sCD154 産生源である血小板の作用を示す。Recombinant human soluble CD154 に代わり、血小板を活性化し Transwell insert (0.4 μ m pore) を介して ESCC 細胞と共培養し、ESCC 細胞の MMP-9 産生増大を示す。

4. 研究成果

[1] sCD154 刺激 24 時間後の MMP-9 mRNA 量の変化は、CD40 陽性株 TE-5 で 45 倍、TE-10 で 20 倍とそれぞれ有意に増大した。一方、培養上清中に分泌された MMP-9 protein の変化は、もともと検出限界未満だった CD40 陽性株 TE-5 において検出可能となり、TE-10 では 6 倍と有意に増加した。[2] sCD154 刺激による細胞増殖能には変化はなかったが、CD40 陽性株 TE-5 の遊走能、浸潤能はそれぞれ 2.4 倍、1.5 倍増強した。同じく TE-10 の遊走能、浸潤能はそれぞれ 3.0 倍、4.3 倍と増強した。CD40 陰性株 TE-4 および TE-11 は sCD154 刺激による MMP-9 mRNA および protein の量的変化ならびに遊走能、浸潤能の機能には影響しなかった。

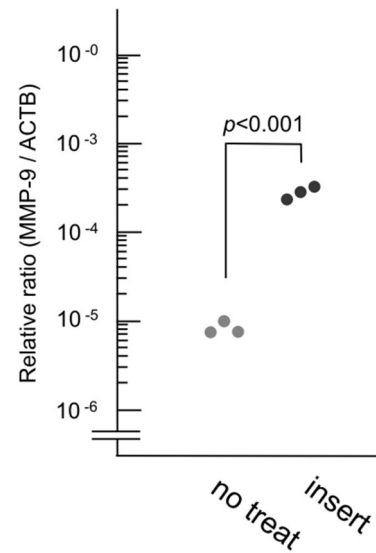




[3] CD40 陽性株 TE-10 の培養上清を thrombin で活性化した血小板に添加し、血小板の培養上清中に shedding される sCD154 量を ELISA 法にて定量した。結果、MMP-9 未刺激の状態でも活性化血小板の培養上清中には 275pg/ml の sCD154 が shedding されたのに対して、MMP-9 活性化処理を施した TE-10 細胞培養上清を添加した活性化血小板の培養上清中の sCD154 量は 725pg/ml と、MMP-9 未刺激の系の 2.6 倍量の shedding 量増加を認めた。

[4] 活性化血小板 (sCD154 産生源) を Transwell insert (0.4 μm pore) を介して TE-5 細胞と共培養した後、TE-5 細胞の MMP-9 mRNA 産生量を RP-qPCR で定量した。結果、未刺激状態の MMP-9 mRNA 量に対して血小板刺激でその発現量が 32 倍に増大した。

これらの結果は、CD40 陽性食道がんの悪性化メカニズムとして、がん細胞が産生する MMP-9 と血小板が産生する sCD154 とが mutual paracrine effect により癌の悪性化に関与していることを解明することができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平野 聡 (Hirano Satoshi) (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	七戸 俊明 (Shichinohe Toshiaki) (70374353)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	土川 貴裕 (Tsuchikawa Takahiro) (50507572)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	中村 透 (Nakamura Toru) (70645796)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関