

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21159

研究課題名(和文) マクロファージとの相互作用に着目した食道上皮内腫瘍の新規診断・治療標的の探索

研究課題名(英文) Search for new diagnostic and therapeutic targets in esophageal intraepithelial neoplasia: the role of interaction between macrophages and esophageal squamous epithelial cells in carcinogenesis

研究代表者

狛 雄一郎 (Koma, Yuichiro)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：40714647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌の前癌病変内にはマクロファージ(M ϕ)が浸潤している。発癌初期段階におけるM ϕ の役割を解析するため、ヒト食道扁平上皮細胞株Het-1AとM ϕ 様細胞との共培養系を確立した。単独培養後のHet-1Aと共培養後のHet-1Aとの間でcDNAマイクロアレイ解析を施行し、後者においてCSF3/G-CSFが高発現している事を見出した。リコンビナントCSF3/G-CSFをHet-1Aに添加すると運動能の亢進およびGSK-3 β と β -カテニンのリン酸化が確認された。以上からM ϕ と食道上皮細胞との相互作用によるCSF3/G-CSFの発現・分泌亢進が食道の発癌初期段階に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We observed that infiltrating macrophages (M ϕ s) were upregulated in esophageal precancerous lesions. Based on these findings, we established a coculture assay using human esophageal epithelial cells (Het-1A) and human acute monocytic leukemia cells (THP-1)-derived M ϕ s to study the roles of M ϕ s in esophageal carcinogenesis. In this study, we performed cDNA microarray analysis between monocultured Het-1A and co-cultured Het-1A with THP-1-derived M ϕ s, and found that CSF3/G-CSF expression was upregulated in Het-1A under co-culture conditions. Het-1A was found to express G-CSF receptors. Recombinant human CSF3/G-CSF (rhCSF3/G-CSF) induced cell migration and modulated GSK-3 β / β -catenin signaling in Het-1A. Moreover, phospho- β -catenin (Ser675) expression levels were increased, and translocation of this protein from the cytoplasm to the nucleus was induced by rhCSF3/G-CSF. These results indicate that CSF3/G-CSF signaling may contribute to early esophageal carcinogenesis.

研究分野：人体病理学

キーワード：食道扁平上皮癌 食道上皮内腫瘍 マクロファージ 癌・間質相互作用 発癌初期段階

1. 研究開始当初の背景

癌微小環境中の腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) は癌細胞の増殖能・運動能・浸潤能などを促進し、種々の癌の悪性化に関与する。我々は食道扁平上皮癌組織において TAM の浸潤数が多い症例ほど予後不良である事を明らかにし、TAM から分泌される分子 CYR61 と GDF15 がそれぞれ TAM の遊走能および食道扁平上皮癌細胞の増殖能・浸潤能を亢進させる事を報告した。

一方、発癌初期段階においてもマクロファージなどの炎症細胞が腫瘍発生に関与する事が言われ始めており、この段階でマクロファージとの相互作用を媒介する分子メカニズムを解明する事は発癌予防法につながる事と期待されるが、この点に着目した研究は少ない。先行研究では、食道扁平上皮癌の前癌病変に相当する食道上皮内腫瘍の段階で既にマクロファージが浸潤している事を見出している。食道扁平上皮癌の発癌初期段階におけるマクロファージの意義を検討するため、ヒト食道正常扁平上皮細胞株 Het-1A と *in vitro* でマクロファージ様に分化させたヒト単球性白血病細胞株 THP-1 との transwell を用いた間接共培養系を確立した。THP-1 由来マクロファージとの間接共培養によって Het-1A の増殖能は亢進し、これは Het-1A における p38 MAP キナーゼおよび STAT3 の活性化を介している事を明らかにした。また、間接共培養上清中にはインターロイキン 6 (IL-6) の分泌が亢進している事を見出した。さらには、リン酸化 p38 MAP キナーゼ、リン酸化 STAT3、IL-6 は食道上皮内腫瘍組織の一部において発現している事を確認できた。

2. 研究の目的

上記先行研究の中で確立した Het-1A と THP-1 由来マクロファージとの間接共培養系から得られた成果は、実際のヒト腫瘍組織においても免疫組織化学によって発現亢進を確認できた。以上から、この間接共培養系を用いて食道扁平上皮癌の発癌初期段階に関与する重要分子をさらに発見する事ができるのではないかと考えた。本研究によって食道扁平上皮癌の発癌初期段階におけるマクロファージの役割を明らかにし、マクロファージによって活性化される分子を標的とした新規の発癌予防法や診断法の開発に貢献したい。

3. 研究の方法

ヒト食道正常扁平上皮細胞株として Het-1A、マクロファージとして THP-1 に TPA を 2 日間処理する事によって作製した THP-1 由来マクロファージとヒト末梢血から自動細胞分離装置 (autoMACS pro) で分離した健康成人末梢血由来単核細胞 (PBMo) に M-CSF を 6 日間処理する事によって作製した PBMo 由来マクロファージの二つの異なるマクロファージモデルを使用する。Transwell (0.4 μ m pore) の上層に播種した THP-1 由来マクロファージある

いは PBMo 由来マクロファージと、24-well もしくは 6-well プレートの下層に播種した Het-1A を growth factor 非存在下で 2 日間間接共培養する。また、それぞれの細胞を growth factor 非存在下で 2 日間単独培養したものを比較対照とする。

「単独培養の Het-1A」と「THP-1 由来マクロファージと間接共培養した Het-1A」との間で cDNA マイクロアレイ解析を施行し、後者で発現上昇する遺伝子を網羅的に抽出する。mRNA レベルの発現上昇を定量的 RT-PCR、タンパク質レベルの発現上昇を ELISA もしくは western blotting で確認する。また、PBMo 由来マクロファージと間接共培養した Het-1A でも上記で発現上昇を確認した mRNA の発現レベルを定量的 RT-PCR で検討する。

発現上昇を確認できた分子の Het-1A の腫瘍性格に対する影響を検討する。具体的には、増殖能を MTS proliferation assay、運動能を transwell migration assay、造腫瘍能を colony formation assay で解析する。また、Het-1A におけるシグナル伝達経路を phospho-kinase array で解析し、活性化される経路を western blotting や蛍光免疫染色で確認する。

4. 研究成果

「単独培養の Het-1A」と「THP-1 由来マクロファージと間接共培養した Het-1A」との間で施行した cDNA マイクロアレイ解析の結果、間接共培養後の Het-1A において log2 ratio で 2 倍以上の発現上昇の見られた遺伝子は 806 個あり、この中には先行研究で見出した *IL-6* mRNA も含まれており、cDNA マイクロアレイ解析結果の妥当性を裏付けるものとなった。この他に発現上昇していた遺伝子の中には、サイトカイン・ケモカイン系 (*IL-8*, *IL-1B*, *IL-11*, *CCL2*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*)、コロニー刺激因子 (*CSF3*)、マトリックスメタプロテアーゼ系 (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, *MMP13*)、腫瘍関連遺伝子 (*ALK*, *ROS1*, *SCC*) などが含まれており、これらの一部については定量的 RT-PCR によって mRNA レベルでの発現上昇を確認できた (図 1)。

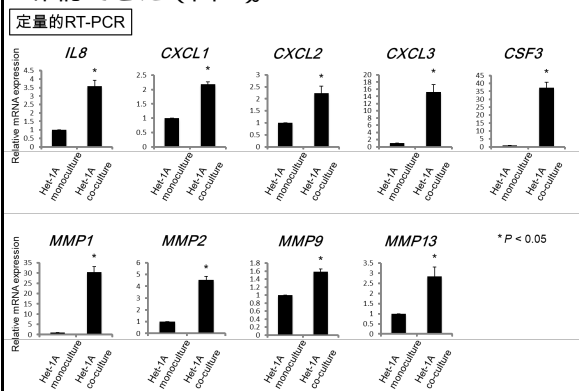


図1. 「単独培養のHet-1A」と「THP-1由来マクロファージと間接共培養したHet-1A」との間で施行した定量的RT-PCR。

次に、「単独培養の Het-1A」と「PBMo 由来マクロファージと間接共培養した Het-1A」から mRNA を抽出し、上記 mRNA の発現を定量的

RT-PCR で検討したところ、*CXCL3*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP13*, *CSF3* mRNA の発現上昇を確認できた。二つの異なるマクロファージモデルを用いた間接共培養系に共通して発現上昇の見られた遺伝子は重要な機能を有している可能性が高いと考えられた。

次に、「単独培養の Het-1A」、「単独培養の THP-1 由来マクロファージ」、「THP-1 由来マクロファージと Het-1A との間接共培養」から培養上清を回収し、*MMP1*, *MMP2*, *MMP13*, *CSF3* の ELISA を施行したところ、*MMP2* と *CSF3* に関しては間接共培養上清中に分泌亢進を確認できた (図 2)。

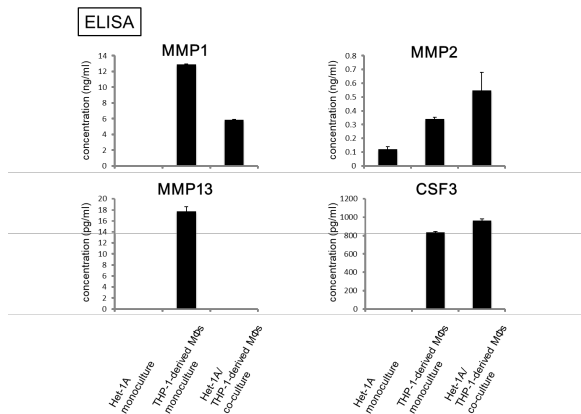


図2. 「単独培養の Het-1A」、「単独培養の THP-1 由来マクロファージ」、「THP-1 由来マクロファージと Het-1A との間接共培養」から回収した培養上清を用いた ELISA。

本研究では、食道扁平上皮癌の発癌初期段階での解析の報告が無い *CSF3* に着目して研究を展開した。*CSF3* は colony-stimulating factor 3 の略で、*G-CSF* と呼ばれ、受容体として *G-CSF receptor* が知られている。*CSF3/G-CSF* は、血液細胞のうち顆粒球系の増殖・分化を促進する液性因子であるが、血液細胞に対する作用に加えていくつかの上皮系腫瘍においては腫瘍発生に關与する事が報告されている。まず、Het-1A が *G-CSF receptor* を発現している事を RT-PCR、western blotting、蛍光免疫染色で確認した。次に、recombinant *CSF3/G-CSF* を Het-1A に添加した時の増殖能を MTS proliferation assay、運動能を transwell migration assay にて検討したところ、増殖能に対する影響は見られなかったが、運動能は 50 ng/ml の濃度で添加すると有意に亢進した (図 3)。

Transwell migration assay of Het-1A

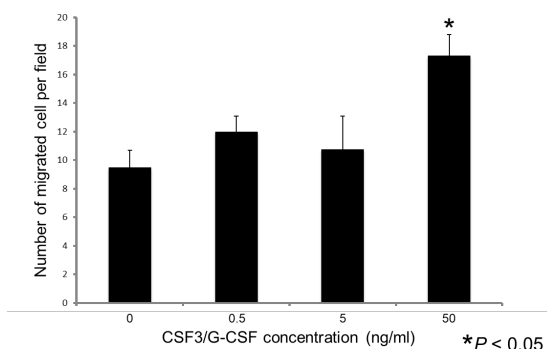


図3. recombinant *CSF3/G-CSF* を添加した時の Het-1A の運動能。

さらに、recombinant *CSF3/G-CSF* を作用させた Het-1A で活性化されるシグナル伝達経路を調べるために phospho-kinase array を行ったところ、recombinant *CSF3/G-CSF* の添加前に比べて添加後では *GSK-3 /* のリン酸化のスポットが亢進していた。この結果を western blotting で検討したところ、recombinant *CSF3/G-CSF* 添加後の Het-1A において *GSK-3 /* の抑制性のリン酸化 (*Ser21/Ser9* 残基) が誘導され、これに伴い下流の β -catenin の促進性のリン酸化 (*Ser675*) の亢進を確認できた (図 4)。 β -catenin は転写促進因子として機能するため、活性化状態で核内移行する事が知られており、細胞質分画と核分画に分けて western blotting を行うと、recombinant *CSF3/G-CSF* の添加によって核分画に存在するリン酸化 β -catenin の量が増加した。蛍光免疫染色でも recombinant *CSF3/G-CSF* の添加によって核内移行を確認できた。

Western blotting

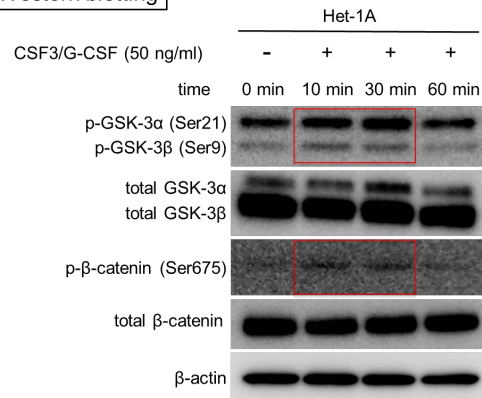


図4. recombinant *CSF3/G-CSF* を添加した時に Het-1A において変化するシグナル伝達経路。

この他、THP-1 由来マクロファージと間接共培養したヒト前立腺正常上皮細胞株は液性因子を介して造腫瘍能が誘導されたという報告があるため、本研究では Het-1A と THP-1 由来マクロファージとの間接共培養上清を回収し、Het-1A を間接共培養上清中で 1~2 か月の長期間培養し、colony formation assay で *in vitro* において造腫瘍能を評価した。間接共培養上清で長期間培養した Het-1A は、通常培養条件の Het-1A と比べて造腫瘍能の亢進は見られなかった。

以上から、食道扁平上皮細胞とマクロファージとの相互作用によって *CSF3/G-CSF* の発現・分泌が亢進し、これが食道扁平上皮細胞に作用して *GSK-3 /* と β -catenin のリン酸化状態の制御ならびに運動能を亢進させることを明らかにした (図 5)。これらの現象が食道扁平上皮癌の発癌初期段階に關与している可能性が示唆された。

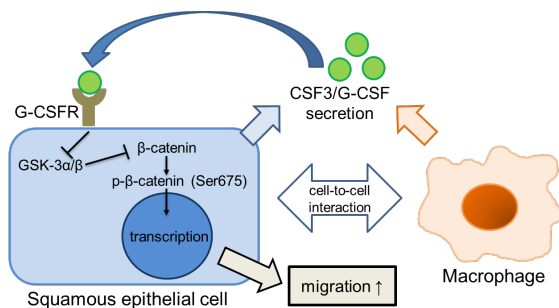


図5. 食道扁平上皮細胞とマクロファージとの相互作用によって発現誘導されるCSF3/G-CSFの作用機序モデル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Yokozaki H, Koma Y, Shigeoka M, Nishio M. Cancer as a tissue: The significance of cancer-stromal interactions in the development, morphogenesis and progression of human upper digestive tract cancer. *Pathol Int.* 2018;68(6):334-352. 査読有.
doi: 10.1111/pin.12674.

Hosono M, Koma Y, Takase N, Urakawa N, Higashino N, Suemune K, Kodaira H, Nishio M, Shigeoka M, Kakeji Y, Yokozaki H. CXCL8 derived from tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression by promoting migration and invasion of cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(62):106071-106088. 査読有.
doi: 10.18632/oncotarget.22526.

狛 雄一朗, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. 食道扁平上皮癌の進展や発がん初期段階におけるマクロファージの解析. 別冊 *BIO Clinica 消化管の慢性炎症* 2017;6巻:123-127. 査読有.

Takase N, Yamashita K, Sumi Y, Hasegawa H, Yamamoto M, Kanaji S, Matsuda Y, Matsuda T, Oshikiri T, Nakamura T, Suzuki S, Koma Y, Komatsu M, Sasaki R, Kakeji Y. Local advanced rectal cancer perforation in the midst of preoperative chemoradiotherapy: A case report and literature review. *World J Clin Cases.* 2017;5(1):18-23. 査読有.
doi: 10.12998/wjcc.v5.i1.18.

Hashimoto O, Yoshida M, Koma Y, Yanai T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nishimura N, Yokozaki H. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. *J Pathol.* 2016;240(2):211-223. 査読有.
doi: 10.1002/path.4769.

Takase N, Koma Y, Urakawa N, Nishio M, Arai N, Akiyama H, Shigeoka M, Kakeji Y, Yokozaki H. 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. *Cancer Lett.* 2016;380(1):47-58. 査読有.
doi: 10.1016/j.canlet.

〔学会発表〕(計39件)

狛 雄一朗, 岡本 真生子, 土井 雅之, 池田 千浦子, 東野 展英, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. 食道扁平上皮癌と腫瘍関連マクロファージとの相互作用は CCL2/CCR2 経路の活性化を介して癌進展に關与する. 第 76 回日本癌学会学術集会. 2017 年 9 月 29 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

狛 雄一朗, 岡本 真生子, 土井 雅之, 東野 展英, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. マクロファージと食道扁平上皮細胞との相互作用によって CSF3/G-CSF 経路が促進する. 第 106 回日本病理学会総会. 2017 年 4 月 27 日. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

狛 雄一朗, 岡本 真生子, 土井 雅之, 東野 展英, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 高瀬 信尚, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. Roles of macrophages in early squamous cell carcinogenesis of the esophagus. 第 75 回日本癌学会学術集会. 2016 年 10 月 6 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

狛 雄一朗, 岡本 真生子, 土井 雅之, 東野 展英, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 高瀬 信尚, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. マクロファージによる p38 MAP キナーゼおよび IL-6 の活性化は食道癌の発癌初期段階を促進する. 第 13 回日本病理学会カンファレンス. 2016 年 7 月 29 日. 六甲山ホテル(兵庫県神戸市)

狛 雄一朗, 秋山 寛明, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 高瀬 信尚, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. ヒト食道扁平上皮癌の発癌初期段階におけるマクロファージの機能解析. 第 105 回日本病理学会総会. 2016 年 5 月 12 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)

狛 雄一朗, 荒井 慎明, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 高瀬 信尚, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏. 腫瘍関連マクロファージから分泌される CCL3 はヒト食道扁平上皮癌の運動能を亢進させる. 第 105 回日本病理学会総会. 2016 年 5 月 12 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

粕 雄一郎 (KOMA, Yuichiro)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40714647