



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CD40 Expression in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Tumor Progression and Lymph Node Metastasis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	松村, 祥幸
Description	配架番号 : 2272
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12531号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65877
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshiyuki_Matsumura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 松村 祥幸

学 位 論 文 題 名

CD40 Expression in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Tumor Progression and Lymph Node Metastasis
(食道扁平上皮癌における CD40 の発現は腫瘍の進行とリンパ節転移に関係する)

【背景と目的】

近年、進行食道癌に対する術前補助療法がめざましい発展を遂げているが、その予後は依然として不良のままである。食道癌の生存率を改善するには、新しい治療戦略と病勢を的確に反映する新規の生物学的パラメーターが必要である。

CD40 は TNF レセプターファミリーに属する膜蛋白であり、主に B 細胞や樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞で発現している。そのリガンドである CD154 は分子量 39kD の膜糖蛋白で、主に活性化した CD4 陽性 T 細胞に発現している。CD40 と CD154 の結合は B 細胞の増殖や、さまざまなサイトカインの分泌、ICAM-1、VCAM-1、CD80、CD86 などの共刺激分子の発現を増幅するなど、液性免疫と細胞性免疫の両方で重要な役割を担っている。

また、CD40 はメラノーマや卵巣癌、膀胱癌などの様々な悪性腫瘍に発現していることが報告されている。しかし、腫瘍細胞上の CD40 が腫瘍の進行や腫瘍周囲環境へどのような影響を与えているのかはまだ明らかとなっていない。

本研究では食道癌患者切除検体における CD40 の発現を検討し、それらと臨床病理学的因子・予後との関係を明らかにするとともに、*in vitro* で食道癌細胞に発現する CD40 の生物学的機能を解析した。

【材料と方法】

(I) 食道扁平上皮癌組織におけるCD40発現と臨床病理学的因子および予後との関連

1989年から1999年までに北海道大学病院消化器外科II、および関連病院において根治術を施行した遠隔転移のない術前未治療の食道扁平上皮癌患者122例を対象とした。患者検体は北海道大学倫理委員会の承認を得て検討に使用した。摘出標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、CD40に対する免疫組織染色を行い、陽性対照として正常リンパ節切片を用いた。腫瘍細胞において強い発現が認められる高倍率5視野を抽出し、CD40陽性細胞数を計測した。それらの平均で1視野4個以上の陽性細胞が認められた症例をCD40陽性群とし、それ以外のCD40陰性群との2群間で臨床病理学的因子および予後との関連について統計学的検討を行った。臨床病理学的因子との相関は χ^2 検定、またはFisher's exact testで評価した。生存分析はKaplan-Meier法で生存曲線を作成し、log-rank法で有意差検定を行った。 $p<0.05$ を有意差ありと判定した。

(II) ヒト食道扁平上皮癌細胞株におけるCD40発現の検討

ヒト食道扁平上皮癌細胞株11株（TE2、TE4、TE5、TE6、TE8、TE9、TE10、TE13、TE14、HEC46、SGF7）を用いてCD40の発現をflow cytometryとWestern Blottingでスクリーニングを施行した。CD40の陽性対照としてヒト末梢血単核球（PBMC）を用いた。

また、上記細胞株にInterferon- γ (IFN- γ)を100ng/ml投与し、48時間共培養後におけるCD40の発現の変化をflow cytometryにより解析した。

(III) ヒト食道扁平上皮癌細胞株におけるCD40の生物学的機能の検討

食道扁平上皮癌細胞株に対しCD40のリガンドであるCD154の可溶性リコンビナント(rhs)を使用し、CD40の生物学的機能を検討した。細胞株はCD40陽性株としてTE10、HEC46、を、陰性株としてSGF7を用いた。96ウェルプレートに各細胞株を 5×10^3 個播種し、IFN γ 、rhsCD154を投与し、増殖の変化をCell-Counting Kit-8 (WST-8)を用いて検討した。

続いて同じ株を24ウェルプレートに 2×10^5 個播種し、同様にIFN- γ 、rhsCD154を投与し、IL-6の分泌をEnzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA)を用いて測定した。統計解析はいずれもStudent-t検定にて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

(I) 臨床検体122例中、癌細胞におけるCD40陽性群は45例 (36.9%)と判定した。全症例での検討では予後との有意な相関は認めなかったが、病期III・IV症例に限るとCD40陽性群が有意に予後不良であった ($p=0.0422$)。また、CD40陽性群は病期、T因子、N因子、分化度と相関した。

(II) 食道扁平上皮癌細胞株においてflow cytometryで1%以上のCD40陽性細胞が検出されたのはTE5、TE10、HEC46の3株であった。Western blottingによっても同じ3株で発現が認められた。さらに、その3株でのみIFN- γ 投与でCD40の発現が亢進した。

(III) 細胞増殖試験では、IFN- γ 投与によりCD40陽性株のTE10、HEC46で増殖が有意に抑制されたが、rhsCD154との共培養ではいずれの細胞株でも増殖に変化を認めなかった。IFN- γ 投与後にrhsCD154を投与した場合も、いずれの細胞株でも増殖に変化を認めなかった。

また、IFN- γ の投与により、使用した3株全てにおいて有意にIL-6の分泌が増加した。さらに、rhsCD154投与したところ、3株すべてにおいてIFN- γ 投与時に比較して有意にIL-6の分泌が増加した。

【考察】

本研究は主に抗原提示細胞で発現しているCD40の食道扁平上皮癌における発現状況と、その生物学的意義について検討した初めての報告である。

食道癌患者検体での検討では、CD40陽性群においてpStageがより進行しており、腫瘍分化度が低く、高頻度のリンパ節転移を認めた。このことから、CD40の発現そのものが腫瘍の進行や転移を促進している可能性が示唆された。また、生存分析ではpStage III・IVの症例においてCD40陽性群は有意に予後不良であった。

過去の報告ではCD40が腫瘍細胞の増殖に関与していることが示唆されているが、今回の食道扁平上皮癌細胞株を用いた増殖試験ではCD154投与で増殖に変化は認められなかった。これは食道扁平上皮癌細胞株におけるCD40の発現レベルが、過去に報告された癌種と比較して低率ことが要因であると考えられた。

今回、IL-6の分泌は、CD154投与によりCD40発現レベルが低い食道扁平上皮癌細胞株においても有意に増加した。既報では、CD40陽性腫瘍細胞は直接活性化したT細胞上のCD154と結合し、サイトカインの分泌などを介して腫瘍進行を加速させ、腫瘍周囲環境での免疫回避の役割を担っているとされており、今回の結果を支持するものと考ええる。また、IL-6の発現は食道扁平上皮癌において予後不良因子の一つであり、抗アポトーシス増殖因子を自己分泌し腫瘍の進行を助けるとの報告があり、今回の結果と合致する。

【結論】

食道扁平上皮癌においてCD40は腫瘍進行に関与しており、IL-6がその中心的な役割を果たす因子の一つであることが示唆された。