



Title	食道癌細胞におけるCD40 / CD154相互作用が腫瘍の進行に及ぼす影響に関する研究
Author(s)	梅本, 一史
Description	配架番号 : 2945
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16655号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16655
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98265
Type	doctoral thesis
File Information	UMEMOTO_Kazufumi.pdf, 全文



学 位 論 文

食道癌細胞におけるCD40 / CD154相互作用が

腫瘍の進行に及ぼす影響に関する研究

(Studies on the Impact of CD40/CD154 Interaction in Esophageal
Cancer Cells on Tumor Progression)

2025年 9月

北 海 道 大 学

梅 本 一 史

学 位 論 文

食道癌細胞におけるCD40 / CD154相互作用が

腫瘍の進行に及ぼす影響に関する研究

(Studies on the Impact of CD40/CD154 Interaction in Esophageal
Cancer Cells on Tumor Progression)

2025年 9月

北 海 道 大 学

梅 本 一 史

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1頁
要旨.....	2頁
略語表.....	5頁
緒言.....	7頁
方法.....	10頁
結果.....	17頁
考察.....	34頁
結論.....	38頁
謝辞.....	40頁
利益相反.....	41頁
引用文献.....	42頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kazufumi Umemoto, Toru Nakamura, Katsunori Sasaki, Osamu Sato, Tomohiro Suzuki, Satoshi Hirano.
Platelets contribute to esophageal cancer invasion via CD40-CD154 interaction.
Oncology Reports, 54 • 79, 2025

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kazufumi Umemoto, Toru Nakamura, Katsunori Sasaki, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe, Satoshi Hirano.
Influence of CD40 to cancer proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma.
The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 27-29, 2018 • Osaka
2. 梅本一史、中村透、佐々木勝則、土川貴裕、七戸俊明、平野聡
食道扁平上皮癌におけるCD40発現と予後に関する研究
第123回北海道癌談話会例会，2021年10月16日・札幌市

要旨

【背景と目的】

食道がん (esophageal cancer, EC) は、消化器癌の中でも予後が不良な悪性腫瘍であり、5年相対生存率は41.5%と低い。特に、進行期 (II-IV期) における治療成績が不良であり、新規治療法の開発が求められている。現在、食道癌の標準治療は、手術、化学療法、放射線療法、および免疫療法と多彩であるが、遠隔転移を有する症例や再発症例では依然として治療成績が不良である。これに対し、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) における分子シグナルの解析が進められ、新たな治療標的としてCluster of Differentiation (CD) 40 - CD154相互作用が注目されている。

CD40は、腫瘍壊死因子受容体 (tumor necrosis factor receptor: TNFR) スーパーファミリーに属し、免疫細胞の活性化において重要な役割を果たす。抗原提示細胞に発現し、T細胞との相互作用を介して免疫応答を促進する。その一方で、一部の癌細胞にも発現するがその生物学的意義は不明な点が多い。他の癌種では、CD40の発現が腫瘍免疫の抑制や癌の進展に関与することが報告されているが、食道癌におけるCD40の役割については十分に解明されていない。

また、CD40のリガンドであるCD154は主にT細胞や血小板に発現し、腫瘍微小環境における免疫調節に関与する。特に、血小板は可溶性CD154 (soluble CD154: sCD154) を放出し、CD40シグナルを介して癌細胞の挙動を制御する可能性がある。食道癌におけるCD40-CD154相互作用が細胞の運動能や転移に与える影響についての知見は限られており、その解明は新規治療戦略の開発に貢献する可能性がある。

本研究では、CD40-CD154相互作用がMatrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) を介して食道癌細胞の浸潤・転移にどのように寄与するかを明らかにし、新たな治療標的としての可能性を探ることを目的とした。

【材料と方法】

本研究では、CD40を発現する食道扁平上皮癌細胞株 (TE-5、TE-10) および発現しない細胞株 (TE-4、TE-11) を用いた。細胞のCD40発現は、Western Blotting (WB)、Flow cytometry、Immunocytochemistry、およびquantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)を用いて評価した。CD40-CD154相互作用の影響を解析するため、recombinant soluble CD154 (rsCD154) を用いた刺激実験を行い、細胞の運動能 (遊走能・浸潤能) をトランスウェルアッセイで解析した。qRT-PCRでは、細胞外マトリックスリモデリングに関与する遺伝子の発現を測定し、発現量の変化を解析した。

CD40の機能をさらに検討するために、CD40ノックダウン細胞を作製し、CD154刺激の影響を比較した。CD40ノックダウンはsmall interfering RNA (siRNA)を用いて行

い、CD40 mRNAおよびタンパク質発現をqRT-PCRおよびWBで確認した。CD40-CD154相互作用が活性化するシグナル伝達経路の解析には、rsCD154刺激後のPhosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/ Protein Kinase B (Akt)、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)、Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)経路の活性化をWBで評価した。

腫瘍微小環境におけるCD40-CD154相互作用の影響を評価するため、血小板溶液を抽出し、CD40陽性TE細胞と共培養実験を行った。血小板溶液は α -thrombinにより活性化し、血小板表面および可溶性CD154発現をフローサイトメトリーおよびEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)により評価した。共培養後、TE細胞中のMMP-9 messenger RNA (mRNA)およびタンパク質発現の変化をqRT-PCRおよびWBで測定した。

臨床検体を用いた解析では、2014年8月から2017年10月に北海道大学病院で食道癌に対する根治的手術を受けた49名の患者を対象とし、血清MMP-9およびCD154濃度をELISA法で測定した。さらに、Kaplan-Meier法を用いた生存期間解析を行い、病期別の層別解析も実施した。統計解析にはLog-rank検定を用い、 p 値 <0.05 を有意とした。

【結果】

CD154刺激により、CD40陽性細胞 (TE-5、TE-10) では遊走能および浸潤能が有意に亢進し ($p<0.01$)、MMP-9 mRNAの発現が顕著に増加した ($p<0.001$)。対照的に、CD40陰性細胞 (TE-4、TE-11) ではこれらの変化は認められなかった。CD40ノックダウンにより、CD154刺激によるMMP-9の発現上昇 ($p<0.01$) および細胞の運動能の向上が抑制された。さらに、PI3K/Akt、MAPK、NF- κ B経路の活性化が確認され、CD40-CD154相互作用がこれらのシグナル伝達経路を介してMMP-9発現を調節することが示唆された。

活性化血小板との共培養実験では、CD40陽性細胞においてMMP-9の発現が増加し ($p<0.001$)、血小板がCD40依存的にTE細胞の浸潤・転移を促進する可能性が示唆された。臨床サンプルの解析では、血清MMP-9濃度と生存期間の間に病期依存的な関連が認められた。病期Ⅰの患者では、高MMP-9群が低MMP-9群に比べて予後不良であった ($p=0.032$)。一方、病期Ⅱ-Ⅳの患者では、低MMP-9群の方が有意に予後不良であった ($p=0.008$)。

【考察】

本研究により、CD40-CD154相互作用がMMP-9発現を促進し、食道扁平上皮癌細胞の運動能を亢進させることが示された。特に、PI3K/Akt、MAPK、NF- κ B経路の活性化を介した分子メカニズムが解明された。また、血小板との相互作用がCD40依存的にMMP-9分泌を促進することが示され、血小板が食道扁平上皮癌の進行に関与する

可能性が示唆された。さらに、血清MMP-9濃度と生存率の関係が病期ごとによって層別化されることが明らかとなり、MMP-9が予後を予測するバイオマーカーとしての可能性を持つことが示された。これらの知見は、CD40を標的とした新規治療戦略の開発に貢献する可能性がある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

Akt	protein kinase B
APC	antigen-presenting cell
CD	cluster of differentiation
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EC	esophageal cancer
ECM	extra cellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IFN	interferon
IL	interleukin
JNK	c-jun N-terminal kinase
LAMC2	laminin subunit gamma 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGE ₁	prostaglandin E ₁
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLG	plasminogen
PRP	platelet-rich plasma
pStage	pathological stage
PVDF	poly vinylidene fluoride

qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RPMI	Roswell park memorial institute medium
rsCD154	recombinant soluble CD154
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
sCD154	soluble CD154
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TBS-T	tris-buffered saline with tween 20
TGF	transforming growth factor
TME	tumor microenvironment
TNFR	tumor necrosis factor receptor
WB	western blotting

緒言

食道癌は世界で11番目に多い悪性腫瘍であり、がん死亡の第7位を占め、年間約51万例の新規発症と約44万例の死亡が報告されている。食道癌は病理学的亜型として2つの代表的な組織型を有しており、特徴的な地理的分布を示す。東アジア、南中央アジア、アフリカ南部に扁平上皮癌が多くみられる一方、北欧および北米では腺癌が優位に分布する (Yang H et al, 2024)。本邦において、2015年の人口10万あたりの食道癌の患者数（罹患率）は男性31.2人、女性5.9人であり、経時的にはゆるやかな減少傾向にある。2020年の食道癌死亡者数は10918人となっており、全癌死亡者数の3.1%を占める (https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/4_esophagus.html#anchor1

2025.1.27)。組織型は扁平上皮癌が86.7%、腺癌が7.4%と扁平上皮癌が優位である

(Watanabe M et al, 2023)。罹患数は特別に多くはないが、5年相対生存率は41.5%と患者数の多い消化器癌である胃癌や大腸癌と比較すると生存率が低く、食道癌は難治癌のひとつであると言える。進行期別に5年相対生存率をみると、限局期（癌が食道に限局しているもの）が80.4%、領域期（食道の領域リンパ節転移を有する、または、隣接する臓器に直接浸潤しているが遠隔転移を伴わないもの）が33.7%、遠隔期（遠隔臓器、遠隔リンパ節などに転移・浸潤があるもの）が10.0%となっており、特に領域期以降の治療成績が不良である

(https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/4_esophagus.html#anchor1 2025.1.27)。今日の食道癌に対する治療として、臨床病期I期の病変には主病変部の深達度によって内視鏡的切除、もしくは手術や化学放射線療法が適応となる。II, III期は術前化学療法後に手術を行い、切除不能の病変または遠隔期に相当するIV期に対しては化学療法もしくは化学放射線療法を行うのが標準治療となっている（食道癌診療ガイドライン2022年版, 2022）。近年の治療方法の改善、とくに新規薬物療法の開発にともない食道癌の治療成績は改善傾向にある。免疫チェックポイント阻害薬がIV期食道癌の化学療法の第一選択、または術後補助療法のレジメンとして登場し、今後のさらなる治療成績の向上が期待されるものの、現在の治療成績は決して満足のいくものとはいえない。このように、食道癌に対する新規治療法の開発や治療標的の探索は急務であり、特に進行した食道癌患者に対する副作用の少ない治療が求められている。

Cluster of Differentiation 40 (CD40) は、腫瘍壊死因子受容体 (Tumor Necrosis Factor Receptor: TNFR) スーパーファミリーに属する共刺激分子であり、免疫系の調節において重要な役割を果たす分子として知られる。CD40は主に抗原提示細胞 (Antigen-Presenting cell: APC) である樹状細胞やマクロファージ、B細胞に発現する (van Kooten C et al, 2000; Schonbeck U et al, 2001)。CD40とそのリガンドであるCluster of Differentiation 154 (CD154) の相互作用は、APCの活性化と成熟を促進し、強力な免

疫応答を誘導する。さらに、CD40-CD154相互作用は抗原提示能の向上、サイトカイン産生の促進、およびT細胞の活性化を通じて、免疫系のさまざまなプロセスを調整する (Richards DM et al, 2020; Xu W et al, 2018)。具体的には、Interleukin (IL)-12や Interferon (IFN)- γ のような向炎症性サイトカインの産生を促進させ、Th1型免疫応答を誘導し、細胞傷害性T細胞 (CTL, Cytotoxic T lymphocyte) が腫瘍細胞を効果的に認識し攻撃する能力を向上させる。さらに、CD40は腫瘍微小環境における免疫抑制を逆転させる能力を有し、M1型マクロファージや樹状細胞の抗腫瘍特性を強化し、免疫逃避メカニズムを持つ腫瘍細胞に対して効果的な攻撃を可能にする (Lim CY et al, 2022)。このように、CD40は免疫応答の中核的な調節因子として、癌治療の新たなターゲットとしての可能性を秘めている。

APC上のCD40が癌治療の新たなターゲットとして着目される一方で、いくつかの癌種において、癌細胞上でCD40の発現と予後との関連が報告されている (van den Oord J et al, 1996; Sabel MS et al, 2000; Li R et al, 2009; Ishikawa K et al, 2008; Cooke PW et al, 1999; Shoji T et al, 2011; Matsumura Y et al, 2016)。例えば子宮頸癌において、扁平上皮癌の約83%がCD40を発現しており、この発現は全生存率の向上と関連すると報告されている (Grazia et al, 2023)。反対に、食道癌や肺癌においては、CD40の高発現が予後不良因子として報告されており (Matsumura Y et al, 2016; Sabel MS et al, 2000; Ishikawa K et al, 2008)、腫瘍の進行や転移と関連していると報告されている。このように、癌細胞上のCD40発現に関しては癌種により異なる研究結果が示されている (表1)。

表1 CD40発現と各種癌への予後への影響

癌種	CD40 発現の頻度または特徴	予後との関連性	文献出典
食道扁平上皮癌	高発現例は stage III/IV に多く、生存期間が短い傾向	予後不良因子	Matsumura et al, 2016
肺癌	高発現はリンパ節転移や悪性度と関連	予後不良因子	Ishikawa et al, 2008
膀胱癌	全体の約 36%が CD40 陽性	明確な予後との関連はない	Shoji et al, 2011
腎細胞癌	CD40 陽性は低病期、低悪性度と関連	予後良好傾向	Cooke et al, 1999
悪性黒色腫	全体の約 58%が CD40 陽性	予後不良因子	van den Oord et al, 1996
子宮頸癌	全体の約 83%が CD40 陽性	予後良好因子	Grazia et al, 2023

申請者が所属する教室では、これまでに食道癌に発現するCD40に関する研究を実施してきた。根治的食道切除を施行した食道癌患者の切除標本を対象とした免疫組織学的研究では、CD40発現はpathological stageに関連し、pathological stage IIIとIVの患者において生存期間を短縮させる因子であることを明らかとした (Matsumura Y et al, 2016)。しかしながら、これまでの研究はあくまで免疫染色による発現評価にとどまり、CD40が腫瘍細胞においてどのような分子機能を果たしているのか、その下流のシグナル伝達機構や腫瘍悪性度への影響については明らかになっていない。CD40は本来、抗原提示細胞に発現し、免疫活性化に寄与する共刺激分子として知られているが、腫瘍細胞における発現は、免疫系の制御とは異なる腫瘍内在的な作用を担っている可能性がある。

そこで本研究では、食道癌細胞に発現するCD40に着目し、その活性化が腫瘍の遊走・浸潤能に与える影響、ならびにその制御機構に関与するシグナル経路を明らかにすることを目的とした。また、CD154の供給源として注目される血小板との相互作用がCD40活性化に及ぼす影響についても検討を加える。本研究を通じて、食道癌におけるCD40の腫瘍内在的機能を分子レベルで解明し、CD40-CD154経路を標的とした新たな治療戦略の確立に資する知見を得ることを研究の目的とした。

方法

1) 細胞株

実験に使用したヒト食道扁平上皮癌細胞株TE-1, TE-4, TE-5, TE-6, TE-8, TE-9, TE-10, TE-11, TE-14, TE-15を東北大学加齢医学研究所から購入した。細胞培地は、Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640, NACALAI TESQUE, Japan)を使用した。両培地ともウシ胎児血清 (FBS, Cell culture Bioscience, Tokyo)とペニシリン-ストربتマイシン(NACALAI TESQUE, JAPAN)を付加し、それぞれ濃度を10%(v/v)、1%(v/v)として添加し5%CO₂を含む37°Cの加湿環境で培養した。また、培養に使用した器具類はオートクレーブによる滅菌処理を施し、すべての操作をクリーンベンチで無菌的に行った。

2) 末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cell: PBMC) 抽出

健康成人ボランティアから末梢静脈血を採取し、末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) を分離した。採取した血液サンプルにヘパリンで抗凝固処理を施し、Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を使用した密度勾配遠心法によりPBMCを分離した。血液サンプルをPhosphate-Buffered Saline (PBS)で等量希釈し、Ficoll-Paque Plus上に慎重に重層させた後、400gで30分間遠心分離を行った。遠心分離後、PBMC層を取り出し、PBSで洗浄することで高純度のPBMCを得た。

3) Western Blotting (WB)

細胞抽出液は、Protease Inhibitor Cocktail (Promega, Madison, Japan) を添加したULTRARIPA kit (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Japan) で調製した。WBに用いる細胞は10cm dishまたは6-well dishに播種して培養した。細胞培養液を吸引しPBSで洗浄した後に細胞抽出液にて溶解処理した。この溶解液を用いてWB解析を行った。サンプルは15% ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、続いてPVDF (polyvinylidene difluoride) membranes (Bio-RAD, Tokyo, Japan) にタンパク質を転写した。転写後、膜はTBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween 20)および5% skim milkを用いてブロックし、一次抗体を添加して4°Cで一晩インキュベートした。その後、TBS-Tで洗浄し、horseradish peroxidase結合の二次抗体で室温で1時間インキュベートした。発光検出はECL plus (GE healthcare, Boston, USA) およびChemiDoc (Bio-RAD) を用いて行い、densitometry解析はImage Quantソフトウェア (Bio-RAD) を用いて実施した。使用した抗体の詳細を表2に記載する。

表2 Western Blottingに使用した一次抗体の一覧

Antigen	Clone	Dilution	Manufacturer
CD40	ab13545	1:1000	abcam
Beta Actin	8H10D10	1:1000	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt	4060T	1:4000	Cell Signaling Technology
Akt	4691T	1:4000	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	4370T	1:4000	Cell Signaling Technology
p44/42 MAPK (Erk1/2)	4695T	1:4000	Cell Signaling Technology
Phospho-JNK	4668T	1:4000	Cell Signaling Technology
JNK	9252T	1:4000	Cell Signaling Technology
NF-kB p65	8242T	1:4000	Cell Signaling Technology
Histone H3	12648T	1:4000	Cell Signaling Technology

4) Polymerase chain reaction (PCR)

mRNAの定性および定量はReverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) およびquantitative RT-PCR (qRT-PCR) 法にて実施した。Total RNAの抽出および逆転写は、RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を使用し、Prime Script RT Master Mix (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いてcomplementary DNAを生成した。qRT-PCRは、Taqman Universal PCR Master MixおよびTaqmanプローブ (human CD40: Hs01002915_g1, human MMP-9: Hs00957562_m1, and human beta-actin: Hs99999903_m1) を使用して、Lightcycler (Roche, Basel, Switzerland) で実施した。解析には比較Ct法を用い、*beta-actin*をハウスキーピング遺伝子として基準値を設定した。さらに、細胞外マトリックスリモデリング関連遺伝子のスクリーニングにはPrime PCR 96-well plate array ECM Remodeling H96 (BIO-RAD) を使用した。*CD40* messenger RNA (mRNA)の発現は、半定量PCR法を併せて用いて評価した。半定量PCR法に使用したプライマーは以下の通りである：CD40 (Forward: 5'-AGAGTTCACTGAAACGGAATGCC-3'、Reverse: 5'-ACAGGATCCCGAAGATGATGG-3') およびbeta-actin (Forward: 5'-CAACCGCGAGAAGATGACCC-3'、Reverse: 5'-GGAACCGCTCATTGCCAATGG-3')。

5) Flow Cytometry

細胞表面の抗原CD40、CD154、CD61、およびCD62Pの発現を評価するため、細胞を染色し、その後洗浄および固定を行った。表面染色には、Miltenyi Biotec製の特異的抗体を使用し、4°Cで10分間インキュベーションした。具体的には、CD40-VioBright™ FITC（クローンREA733、1:50希釈）、CD154-APC（クローンREA238、1:50希釈）、CD61-VioBright™ 515（クローンREA761、1:50希釈）、およびCD62P-PE（クローンREA389、1:50希釈）の抗体を用いた。染色後、細胞はMACSQuant® Analyzer 10フローサイトメーター（Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan）を使用してデータを取得し、FlowJo（BD, Tokyo, Japan）ソフトウェアを用いて解析した。これにより、各抗原の発現レベルを高精度で定量化することができた。使用した抗体の一覧は表3のとおりである。

表3 Flow cytometryに使用した抗体一覧

Antigen	Clone	Applications	Dilution	Manufacturer
CD40	REA733	FC	1:50	Miltenyi
CD61	REA733	FC	1:50	Miltenyi
CD62P	REA389	FC	1:50	Miltenyi
CD154	REA238	FC	1:50	Miltenyi

6) Immunocytochemistry

免疫細胞染色では、カバーガラス上で培養した細胞を室温で15分間3.7%ホルムアルデヒドで固定し、細胞の構造を保存した。固定後、細胞はPBSで数回洗浄し、3% BSAおよび10%ヤギ血清を含むPBS溶液で15分間ブロッキングすることで非特異的な結合を防止した。次に、細胞はヒトポリクローナル抗CD40抗体（abcam, Cambridge, UK）で室温で1時間インキュベートし、CD40抗原の検出を行った。さらに、Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit antibody（abcam, Osaka, Japan）を用いて二次抗体染色を行い、蛍光標識により抗原を可視化した。最終的に、Dapi-Fluoromount-G™を使用してカバーガラスをスライドにマウントし、核を4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）で標識した。サンプルは共焦点顕微鏡BZ-9000（KEYENCE）および対応する同社製のソフトウェアで解析し、高解像度の蛍光画像を取得して詳細な細胞内局在を評価した。

7) CD154刺激

TE細胞に対するCD154刺激は、無血清培地において5μg/mLのrecombinant soluble

CD154 (ENZO MEGACD40L, ENZO, NY, USA) で24時間処理を行った。処理後、培地上清を回収し、細胞破片やデブリを除去するために4°Cで10,000gで5分間、遠心分離を行った。得られた上清は、後続の解析のために保存した。一方、遠心分離後の細胞ペレットは、RNA抽出のために迅速に溶解し、後続の遺伝子発現解析に使用した。

8) Proliferation assay

細胞増殖アッセイでは、CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega)を使用し、 4.0×10^3 個の細胞を96ウェルプレートに播種した。各ウェルはrecombinant soluble CD154 (rsCD154) を添加したグループとPBSを添加した対照グループに分け、48時間培養した。その後、各ウェルにCellTiter 96 AQueous One Solution試薬を10 μ l加え、湿度を保った5% CO₂環境下でさらに2時間インキュベートした。最終的に、SpectraMax 13 microplate readerで490nmの吸光度を測定し、各条件について5つのreplicate wellを使用して細胞増殖を評価した。

9) Cell migration and invasion assay

細胞遊走および浸潤アッセイは、8 μ m孔径の膜を持つMatrigel invasion chamber (Corning, NY, USA) を使用して実施した。ウェルの上室には1% FBSを含むRPMI1640培地に懸濁した 5.0×10^4 個の細胞および25pgのrsCD154を添加し、500 μ lの10% FBSを含むRPMI1640培地を下室に添加して化学誘引物質として使用した。48時間のインキュベーション後、膜の上面から侵襲しなかった細胞を綿棒で除去した。インサートの下側にある浸潤した細胞は、氷冷メタノールで固定し、Diff-Quick染色キット (Dade-Behring, Newark, DE) を用いて染色した。染色された細胞は、共焦点顕微鏡BZ-9000 (KEYENCE) およびKEYENCEソフトウェアを使用して計数した。無作為に選択した5つの視野で細胞の総面積を測定し、その平均値を用いて、このアッセイにおける浸潤細胞の数を評価した。

10) Gelatin zymography

rsCD154で刺激または刺激しないTE細胞の培養上清におけるゼラチン分解活性を評価するため、7.5% SDS-polyacrylamide gelに0.1%のゼラチン (porcine skin type A, Sigma) を添加して電気泳動を行った。SDS-PAGE後、ゲルを2.5% Triton X-100で1時間洗浄し、インキュベーションバッファー (50mM Tris pH 7.4, 1 μ M ZnCl₂, 5mM CaCl₂, 1% Triton X-100) で37°Cで24時間インキュベートした。染色には40%メタノール、10%酢酸、0.5% Coomassie brilliant blue R250を使用し、脱色した。ゼラチン分解活性は、青色背景に白色バンドとして視覚化された。ゲルをスキャンし、

ChemiDocイメージアナライザーソフトウェア (Bio-RAD) でバンドの濃度を定量化した。

11) siRNAによるCD40 gene knockdown

CD40 small interfering RNA (siRNA)およびコントロールsiRNAは、Santa Cruz Biotechnology (Palo alto, CA, USA) から購入した。増殖期にある細胞を4well plateに1ウェルあたり 22.5×10^3 個播種し24時間培養した後、800nMのsiRNAをoligofectamineおよびOPTI MEM I低血清培地 (Invitrogen Life Technologies、Carlsbad, CA, USA) を用いてトランスフェクションした。siRNAの濃度は用量反応試験に基づいて決定した。トランスフェクション効率は、トランスフェクション後72時間でFITC標識抗CD40抗体を用いた染色後にflow cytometryで確認した。コントロール細胞は、コントロールsiRNAをoligofectamineおよびOPTI MEM I低血清培地でトランスフェクションして作製した (mock)。

12) シグナル伝達経路アッセイ

TE-10細胞 (1.0×10^5 cells/well) を12ウェルプレートに播種し、24時間培養した後、5 μ g/mLのrsCD154で刺激を行った。刺激後15分および30分で細胞ペレットを回収し、上述のウエスタンブロッティングプロトコルに従いタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は、CD40-CD154相互作用に関与する各シグナル伝達経路の活性化を評価するために、表1に示す抗体を用いて解析を行った。

13) 血小板溶液の抽出

静脈血をCPDバッファー (16mM citric acid、90mM sodium citrate、16mM NaH_2PO_4 、142mM dextrose、pH 7.4) を含むシリンジに採取したのちに、血液サンプルを20°Cで200gで20分間遠心分離した。血小板濃厚血漿 (Platelet-rich Plasma: PRP) の上層をHEPバッファー (140mM NaCl、2.7mM KCl、3.8mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、5mM Ethylene Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA)、pH 7.4、最終濃度1 μ Mのprostaglandin E_1 (PGE_1)を含む) を含む新しいチューブに移し、20°Cで100gで20分間さらに遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、20°Cで800gで20分間遠心分離した。上清を捨てた後、血小板ペレットをPlatelet wash buffer (10mM sodium citrate、150mM NaCl、1mM EDTA、1% dextrose、pH 7.4) で2回洗浄した。血小板ペレットをmodified Tyrode's buffer (134mM NaCl、12mM NaHCO_3 、2.9mM KCl、0.34mM Na_2HPO_4 、1mM MgCl_2 、10mM HEPES、5mM dextrose、3mg/ml BSA、1 μ M PGE_1 、pH7.4) にゆっくりと再懸濁し、血小板溶液として使用した。血小板は37°Cで5分間予備加温し、1Uの

human alpha-thrombin (Haematologic Technologies, Inc., USA) を添加し、1分間静置して活性化した。

14) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Soluble CD154およびMMP-9の濃度測定には、下記のELISAキットを使用した。CD154の測定にはHuman CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay (Quantikine® ELISA, R&D Systems) を用い、MMP-9の測定にはHuman MMP-9 activity assay (QuickZyme Biosciences) を用いて実験を行った。光学濃度の測定にはSpectraMax I3 microplate readerを使用し、サンプルごとにELISAを4回実施することで、結果の信頼性と再現性を確保した。

15) TE細胞と血小板溶液の共培養

TE細胞と血小板の共培養実験では、 7.5×10^4 のTE-10細胞を24ウェルプレートに播種し、24時間培養した。その後、細胞を洗浄し、新たな培地を追加した。活性化血小板 1.0×10^8 を0.2mlのmodified Tyrode's bufferに懸濁したのち、 $0.4 \mu\text{m}$ 孔径の細胞培養インサートを用いてトランスウェルに添加し、TE細胞とさらに24時間共培養した。培養終了後、培養上清と細胞ペレットを回収し、MMP-9 mRNAレベルを解析することで、血小板がTE-10細胞に与える影響を評価した。

16) 食道癌手術患者の血清中のMMP-9およびCD154濃度と生存期間の解析

2014年8月から2017年10月にかけて、北海道大学病院消化器外科IIで食道癌に対する根治的食道切除術を受けた連続49名の患者を対象に研究を実施した。研究対象者から書面による同意書を取得した。患者の血清は手術前日または手術直前に採取し、deep freezerで冷凍保存した。血清中のMMP-9およびCD154濃度は、上記ELISA

(Quantikine ELISA Human CD40 Ligand, Human MMP-9, R&D Systems) を用いて測定した。また、診療録から診療情報（年齢、性別、組織型、病理情報、血液検査結果）を抽出し食道切除術後最低5年間の追跡期間中の、癌の再発および生存率を解析した。

17) 統計解析

統計学的解析は異なる群の比較には、データの性質と分布に応じてPearsonのカイ二乗検定、Fisherの正確検定、対応のあるt検定、またはMann-Whitney U検定を適用した。また、生存期間の解析にはKaplan-Meier法にて生存曲線を描き、2群間の比較にはLog-rank検定を用いた。数値は平均値 $\pm$ standard derivation (SD)で示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。解析ソフトはGraphPad prism 9 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA)を

用いた。

18) 研究指針, 研究倫理

本研究は「北海道大学 人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って行った(実施許可番号24-0126)。

結果

1) ヒト食道扁平上皮癌細胞株におけるCD40発現解析

ヒト食道扁平上皮癌細胞株TE-1, TE-4, TE-5, TE-6, TE-8, TE-9, TE-10, TE-11, TE-14, TE-15上のCD40発現を検討するため、PCR、WB、Flow cytometry、Immunocytochemistryを実施し、mRNAレベルおよび蛋白レベルでのCD40発現を解析した。

qRT-PCRではTE-1, TE-5, TE-10, TE-15に*CD40* mRNAの増幅を検出した（図1上）。さらに、*CD40* mRNA発現が確認されたTE細胞においてスプライシングバリエーションの存在が確認された（図1下）。

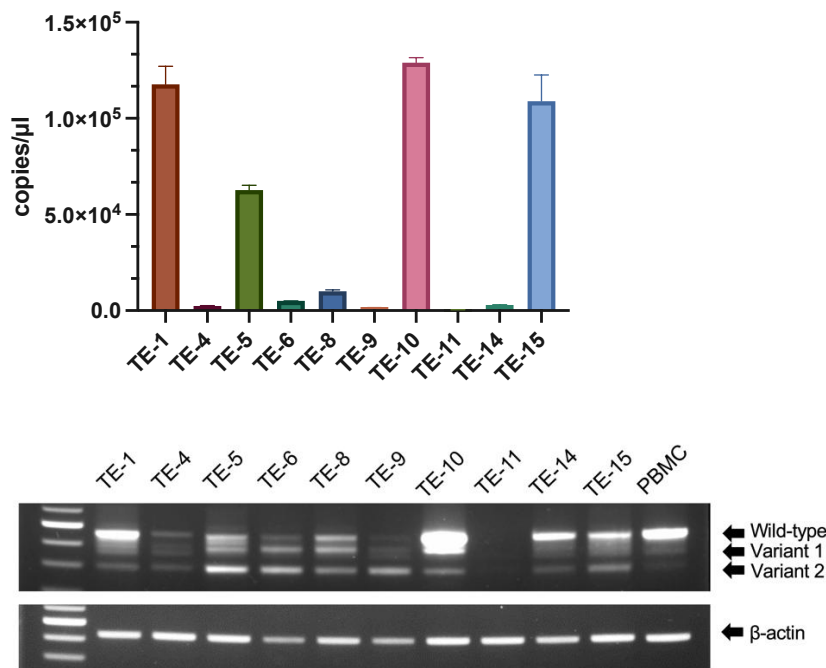


図1. qRT-PCRによるCD40発現解析

（上）qRT-PCRによりTE細胞株に含まれる*CD40* mRNAを定量的に評価した。TE-10, TE1, TE-15, TE-5の順に*CD40* mRNAコピー数が高かった。（下）上段は*CD40* mRNAスプライシングバリエーションの発現を示し、下段は正規化のためのリファレンス遺伝子として β -actinの発現を示した。

WBではTE-1, TE-5, TE-10, TE-15に明瞭なバンドを検出した（図2）。TE-8に淡いバンドを検出した。Positive controlとしてPBMCを使用した。

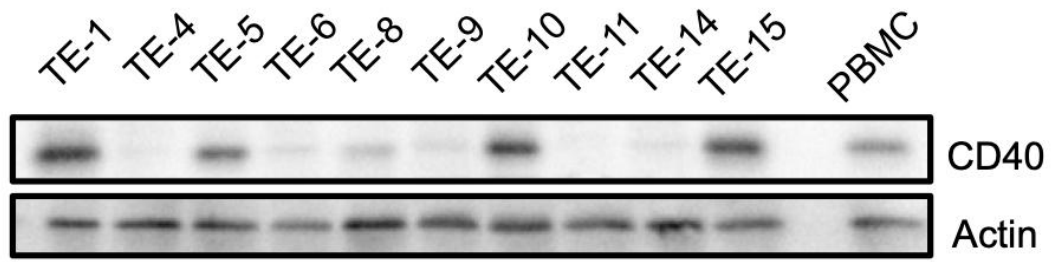


図2. Western BlottingによるCD40発現解析

抗CD40抗体 (clone ab13545) を用いたWBによりTE細胞のCD40発現を定性評価した。

次に、Flow cytometryでTE細胞表面のCD40発現を評価した。TE-5 (97.2%), TE-1 (96.4%), TE-10 (92.9%), TE-15 (63.9%), TE-8 (37.7%)の順にCD40陽性細胞を検出した (図3)。

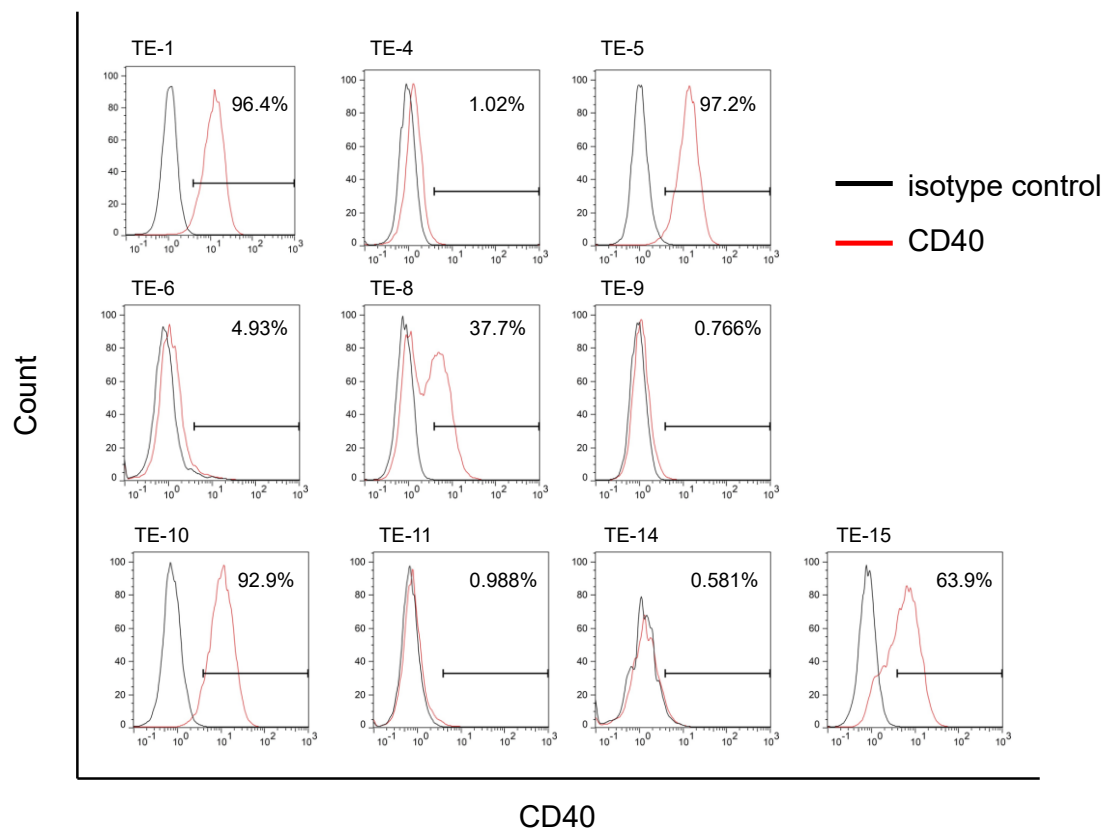


図3. Flow cytometryによるCD40発現解析

抗CD40抗体 (clone REA733) を使用してTE細胞の細胞膜上に発現するCD40を評価した。

ImmunocytochemistryではTE-5, TE-10, TE-15に比較的明瞭なCD40発現を検出した（図4、緑）。次いで、TE-1, TE-8に淡くCD40発現を検出した。その他のTE-4, TE-6, TE-9, TE-11, TE-14ではCD40発現を検出しなかった。

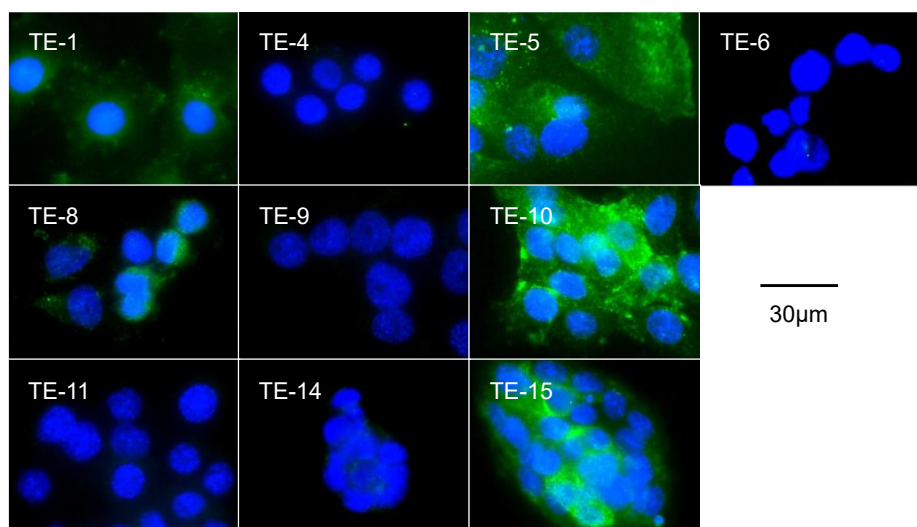


図4. ImmunocytochemistryによるCD40発現解析

抗CD40抗体（clone ab13545）を用いたImmunocytochemistryによりTE細胞上のCD40発現を定性評価した。CD40発現は緑色、核はDAPIにより青色に染色されている。

以上のPCR、WB、Flow cytometry、Immunocytochemistryの結果から、TE-5とTE-10をCD40陽性食道扁平上皮癌細胞株として、TE-4とTE-11をCD40陰性食道扁平上皮癌細胞株として後続の実験に使用することとした。

2) TE-10におけるCD40-CD154相互作用のシグナル伝達経路の評価

CD40-CD154相互作用の下流シグナルを評価するために、TE-10におけるCD40活性化後のシグナル伝達経路として、PI3K、MAPK、およびNF- κ Bの活性化を解析した。その結果、CD154刺激を受けたTE-10では、PI3Kの下流エフェクターであるAktのリン酸化が確認され、PI3Kの活性化が示された（図5A）。さらに、MAPK経路の活性化が認められ、p44/42 MAPK（細胞外シグナル制御キナーゼ、ERK1/2）およびc-Jun N末端キナーゼ（JNK）のリン酸化が観察された。加えて、NF- κ B p65の核内移行が確認され、NF- κ Bの活性化が示唆された（図5B）。

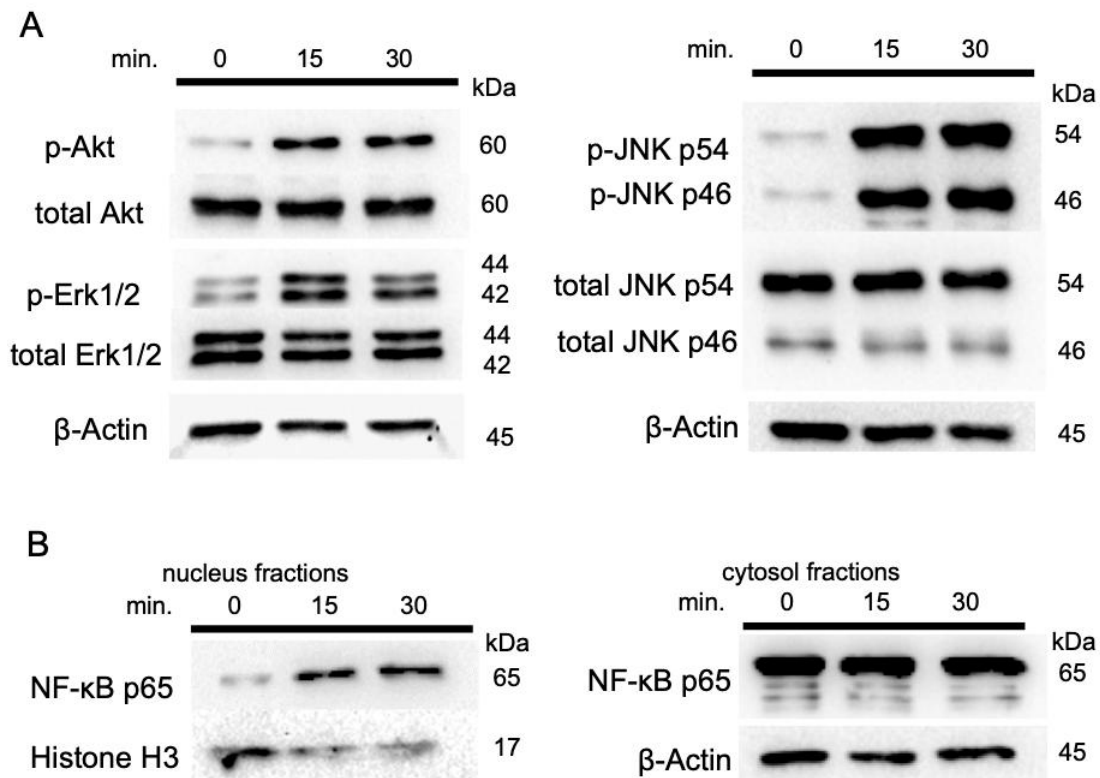


図5. Signaling pathway assay

TE-10細胞にrecombinant soluble CD154による刺激を行い15, 30分後に細胞を回収した。Western Blotting法によりPI3K/Akt, MAPK, NF-κBの活性化を評価した。

3) CD154刺激によるTE細胞の細胞機能解析

TE細胞におけるCD40の機能を評価するために、CD40のリガンドであるCD154を用いてTE細胞を刺激し細胞機能の変化を評価した。はじめに、CD40-CD154 interactionが細胞増殖に寄与する影響を評価するためCellTiter 96 AQueous One Solutionを用いたProliferation assayを行なった。4種類すべてのTE細胞において、CD154刺激による細胞増殖能に変化はみられなかった (図6)。

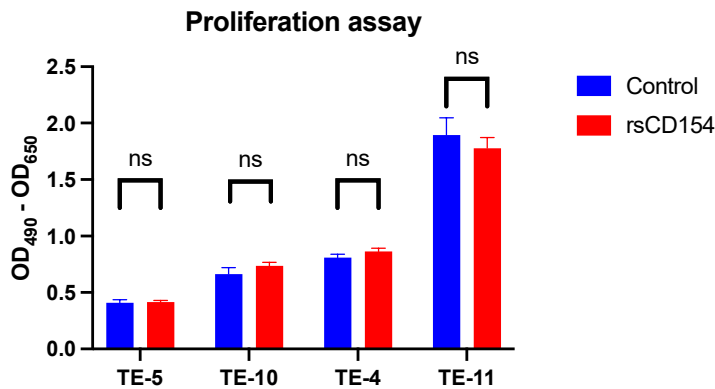
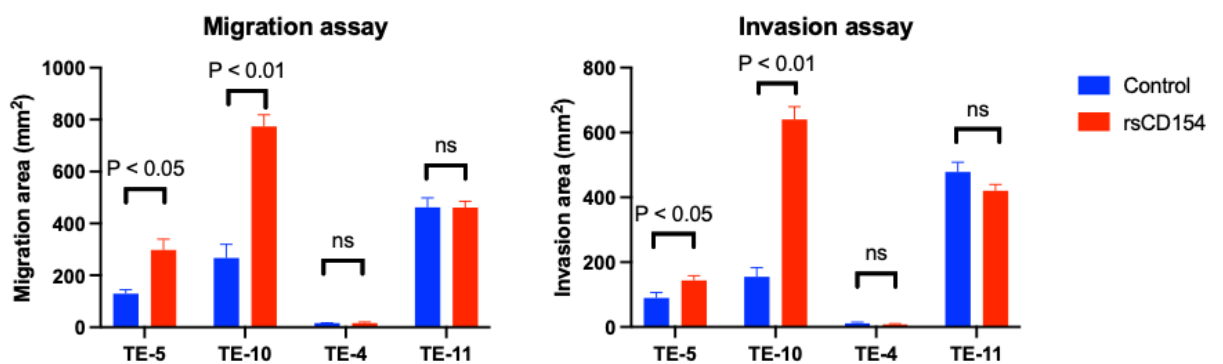


図6. CD154刺激によるTE細胞増殖能の評価

生細胞内においてテトラゾリウム塩がホルマザンへ変換される反応に基づき、培養液中に放出されたホルマザンを490nmで測定した。溶液の混濁による誤差を補正するため650nmの吸光度との差を縦軸とし、生存細胞数を定量的に評価した。

OD: optical density. rsCD154: recombinant soluble CD154

次に、細胞の運動能（遊走能・浸潤能）を評価するためにtranswellを使用した migration assay, invasion assayを行なった。CD40陽性細胞であるTE-5, TE-10では、CD154刺激により遊走能・浸潤能がとも有意に亢進した。その一方、CD40陰性細胞であるTE-4, TE-11はCD154刺激による遊走能・浸潤能の変化を認めなかった（図7）。



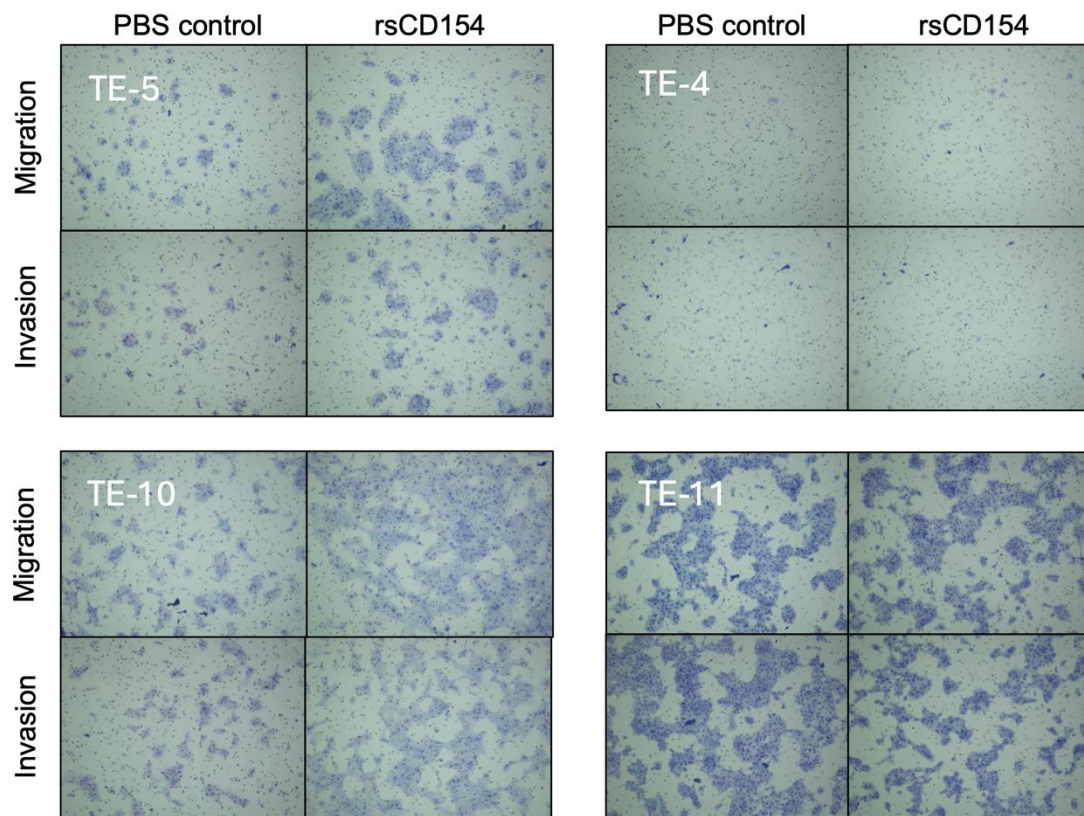


図7. CD154刺激によるTE細胞運動能の評価

0.8 μ m poreを持つ上方のwellに細胞を播種し、下方のwellには培養液に加えて10%FBSを加える。FBSに濃度勾配をつけることでporeを通してwell裏面に細胞を誘引し、培養後に細胞領域を定量し運動能を評価した。Well裏面にMatrigelをコーティングしたものをinvasion assay, コーティングを加えないwellで実施したものをmigration assayとした。遊走ないし浸潤した細胞面積を定量しグラフ化した（上図）。青色は実際に浸潤した細胞（下図）。

rsCD154: recombinant soluble CD154.

4) CD40とCD154相互作用による遺伝子発現解析

CD40とCD154の相互作用によってCD40陽性TE細胞の運動能が向上した原因を評価するため、TE-10のCD154刺激の有無による遺伝子発現の差異を検討した。増殖能ではなく運動能・浸潤能に変化があった点に着目し、細胞外マトリックスリモデリングに関連する40種類の遺伝子をスクリーニングした。CD154刺激によりいくつかの遺伝子発現増幅が確認された。*Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)*が最も増加が著しく17.55倍、次いで*Plasminogen (PLG)*が6.44倍、*Laminin Subunit Gamma 2 (LAMC2)*が4.95倍の増幅を認めた（図8）。

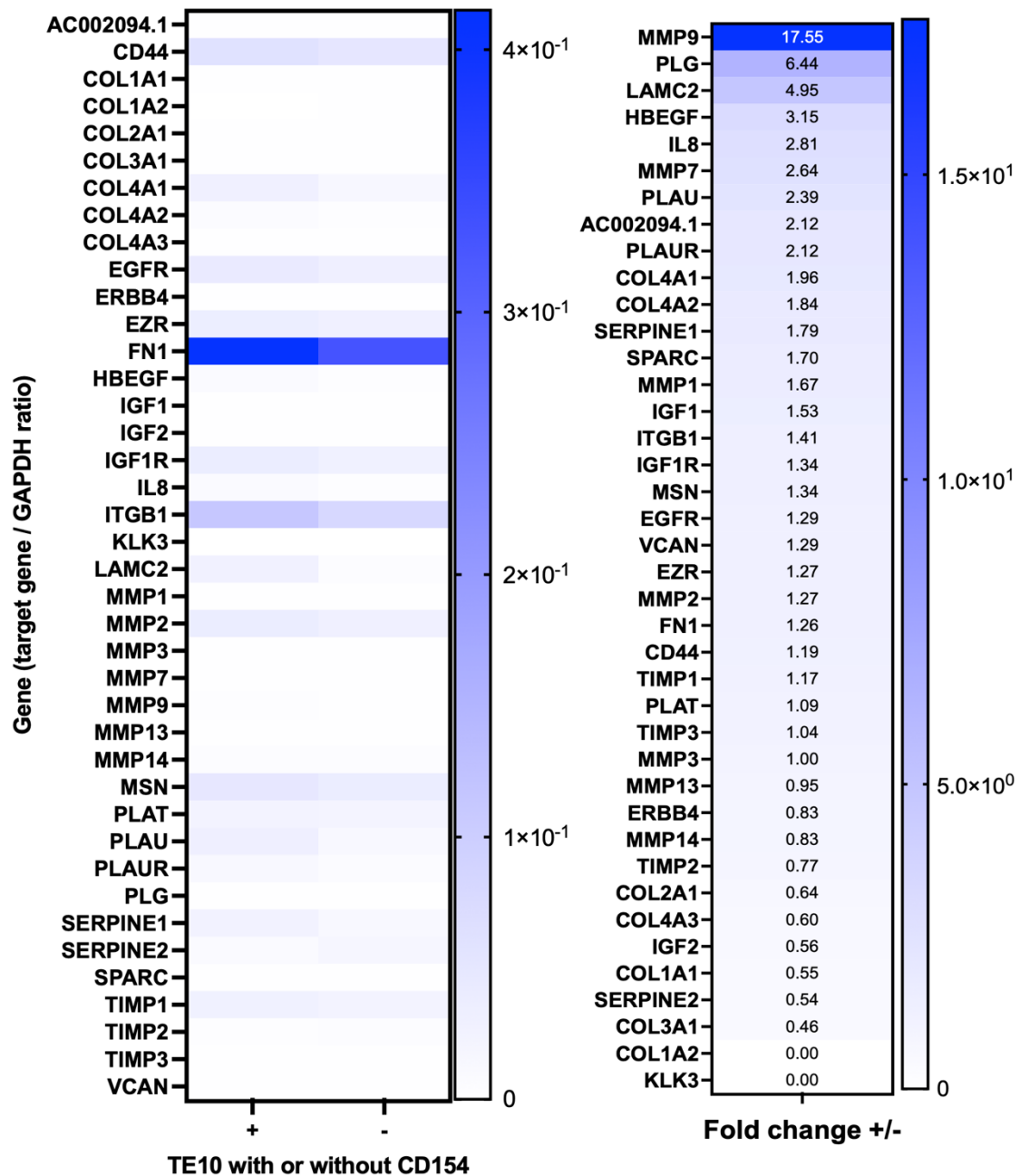


図8. TE-10におけるCD154刺激後の遺伝子変化

ECM remodelingに関与する40遺伝子の変化量をPrime PCR 96-well plate array ECM Remodeling H96 (BIO-RAD) を使用して評価した。右図に増加量の大きい遺伝子を降順で示した。

次に、CD40-CD154相互作用がMMP-9分泌を誘導するかを検討した。TE細胞にCD154刺激を加え、培養上清中のMMP-9分泌量をGelatin zymography (図9A) およびELISA (図9B) にて解析した。その結果、CD40陽性細胞株においてはMMP-9の分泌が増加していたが、CD40陰性細胞株では有意な変化は認められなかった。また、migration, invasion assayにおいて高い浸潤能を示したTE-10およびTE-11では、CD154刺激を行わなくてもMMP-9の分泌が高値を示した。次に、MMP-9の転写レベルでの発現制御について検討した。CD154刺激後、CD40陽性TE細胞ではMMP-9 mRNAの発現上昇が認められた一方、CD40陰性細胞では変化は認められなかった (図9C)。

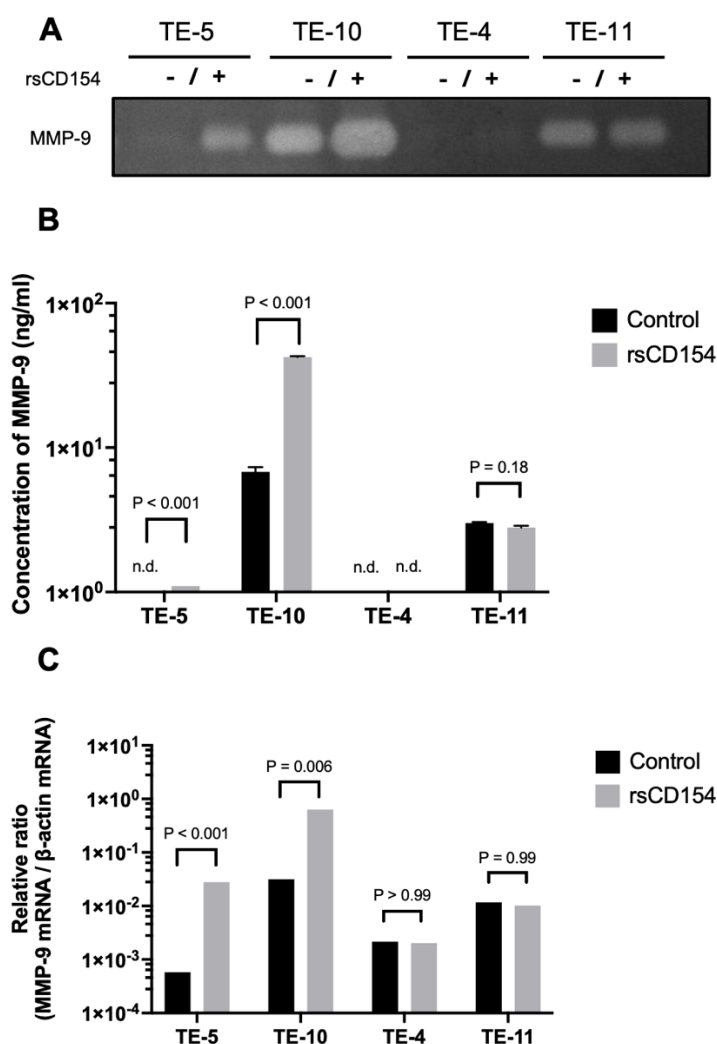


図9. CD40-CD154相互作用によって誘導されるTE細胞におけるMMP-9発現の変化

(A)ゼラチンザイモグラフィーを用いたMMP-9分泌の定性的解析 (B) ELISAによるMMP-9分泌の定量解析 (C)リアルタイムRT-PCRによるMMP-9 mRNA発現の定量解析

5) CD40 knockdownによるTE-10細胞運動能の検討

CD40遺伝子のTE細胞運動能への関与をさらに検討するために、CD40 knockdown TE細胞を作製した。まず、TE-10にCD40 siRNAもしくはcontrol siRNAをトランスフェクションさせ、CD40 knockdown TE-10及びcontrol TE-10 (Mock) を作出した。これらの細胞は、qPCR法により*CD40 mRNA*レベルを測定し十分なknockdown効率を得られていることを確認した (図10左)。さらに、CD40 knockdown TE-10とcontrol TE-10 (Mock)それぞれにCD154刺激を行い、*MMP-9 mRNA*の発現量を評価した。MockではCD154刺激による*MMP-9*発現増加が認められ、CD40 knockdown TE-10ではCD154刺激前後のいずれも*MMP-9*は低発現であった (図10右)。

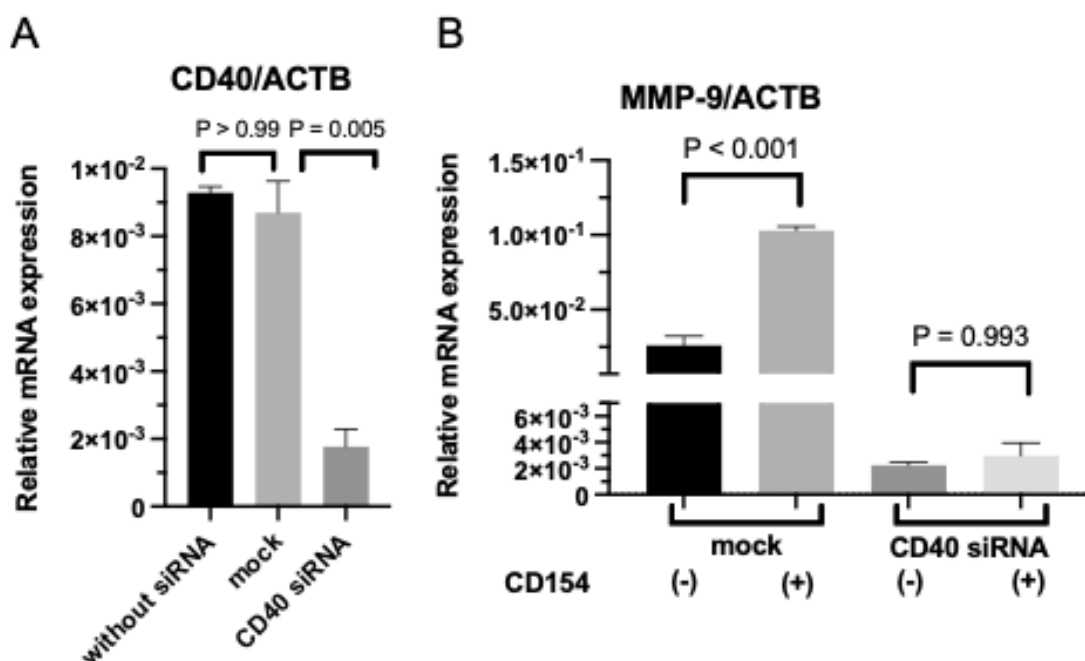


図10. TE-10におけるCD40 knockdown

siRNAをトランスフェクションしCD40発現が十分にknockdownされていることを確認した (A)。また、CD154刺激に対する反応を*MMP-9 mRNA*発現量で評価した (B)。

次に、CD40 knock down TE-10とcontrol TE-10それぞれにCD154刺激を行いmigration assayおよびinvasion assayを実施した。遊走能・浸潤能のいずれにおいても、CD40 knockdownにより遊走能・浸潤能のベースラインが低下し、CD154刺激による遊走能・浸潤能向上は認められなかった (図11)。

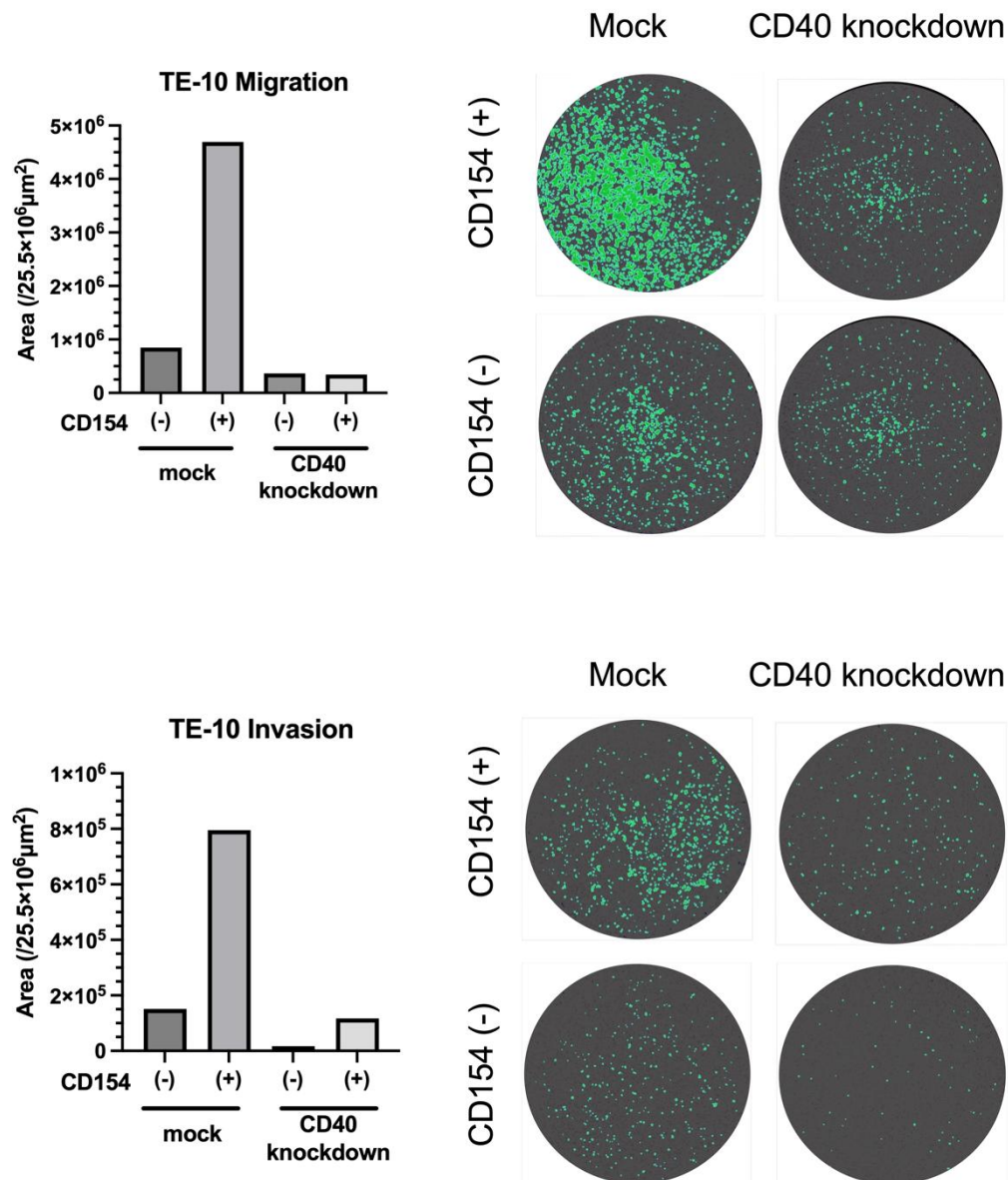


図11. CD40 knockdown TE-10におけるmigration, invasion assay

上段：migration assay. 観察視野内の遊走ないし浸潤した細胞をKEYENCE社性のアプリケーションを使用し緑色に標識した。その領域を定量化し左図に示した。

下段：invasion assay.

6) 血小板抽出とTE細胞の共培養の検討

次に、腫瘍微小環境内で供給されるCD154に着目した検討を行った。生体内では、CD154はCD4+ Tリンパ球の細胞表面に膜貫通型タンパク質として存在するほかに、

可溶性タンパク質としても存在する。可溶性CD154 (sCD154) の大部分は血小板に由来しており(Tone M et al, 2001)、腫瘍微小環境において、がん細胞が分泌するタンパク性の血小板活性化因子によって活性化される。また、がん細胞の増殖と転移は血小板凝集の誘導によって促進されることが明らかにされていることから(Schlesinger M, 2018; Haemmerle M et al, 2018; Gay LJ et al, 2011)、血小板とTE細胞との関係を検討した。

まず、前述の方法でヒト末梢血から血小板溶液を抽出した。 α -thrombinを使用して血小板を活性化した。血小板のマーカーであるCD61と活性型血小板マーカーであるCD62Pを標識してフローサイトメトリーを実施した(図12)。純度は95.6%であり十分に純度が高い血小板溶液が精製され、 α -thrombin刺激により活性型血小板溶液が抽出された。

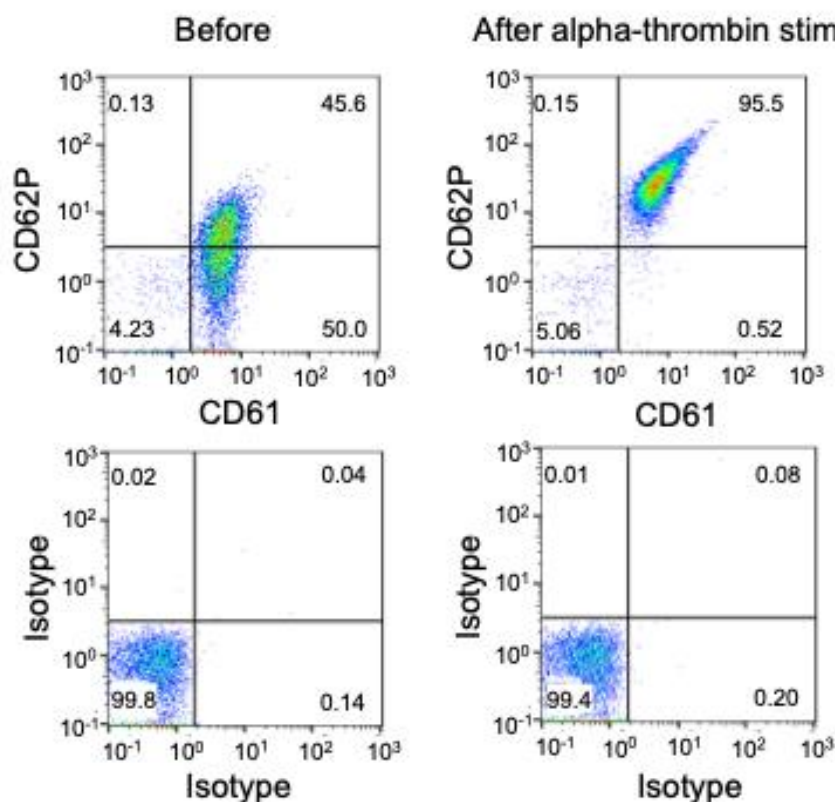


図12. 血小板溶液のCD61、CD62P発現の評価

抽出した血小板溶液の純度をCD61、活性度の評価をCD62Pで標識しFlow cytometryで評価した。

次に、非活性型血小板と活性化血小板のCD154発現を評価した。血小板は α -thrombinによって活性化した。血小板表面上のCD154発現は増加し(図13)、さらに、血小板溶液中のsoluble CD154濃度も上昇が確認された(図14)。

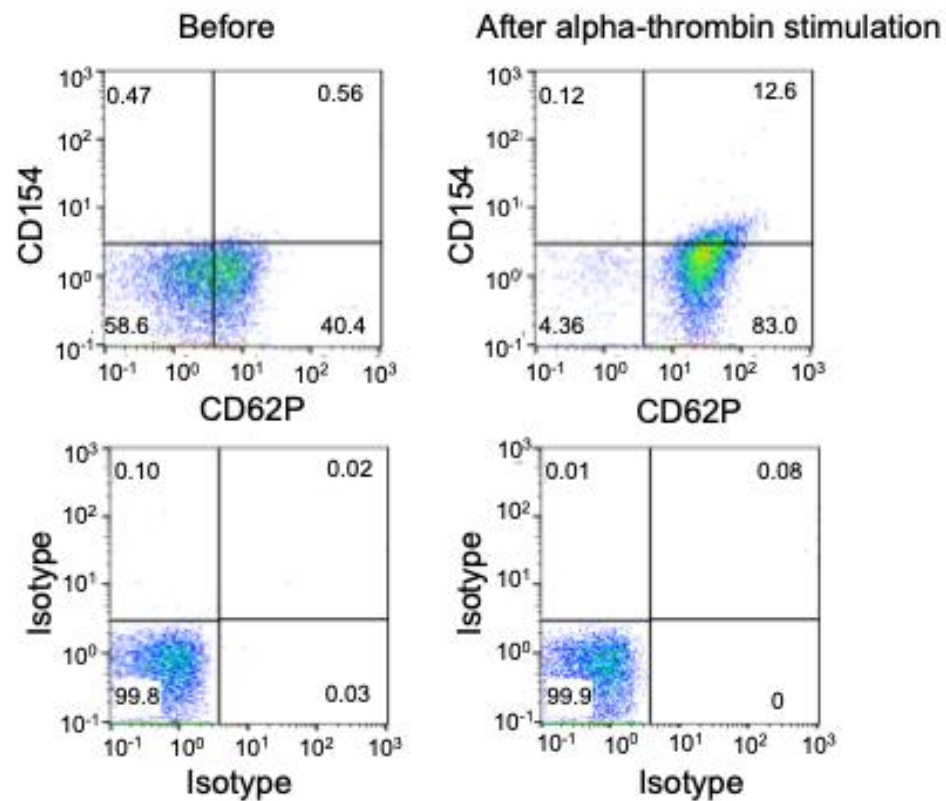


図13. 活性化処理前後での血小板表面のCD154発現の評価

α -thrombin刺激の前後で、血小板表面に発現するCD154をFlow cytometryで評価した。

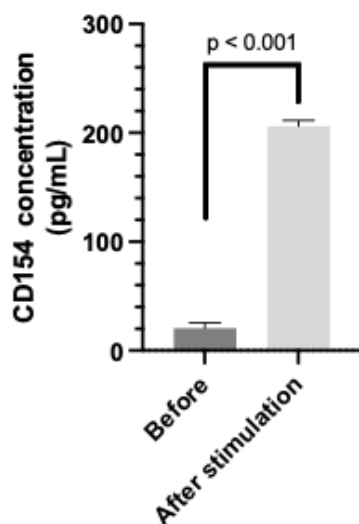


図14. 活性化処理前後での血小板溶液中のsoluble CD154発現の評価

α -thrombin刺激の前後で、血小板溶液中に存在するsoluble CD154をELISAで評価した。

続いて、4種類のTE細胞を血小板溶液と共培養し、血小板溶液とTE細胞との相互作用を観察した。24-well plateとトランスウェルを使用して共培養を行い、TE細胞中のMMP-9 mRNA量の変化を検証した。その結果、全てのTE細胞においてMMP-9 mRNAの発現上昇が確認され、特にCD40を過剰発現するTE-5およびTE-10細胞において有意差が認められた（図15）。

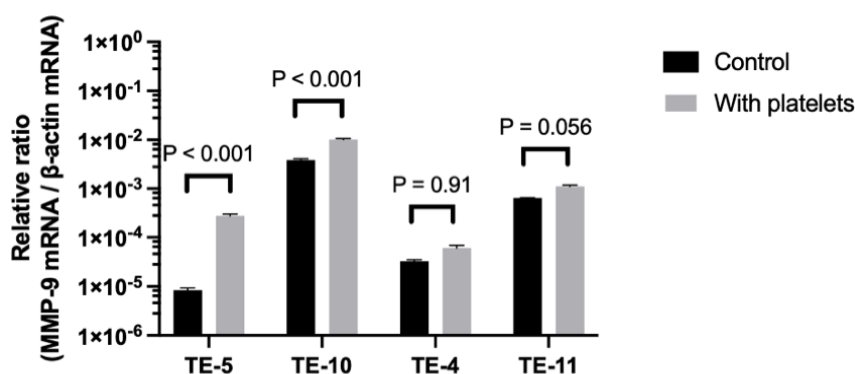


図15. TE細胞と活性型血小板溶液の共培養によるTE細胞中のMMP-9 mRNA量の変化

α-thrombin刺激により活性化した血小板溶液と4種類のTE細胞を共培養した。

7) 食道癌手術患者の血清中のMMP-9およびCD154濃度と生存期間の解析

これまでの結果から、食道癌患者血清中のMMP-9とCD154濃度が不良予後因子になると考えた。そこで、北海道大学病院消化器外科Ⅱにおいて2014年8月から2017年10月の期間に食道癌に対する根治的手術を施行された患者を対象に、血清MMP-9とCD154濃度を測定し、生存期間との関連を検討した。

症例は49例で年齢は中央値で67歳であった。46例が男性であった。93.9%が食道扁平上皮癌の患者であった。Ⅰ期食道癌が49.0%、Ⅱ期が18.3%、Ⅲ期が24.2%、Ⅳ期が8.2%であった。MMP-9濃度は 534.1 ± 384.3 ng/mL（平均値 ± 標準偏差）、CD154濃度は 2.15 ± 1.12 ng/mL（平均値 ± 標準偏差）であった。3年生存率は66.3%、3年無病生存率は58.5%であった（表4）。

表4. 患者背景

Factors	N = 49	%
Age, median (IQR)	67 (63-73.5)	
Sex		
Male	41	83.7
female	8	16.3
histopathological type		
Squamous cell carcinoma	46	93.9
adenocarcinoma	3	6.1
Pathological T		
1	31	63.3
2	2	4.1
3	14	28.6
4	2	4.1
Pathological N		
0	30	61.2
1	8	16.3
2	7	14.3
3	4	8.2
Pathological M		
0	49	100
Pathological stage, UICC 8th		
IA	8	16.3
IB	16	32.7
IIA	1	2.0
IIB	8	16.3
IIIA	1	2.0
IIIB	11	22.4
IVA	4	8.2
Platelet counts, $\times 10^3/\mu\text{L}$ (mean $\pm$ SD)	227.5 $\pm$ 65.0	
Serum MMP-9 level, ng/mL (mean $\pm$ SD)	534.1 $\pm$ 384.3	
Serum CD154 level, ng/mL (mean $\pm$ SD)	2.15 $\pm$ 1.12	
3-year Overall Survival	66.3%	
3-year Disease Free Survival	58.5%	

次に患者血清と生存期間の関連を検討した。MMP-9およびCD154濃度を中央値で二分し、生存期間との関連をKaplan–Meier曲線を用いて評価した。血清中MMP-9およびCD154濃度と生存期間の間に統計学的有意な関連は認められなかった（図16）。

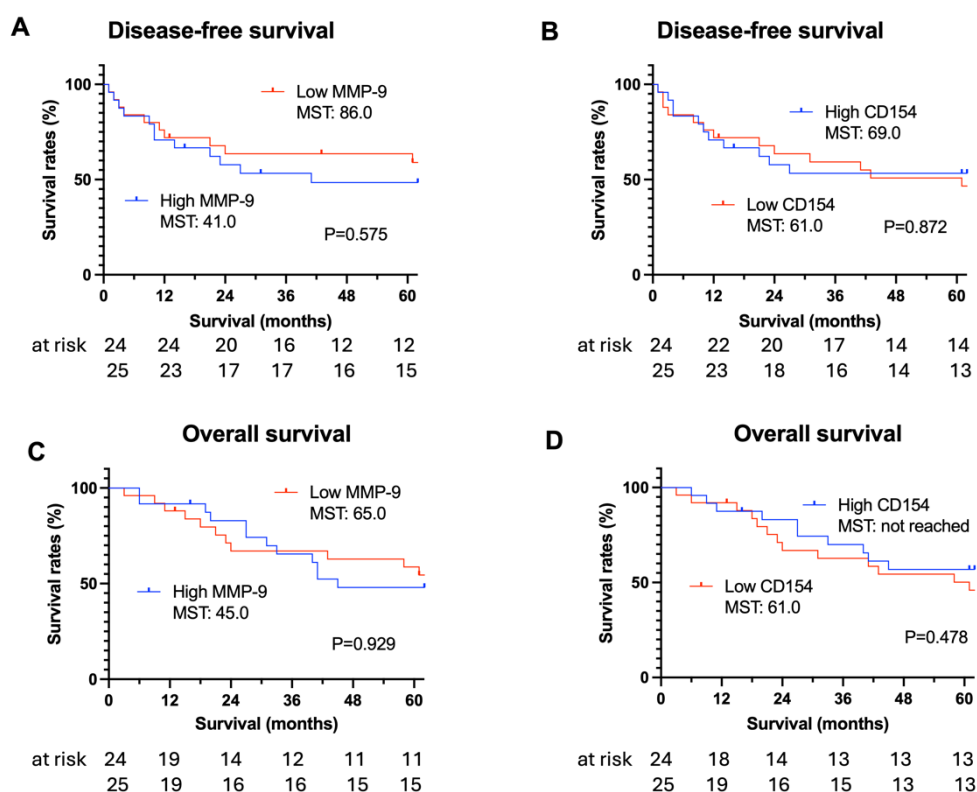


図16. 食道切除術を受けた患者の生存解析

血清MMP-9、CD154濃度と生存期間の解析。MST: median survival time

さらに、血清MMP-9濃度および血清CD154濃度と患者因子（年齢、性別、病期など）の相関関係を検討した。単変量解析ではMMP-9 highの患者群で血小板数が有意に多く、CD154 highの患者群で血小板数が多い傾向にあった（表5）。

表5. 単変量解析. 血清MMP-9濃度および血清CD154濃度と患者因子の相関関係

	CD154 high	CD154 low	<i>p</i> value
Sex, male	19 (79.2%)	22 (88%)	0.464
Age	69 (63-75)	67 (62-73)	0.447
pT, T1-2	17 (70.8%)	16 (64%)	0.610
pN, N0	15 (60%)	15 (62.5%)	0.858
pStage, pStage I	14 (58.33%)	15 (60.0%)	0.906
Platelet counts, $\times 10^3/\mu\text{L}$	243.5 (193.8-276.3)	205 (176.5-258.5)	0.073

	MMP-9 high	MMP-9 low	P value
Sex, male	20 (83.3%)	21 (84.0%)	1.000
Age	68 (62-75)	66 (63-72)	0.795
pT, T1-2	16 (66.7%)	17 (68.0%)	0.921
pN, N0	14 (58.3%)	16 (64.0%)	0.684
pStage, pStage I	13 (54.2%)	16 (64.0%)	0.484
Platelet counts, $\times 10^3/\mu\text{L}$	243.5 (205.3-278.8)	202 (176.5-258.5)	0.046

次に病期別に患者群をわけて、血清中MMP-9およびCD154濃度と生存期間の関連について検討した。pStage IおよびII-IVで層別化し生存期間を解析した。pStage Iの患者群での生存期間解析を図17A-Dに、pStage II-IVの患者群での生存期間解析を図16E-Hに示す。

pStage Iの患者群では、血清MMP-9レベルが低い場合に無病生存期間 ($p = 0.031$) および全生存期間 ($p = 0.024$) 改善の傾向が認められた (図17A, 17C) が、血清CD154レベルと生存期間に関連を認めなかった (図17B, 17D)。

その一方で、pStage II-IVの患者群では血清MMP-9レベルが低い場合、全生存期間の有意な短縮 ($p = 0.037$) が認められた (図17G)。無病生存期間との有意な関連は認めなかった (図17E)。血清CD154レベルについては、病期別に解析を行っても生存率との関連は認められなかった (図17F, 17H)。

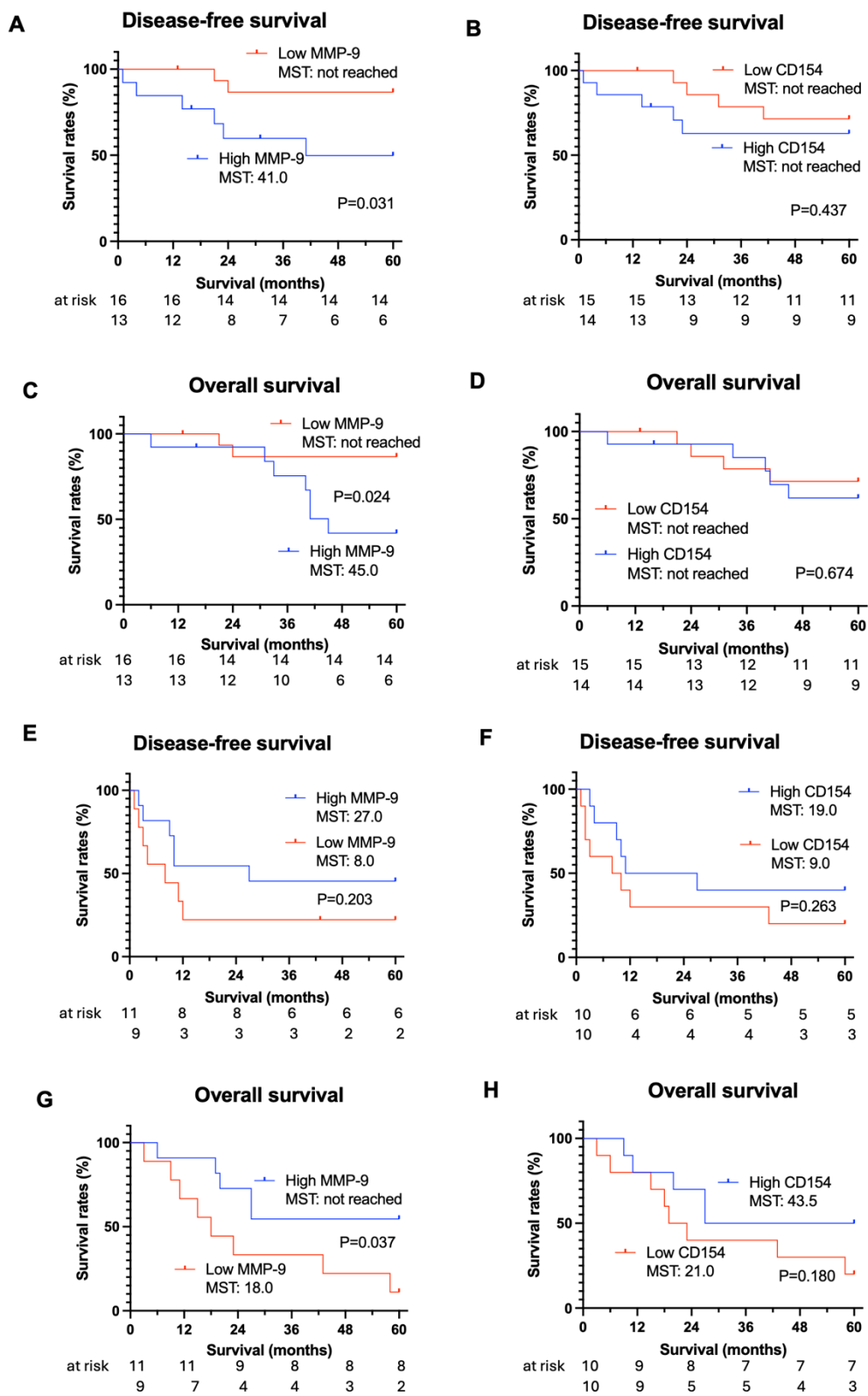


図17. 食道切除術を受けた患者の生存解析（病期別）

血清MMP-9、CD154濃度と生存期間の解析。MST: median survival time

考察

本研究では、いくつかの注目すべき知見が示された。まず、CD40-CD154相互作用が食道扁平上皮癌細胞においてMMP-9の分泌を著しく促進し、それによって細胞の遊走能および浸潤能が増加することが明らかになった。また、血小板がCD40を介した食道扁平上皮癌細胞のMMP-9分泌を増強する役割を果たすことが確認された（図18）。腫瘍細胞において、CD40-CD154相互作用はMMP-9を含む細胞外マトリックスリモデリングに関与する分子の分泌を誘導し、細胞浸潤、上皮間葉転換、および転移に寄与する。一方、免疫細胞においては、CD40-CD154相互作用が抗腫瘍免疫に関与し、癌細胞死を引き起こす。さらに、食道切除術を受けた患者の血清を対象とした生存期間解析から、病期によってMMP-9濃度と生存期間の間に相関が認められる可能性が示唆された。

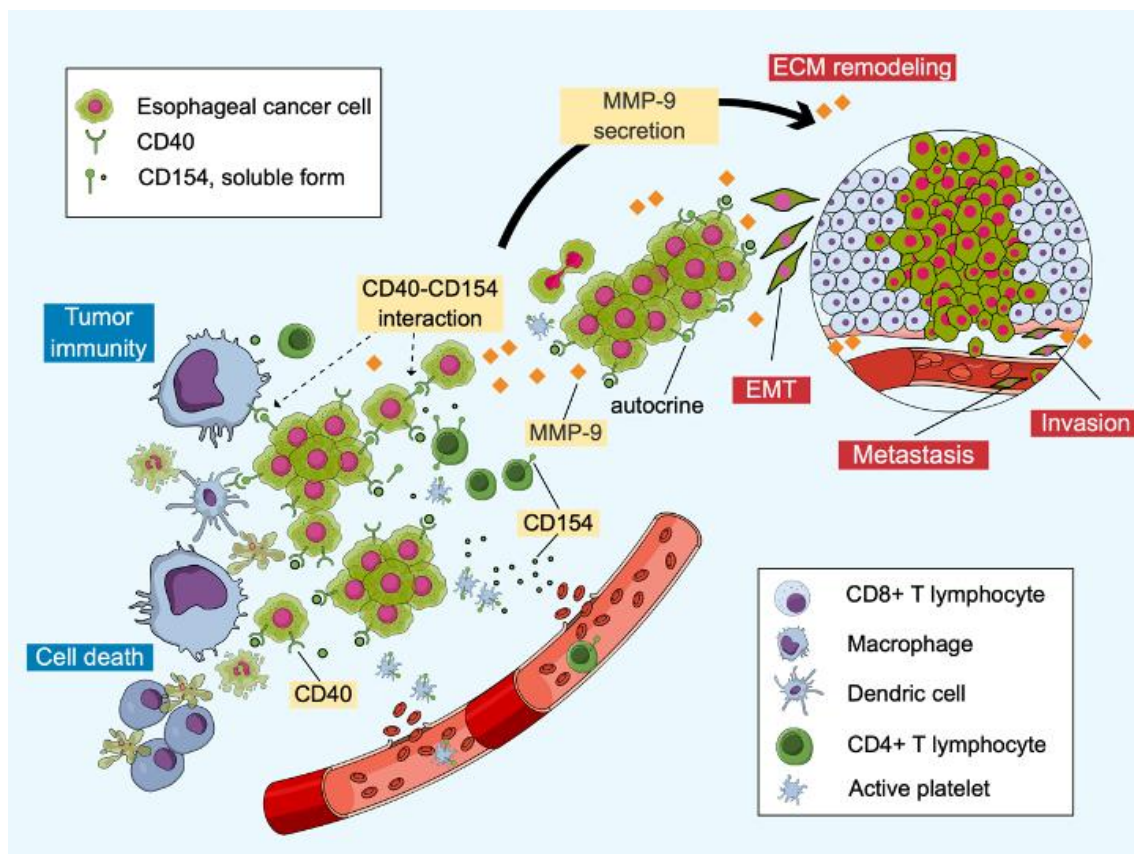


図18. MMP-9を介したCD40陽性食道癌細胞の浸潤・転移カスケード

ECM, Extracellular matrix EMT, Epithelial-Mesenchymal Transition

CD40はAPC上に発現し、抗腫瘍免疫を含む免疫応答において共刺激分子として重要な役割を果たす。しかし、CD40は癌細胞にも発現し、その活性化によってIL-8、IL-10、IL-12p40および腫瘍増殖因子 β (TGF- β) の分泌が増加し、アポトーシス回避や細胞増殖、免疫逃避に寄与することが知られている (Shoji Y et al, 2011; Chatzigeorgiou A et al, 2009)。本研究ではさらに、CD40-CD154相互作用がMMP-9、PLGおよびLAMC2といった細胞外マトリックスリモデリング分子の発現を亢進させ、これが癌の浸潤および転移に寄与することを示した。これらの知見は、癌細胞におけるCD40-CD154相互作用が癌細胞の増殖に有利な環境を作り出す可能性を示唆している。食道癌細胞におけるCD40の発現は予後不良因子であるが、この特徴がすべての癌種に当てはまるわけではない。たとえば、CD40およびCD154を共発現する膵癌細胞株では、CD40リガンドによる刺激が細胞増殖に影響を与えない一方で、CD40およびCD154を遮断する抗体による刺激は細胞増殖を抑制し、免疫調節性サイトカイン (IL-6、IL-10、IL-12p40) の分泌を減少させることが報告されている (Shoji Y et al, 2011)。このことは、CD40およびCD154を共発現する細胞株において、autocrineによるCD40活性が亢進し、癌細胞の浸潤を増加させる可能性を示唆している。これらの知見から、腫瘍微小環境におけるCD40-CD154相互作用においては、癌細胞自身によるautocrine型の活性化が無視できない要因となる可能性がある。本研究では、癌細胞由来CD154による自己刺激の直接的な機能評価には至らなかったが、今後の課題として、autocrineシグナルの有無とその生物学的意義について、より詳細な検討が求められる。

TMEにおけるCD40の発現は、腫瘍の浸潤、転移、さらには抗腫瘍免疫に影響を与える。癌細胞の浸潤と免疫のバランスは、宿主の血小板からのCD154分泌、癌細胞自体のCD154発現、さらに周囲リンパ球の応答に依存して変化する。そこで、TMEにおけるCD40-CD154相互作用の動態を明らかにするために、腫瘍細胞におけるCD40およびCD154発現の有無に基づいて4つのパターンに分類して考察する (表6)。まず、CD40とCD154がともに発現する場合、癌細胞、Tリンパ球、血小板間での自己分泌型シグナル伝達を通じてCD40-CD154相互作用が亢進し、腫瘍進行が著しく促進される。一方で、癌細胞由来のCD154がAPC上のCD40を刺激し、腫瘍免疫が増強されるため、浸潤促進と免疫増強のバランスが腫瘍の進行に影響を与える。この特徴は、メラノーマや腎癌においてCD40およびCD154の共発現が予後不良因子として働く研究結果と一致する (van den Oord J et al, 1996; Bussolati B et al, 2002)。次に、CD40のみが発現する場合、Tリンパ球や血小板からのCD154によりCD40-CD154相互作用が亢進し、腫瘍進行が促進されるが、腫瘍免疫には影響を与えない。この場合、癌細胞の

増殖が優勢となる。一方、CD154のみが発現する場合には、CD40-CD154相互作用は腫瘍進行に影響を与えないものの、癌細胞由来のCD154がAPC上のCD40を刺激し、腫瘍免疫が増強される。そのため、抗腫瘍免疫応答が優勢となり、例えば子宮頸癌ではCD154陽性が生存率改善と関連していることが知られている（Grazia GA et al, 2023）。最後に、CD40およびCD154のいずれも発現しない場合には、CD40-CD154相互作用が腫瘍進行および免疫に与える影響は認められない。

表6. CD40およびCD154発現パターンに基づく腫瘍進行および免疫応答の概略

	CD40 陽性	CD40 陰性
CD154 陽性	・ CD40-CD154 相互作用: autocrine および血小板/T 細胞由来 ・ 腫瘍進行: 強く促進 ・ 腫瘍免疫: 活性化 ・ 例: メラノーマ・腎癌（予後不良）	・ CD40-CD154 相互作用: APC 刺激による免疫活性化 ・ 腫瘍進行: 抑制（免疫活性） ・ 腫瘍免疫: 活性化 ・ 例: 子宮頸癌（生存率改善）
CD154 陰性	・ CD40-CD154 相互作用: 血小板/T 細胞由来 ・ 腫瘍進行: 促進 ・ 腫瘍免疫: 影響なし	・ CD40-CD154 相互作用: なし ・ 腫瘍進行: 影響なし ・ 腫瘍免疫: 影響なし

食道癌手術患者の血清サンプルを用いた生存解析では、興味深い結果が得られた。全体の患者において血清MMP-9または血清CD154濃度と生存率の間に有意な関連は認められなかったが、病期別に生存解析を実施すると血清MMP-9濃度と生存率に有意な相関が確認された。pStage Iの患者では高MMP-9濃度が予後不良と関連していた一方、pStage II-IVの患者では低MMP-9濃度が予後不良因子として特定された。この結果は、手術適応のある食道癌患者、すなわち遠隔転移のない患者ではMMP-9濃度が腫瘍の転移能を反映する可能性があることを示唆している。pStage Iの患者では高MMP-9はより高い転移能を有する病態を示唆するため予後不良を予測することとなる。一方で、pStage II-IVのすでに潜在的転移が成立している、もしくは進行している患者では、原発巣からの転移よりも転移部位での腫瘍増殖が優勢となっていることを低MMP-9濃度が反映している可能性がある。すなわちpStage II-IVの患者では、低MMP-9がより進行した病状を反映し、予後不良を予測しうる可能性を持つ。また、本研究の結果においてはpStage Iの高MMP-9群とpStage II-IVの高MMP-9群の予後は類似しており、これらの群は病期が異なるにもかかわらず、転移および浸潤に関する類似した生物学的特徴を共有している可能性が考えられる。MMP-9濃度と生存率との相関が病期に応じて逆転することは、転移カスケードの関与を反映している可

能性がある (Pantel K et al, 2004)。これらの観察結果を確認するためにはさらなる研究が必要であるが、MMP-9濃度は病期の進行期別に解釈することで予後バイオマーカーとしての可能性を有すると考える。

本研究は、CD40-CD154相互作用が食道扁平上皮癌細胞においてMMP-9発現を促進し、細胞の遊走能・浸潤能を亢進させることを示した点で、CD40が腫瘍の進展に直接的に関与する可能性を明らかにした重要な成果である。さらに、PI3K/Akt、MAPK、NF- κ Bなどのシグナル経路がその下流で活性化すること、血小板由来のCD154がCD40を介した腫瘍促進機構に寄与すること、加えて血清MMP-9濃度が病期別に予後との関連を示す可能性があることを示唆した。これらの知見は、CD40-CD154経路を標的とした新規治療戦略の可能性を示すものであり、今後の食道癌に対する個別化医療の発展に資する基盤情報となり得ると考える。

一方で、本研究は主に*in vitro*の細胞株を用いた解析に基づいており、腫瘍微小環境や免疫系との複雑な相互作用を十分に再現しているとは言い難い。特に、CD40は免疫応答にも関与する分子であり、その阻害が宿主の抗腫瘍免疫に与える影響については今後慎重に評価する必要がある。本研究では、CD40シグナルの下流シグナルとしてECMリモデリングに関与する40遺伝子を選択的に評価するという方法を採用したが、RNA sequenceなどを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行っていない点は、本研究の限界の一つである。今後、より広範な遺伝子群の解析を行うことで、MMP-9以外の新たな治療標的が見出される可能性がある。また、生存解析に用いた臨床データは単一施設かつ症例数の限られた後ろ向き研究であるため、バイアスの影響を受けている可能性があり、より大規模かつ前向きな研究による検証が求められる。

今後は、*in vivo*モデルや臨床サンプルを用いた検討を通じて、CD40-CD154経路の腫瘍微小環境における役割をより正確に評価するとともに、血小板との相互作用やMMP-9の臨床的有用性についても、より包括的な解析が必要である。本研究で得られた知見をもとにさらなる研究を展開することで、CD40を標的とした治療介入や予後予測の新たな手がかりが得られることが期待される。

結論

① 本研究から得られた新知見

本研究では、食道扁平上皮癌細胞における CD40-CD154 相互作用が MMP-9 の発現を促進し、細胞の浸潤・転移能を高めることを明らかにした。以下の 4 点が主な成果である。

1. CD40 陽性食道扁平上皮癌細胞で CD40-CD154 相互作用が MMP-9 発現を誘導し、細胞の遊走・浸潤能を亢進させた。
2. CD40-CD154 相互作用の下流シグナルは PI3K/Akt、MAPK、NF- κ B 経路が活性化していた。
3. 血小板由来 CD154 によって CD40 シグナルが活性化し、MMP-9 の発現がさらに増強された。
4. 食道癌患者の血清 MMP-9 濃度が病期に応じて異なる予後的意義を持つことを明らかにし、病期別のバイオマーカーとしての可能性を示唆した。

② 新知見の意義

CD40-CD154 相互作用は、免疫応答だけでなく癌細胞の浸潤・転移にも関与する可能性がある。本研究は、CD40 を標的とした新たな治療戦略の有効性と、血小板との相互作用による浸潤促進という新規メカニズムを示した。

③ 本研究から展開しうる今後の研究

本研究の成果を基に、以下のようなさらなる研究の展開が期待される。

1. CD40 シグナル阻害を標的とする治療法の開発と応用の検討
2. 血小板と癌細胞の相互作用に基づく治療戦略の確立
3. 血清 MMP-9 を予後予測バイオマーカーとする臨床研究の推進
4. CD40 発現の予後因子としての意義の他癌種への拡張的検討

④ 今後の課題

本研究の成果を基に、以下のようなさらなる研究の展開が期待される。

1. *in vitro* 研究の限界を補うため、*in vivo* モデルを用いた検証
2. 血清 MMP-9 の予後予測精度を高めるため、より大規模な臨床研究
3. CD40-CD154 経路の阻害が免疫系に与える影響を考慮した慎重な治療開発

本研究は、食道癌における CD40-CD154 相互作用の新たな役割を解明し、CD40 を標的とした治療戦略の可能性を示唆する重要な知見を提供した。今後、これらの知見

を基にさらなる研究を進めることで、食道癌の新規治療法開発に貢献することが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院外科学分野消化器外科学教室Ⅱ、平野 聡 教授に深く感謝致します。また研究全般にわたり直接御指導いただきました消化器外科学教室Ⅱ、中村 透 助教に深く感謝致します。また研究期間中に実験方法や科学的考察方法に関し御指導いただきました、北海道大学大学院消化器外科学教室Ⅱ 佐々木 勝則 客員研究員に深く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり御協力いただいた、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの皆様にも心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Bussolati B, Russo S, Deambrosis I, Cantaluppi V, Volpe A, Ferrando U and Camussi G (2002) Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int J Cancer* 100, 654-661.

Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A and Kamper E (2009) CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors* 35, 474-483.

Cooke PW, James ND, Ganesan R, Wallace M, Burton A and Young LS (1999) CD40 expression in bladder cancer. *J Pathol* 188, 38-43.

Gay LJ and Felding-Habermann B (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11, 123-134.

Grazia GA, Bastos DR and Villa LL (2023) CD40/CD40L expression and its prognostic value in cervical cancer. *Braz J Med Biol Res* 56, e13047.

Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V and Sood AK (2018) The platelet lifeline to cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Cell* 33, 965-983.

Ishikawa K, Miyamoto M, Yoshioka T, Kato T, Kaji M, Ohbuchi T, Hirano S, Itoh T, Dosaka-Akita H and Kondo S (2008) Up-regulation of CD40 with juxtacrine activity in human nonsmall lung cancer cells correlates with poor prognosis. *Cancer* 113, 530-541.

Li R, Chen WC, Pang XQ, Hua C, Li L and Zhang XG (2009) Expression of CD40 and CD40L in gastric cancer tissue and its clinical significance. *Int J Mol Sci* 10, 3900-3917.

Lim CY, Chang JH, Lee WS, Kim J and Park IY (2022) CD40 agonists alter the pancreatic cancer microenvironment by shifting the macrophage phenotype toward M1 and suppress human pancreatic cancer in organotypic slice cultures. *Gut and Liver* 16, 645-659.

Matsumura Y, Hiraoka K, Ishikawa K, Shoji Y, Noji T, Hontani K, Itoh T, Nakamura T, Tsuchikawa T, Shichinohe T, et al (2016) CD40 expression in human esophageal squamous cell Carcinoma is associated with tumor progression and lymph node metastasis. *Anticancer Res* 36,

4467-4475.

Pantel K and Brakenhoff RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4, 448-456.

Richards DM, Sefrin JP, Gieffers C, Hill O and Merz C (2020) Concepts for agonistic targeting of CD40 in immuno-oncology. *Hum Vaccin Immunother* 16, 377-387.

Sabel MS, Yamada M, Kawaguchi Y, Chen FA, Takita H and Bankert RB (2000) CD40 expression on human lung cancer correlates with metastatic spread. *Cancer Immunol Immunother* 49, 101-108.

Schlesinger M (2018) Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J Hematol Oncol* 11, 125

Schonbeck U and Libby P (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58, 4-43.

Shoji Y, Miyamoto M, Ishikawa K, Yoshioka T, Mishra R, Ichinokawa K, Matsumura Y, Itoh T, Shinohara T, Hirano S, et al (2011) The CD40-CD154 interaction would correlate with proliferation and immune escape in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 103, 230-238.

Tone M, Tone Y, Fairchild PJ, Wykes M and Waldmann H (2001) Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1751-1756.

van den Oord JJ, Maes A, Stas M, Nuyts J, Battocchio S, Kasran A, Garmyn M, De Wever I and De Wolf-Peeters C (1996) CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 149, 1953-1961.

van Kooten C and Banchereau J (2000) CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67, 2-17.

Watanabe M, Toh Y, Ishihara R, Kono K, Matsubara H, Miyazaki T, Morita M, Murakami K, Muro K, Numasaki H, et al (2023) Comprehensive registry of esophageal cancer in Japan, 2015. *Esophagus* 20, 1-28.

Xu W, Li Y, Yuan WW, Yin Y, Song WW, Wang Y, Huang QQ, Zhao WH and Wu JQ (2018) Membrane-bound CD40L promotes senescence and initiates senescence-associated secretory phenotype via NF-kappaB activation in lung adenocarcinoma. *Cell Physiol Biochem* 48, 1793-1803.

Yang H, Wang F, Hallemeier CL, Lerut T and Fu J (2024) Oesophageal cancer. *Lancet* 404, 1991-2005

国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」（人口動態統計） .
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/4_esophagus.html#anchor1 (2025 年 1 月 27 日参照)

食道癌診療ガイドライン検討委員会 (2022) 食道癌診療ガイドライン 2022 年版. 日本食道学会編（金原出版：東京）