



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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



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 梅本 一史

学位論文題名

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)

【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。