

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote the lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma

(癌関連線維芽細胞は食道扁平上皮癌のリンパ節転移を促進する)

賀島 肇、野間和広、大原利章、加藤卓也、桂 佑貴、河本 慧、佐藤浩明、勝部亮一、二宮卓之、田澤 大、白川靖博、藤原俊義

International Journal of Cancer (掲載予定)

主 論 文

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote the lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma

(癌関連線維芽細胞は食道扁平上皮癌のリンパ節転移を促進する)

【緒言】

癌悪性化の過程で腫瘍細胞は転移能を獲得し、多くの癌患者は主要臓器に転移した癌細胞によって死に至る。リンパ節転移は、腫瘍転移の特徴的な形態の一つであり、転移を克服することは、予後を改善するための重要な課題である。

食道癌は、世界で 8 番目に多い癌腫であり予後不良である。過去の研究では、食道癌の治療と予後に関して、主に腫瘍細胞そのものに重点が置かれてきた。しかし、近年の悪性腫瘍に対する免疫療法の革新と同様に、腫瘍微小環境 (Tumor microenvironment: TME) を標的とすることも、やはり癌治療において注目を集めるようになってきた。TME において、特に癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblasts: CAFs) は腫瘍進行において中心的役割を果たすと考えられている。

CAFs は TME において癌細胞を刺激し、腫瘍増殖、血管新生、薬物耐性、浸潤および転移を促進し、癌悪性化に寄与する。食道癌においては他の癌腫ほど CAFs との関連が議論されることはなく、特に CAFs がリンパ節転移に及ぼす影響に関する報告はほとんどない。

本研究では、食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma: ESCC) の臨床検体中の CAFs の存在が、リンパ節転移を促進し、予後不良と関連することを明らかにする。さらに、in vitro および同所性転移モデルを用いた in vivo の実験でその関係を検証する。

【材料と方法】

患者と組織検体

岡山大学病院で 2008 年から 2010 年の期間に手術を施行された食道癌患者の癌組織検体計 94 症例を研究対象とした。性別、年齢、腫瘍の位置、浸潤の深さ (T)、リンパ節転移 (N)、組織学的グレード、リンパ管侵襲、静脈浸潤、および再発について臨床および病理学的項目について検討した。TNM 分類は、UICC 第 7 版に準じて評価を行った。

使用した抗体について

免疫組織化学染色 (Immunohistochemical staining: IHC) に、抗 α SMA 抗体 (Sigma-Aldrich) および抗 FAP (Fibroblast activation protein) 抗体 (Novus) を使用した。またウエスタンブロッティングには抗ビメンチン抗体 (Cell Signaling Technology)、モノクローナル抗 MMP2 (Abcam)、ポリクローナル抗 α SMA (Abcam)、抗 FAP 抗体 (Abnova) および抗 β -actin (Sigma-Aldrich) を用いた。

IHC とその解析

脱パラフィン化後に、内因性ペルオキシダーゼ活性を消失させた。クエン酸緩衝液で抗原賦活化処理し、各切片を無血清ブロッキング試薬(Dako)で15分間ブロックした。抗体希釈液(Dako)で希釈した抗 SMA 抗体(1:1000 希釈)または抗 FAP 抗体(1:200 希釈)を室温でそれぞれ30 または 60 分間インキュベートした後、緩衝液で3回洗浄した。次いで、2次抗体試薬で30分間インキュベートした。DAB で発色させ、マイヤーヘマトキシリン試薬で対比染色した。

FAP スコアの評価

原発腫瘍における間質組織の FAP 染色の程度を、proportion score (0、染色なし、1 未満、10% 未満の染色、2 未満、30 未満、3 未満、60 未満、および 4 未満、60 未満)として半定量的に評価し、また intensity score (0、なし; 1、弱; 2、中間; および 3、強)としてその強度を評価した。FAP の proportion score を評価するために、ImageJ (NIH) を使用した。癌組織周囲の間質領域を顕微鏡下で 40 倍の倍率で観察し、染色領域を ImageJ で評価してスコアを算出した。最も強く染色された部位を評価して intensity score を決定した。proportion score と intensity score の組み合わせとして FAP スコアとした。FAP スコア 0 の患者は FAP 陰性群に、FAP スコア 2~3 の患者は低 FAP 群に、FAP スコア 4~7 の患者は高 FAP 群に分類した。

使用した cell line について

本研究ではヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE1、TE4 およびルシフェラーゼ発現 TE4 (TE4-luc))、ヒト食道腺癌細胞株 (OE19) およびヒト胎児食道線維芽細胞株 (FEF3) を用いた。

線維芽細胞の培養上清による食道癌細胞の活性化処理

食道癌細胞株をディッシュに播種し、一晚接着させ、細胞を PBS で 2 回洗浄し、次いで培地の交換を行った。72 時間後に上清を集め、遠心分離し、この上清を CM/cancer (例えば CM/TE4) とした。FEF3 細胞をこの CM/cancer と共に 48 時間インキュベートし、得られた CM を収集し、CM/CAF とした。食道癌細胞を活性化するために、それらを CM/CAF と共に 48 時間培養した。

遊走能および浸潤能の評価

遊走能アッセイでは、小孔付トランスウェルインサートを CM/CAF または正常培地を含むウェル上に置いた。食道癌細胞を播種し、24 時間反応させた。遊走細胞をクリスタルバイオレットで染色し、200 倍の倍率で異なる 5 つの視野を観察し移動細胞の数を視覚的に計数した。浸潤能アッセイにおいては、Matrigel (Corning) で被覆されたトランスウェルインサートを使用し、遊走能アッセイと同様の手順で実験を行った。

ウェスタンブロットティング

CM/Cancer で 72 時間培養および刺激した FEF3 の CAF マーカーの発現を検証した。細胞をホモジネートし遠心分離してタンパクを回収した。タンパク質を 40 μ g ずつ含むサンプルを用いて、電気泳動を行い、メンブレンに転写。一次抗体として α SMA、FAP、ビメンチン、MMP-2

を反応させた後に、二次抗体を反応させ、最終的にメンブレンを発光させて評価した。インサートウェルを用いた食道癌線維芽細胞共培養実験での MMP2 の発現も同様にウエスタンブロッティングで検証した。

同所リンパ節転移モデル

6 週齢の雌 BALB / c nu / nu マウスを用意した。上腹部正中に 7~10mm の皮切をおき開腹、胃を尾側に牽引し腹部食道が見えるようにした。30 ゲージの針をつけた 1ml シリンジで、Matrigel に懸濁した細胞液を腹部食道に注入した。対照群では TE4-luc 細胞をマウスに注入し、介入群では TE4-luc 細胞を CM / CAF で活性化し、活性化された FEF3 細胞と共接種した。腫瘍接種の 6 週間後に、全てのマウスを観察した。

マウスを用いた同所リンパ節転移モデルにおけるルシフェラーゼ活性の発光評価

腫瘍転移に対する CAFs の影響を評価するために、IVIS システム (Xenogen) を使い、画像解析および生物発光定量を Living Image ソフトウェアを用いて行った。接種後毎週、マウスの腫瘍細胞の発光強度を測定した。発光測定のため VivoGlo ルシフェリン (Promega) の腹腔内注射を行い、10 分後に画像評価を行った。

統計解析

相関関係は、ピアソンのカイ二乗検定または t 検定を適宜用いて解析、スピアマンの順位相関係数を計算した。Kaplan-Meier 法を用いて生存率 (OS および DFS) を解析した。単変量および多変量解析に Cox 比例ハザードモデルを用いた。リンパ節転移と各因子との関係の有意性を、多変量ロジスティック回帰分析によって OR として評価した。In vitro および in vivo での統計解析は、フィッシャーの厳密検定または t 検定を適宜用いて行った。P < 0.05 は統計的有意性を示した。すべての統計解析は、IBM SPSS Statistics (IBM) を用いて行った。

【結果】

腫瘍間質中に FAP 陽性 CAFs が存在することは食道扁平上皮癌患者の予後に関連する

食道癌臨床検体において FAP は腫瘍間質において特異的に発現した。proportion score と intensity score の組み合わせた FAP スコアを用いて腫瘍間質における FAP 発現を評価した。すべての症例を FAP スコアにしたがって 3 つのグループに分けた (4 以上は高 FAP、1 から 3 は低 FAP、0 は FAP 陰性)。FAP スコアは多変量解析において独立した予後因子ではなかったが、TNM 因子および FAP スコアは単変量解析において食道扁平上皮癌の予後因子として統計的有意性を示した。本研究では、T 因子のみが多変量解析における強力な予後因子であった。しかし、FAP スコアは、腫瘍深さ、リンパ節転移、静脈浸潤およびリンパ浸潤などのいくつかの臨床的特徴と有意に相関していた。FAP 発現は、OS および DFS の悪化と相関しており、特に、高 FAP 群では 5 年 DFS (58.6%) および OS (49.7%) であり、低 FAP 群および FAP 陰性群 (DFS: 80.4% and 100%, $p=0.017$; OS: 72.4% and 77.5%, $p=0.002$) より有意に予後不良であった。

FAP 陽性 CAFs は食道扁平上皮癌のリンパ節転移と関連する

リンパ節転移陽性群の 5 年 OS および DFS は、リンパ節転移陰性群と比較して不良であった (OS : HR 3.86, 95%CI : 1.94-12.7, $p = 0.001$; DFS : HR 4.97, 95%CI : 1.89-7.89, $p < 0.001$)。また、リンパ節陽性の症例の割合を FAP スコアで評価し、FAP スコアが上昇するにつれてリンパ節陽性症例の数が徐々に増加することを示した。FAP スコアはリンパ節転移陰性例では 2.4、転移陽性例では 4.6 であり有意な差を認めた ($p < 0.0001$)。さらに、FAP スコアはリンパ節転移の数と有意な相関を示し ($r = 0.448$, $p < 0.001$)、多変量解析において、リンパ節転移の独立した危険因子であった (オッズ比 : 3.84, 95%CI : 1.50-9.86, $p = 0.005$)。

活性化された繊維芽細胞は in vitro において食道癌の遊走能と浸潤能を高める

食道癌細胞によって活性化された FEF3 細胞は、非活性化 FEF3 細胞と比較して、SMA、FAP およびビメンチンを過剰発現した。CAFs によって刺激された癌細胞 (TE1、TE4 および OE19) は細胞間癒着を失い、間葉系の性質を獲得したが、CM / FEF3 ではほとんど変化がなかった。癌細胞の遊走能および浸潤能は、CM / CAF での培養で有意に亢進した ($p < 0.05$)。ウェスタンブロットで、CAFs 活性化に対応して、転移において重要な役割を果たす MMP2 の発現が著しく増加することがわかった。

CAFs は in vivo において食道癌の転移を促進する

ルシフェラーゼ標識 TE4 細胞単独または活性化 FEF3 細胞と混合した TE4 細胞をヌードマウスに同所接種しそれぞれ比較した。対照群では食道腫瘍のみ発光をしていたが、CAF 群のマウスは身体他の部位で発光を示し、これらはマウスが原発同所性腫瘍のみならず転移性腫瘍を有することを示した。CAF 群の総発光強度は、癌細胞接種後 3 週間目から対照群に比べて相対的に高かった。屠殺したマウスを開腹し、全体の発光強度から食道の原発腫瘍部位の発光強度を差し引くことによって転移領域の発光強度を計算すると、CAF 群は転移部位において対照群よりも発光強度が高かった ($p = 0.06$)。原発食道腫瘍の切片を観察し、CAF 群の腫瘍は対照群の腫瘍よりも多くの SMA 陽性間質細胞を有することも確認した。次に、IVIS システムにより転移の部位および数を分析した。CAF 群はすべてのマウスに転移形成を認め、リンパ節転移が 5 例、肝転移が 2 例、腹膜播種が 3 例であった。一方対照群は 5 匹のマウスのうち 3 匹に転移が認められたのみで、リンパ節転移を認めたものは 2 匹のみであった。これらより、CAF 群は、リンパ節転移の発生率が有意に高いことがわかった ($p < 0.01$)。さらにリンパ節転移の数を解析すると、臨床検体の解析結果と同様に、CAF 群では対照群よりも多いことがわかった。

【考察】

本研究において CAFs、つまり FAP 陽性間質細胞が、ESCC の臨床転帰、特にリンパ節転移および予後と関連することを実証した。さらにこれらの結果は、in vitro で食道癌細胞により活性化された胎児食道線維芽細胞を用いた CAFs モデルにおいて確認され、in vivo で同所移植マウスモデルにおいてリンパ節転移の促進が確認された。

FAP の発現状況を評価する方法として、強度・定量化の方法を組み合わせたスコアリングシステムを採用した。FAP スコアは確かな予後マーカーであり、患者の生存、腫瘍の進行と強く関連していることが示された。特に、この研究の主要テーマである LN 転移は、多変量解析において FAP スコアと有意に相関していた。さらに、我々の *in vitro* データは、癌細胞が CAFs による活性化によって転移能を獲得することを示し、これらの知見は *in vivo* の同所性マウスモデルの結果によって裏付けられた。

本研究におけるマウスモデルで、CAFs と癌細胞を共接種したすべてのマウスはリンパ節転移を認め、その数は有意に増加した。これらのデータは、CAFs と転移性リンパ節の数との間に相関が観察された臨床病理学的解析の結果と一致する。本研究は、臨床的検体から *in vitro* および *in vivo* までの一貫して我々の仮説と一致するデータを示しており、CAFs が腫瘍転移、特にリンパ節を促進することを示唆している。

しかしながら、本研究では CAFs の蓄積がリンパ節転移を促進するメカニズムまでは明らかにしていない。転移性の特徴の獲得の確認として MMP2 の過剰発現のみが示されているが、他の多くのシグナル伝達経路の関与が考えられる。また、今回 CAFs モデルとして用いたのは正常線維芽細胞を癌による刺激で活性化したものである。したがって、患者由来の異種移植片を使用することを含め、さらなる研究を行うべきである。

【結論】

我々のデータは、FAP 陽性 CAFs の蓄積が食道扁平上皮癌のリンパ節転移を促進することを示唆している。CAFs を標的とした治療は、将来の食道癌患者の転移を減らし、予後を改善することが期待できる。