



Title 論文題目	Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an IL-1 β -SAA1 axis (活性化マクロファージはIL-1 β -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する)
Author(s) 著者	須藤, 豪太
Degree number 学位記番号	甲第3158号
Degree name 学位の種別	博士(医学)
Issue Date 学位取得年月日	2022-03-31
Original Article 原著論文	Cancer Sci. 2021 Oct;112(10):4151-4165
Doc URL	
DOI	10.1111/cas.15080
Resource Version	Publisher Version

学位論文の内容の要旨

報告番号	甲第 1522 号	氏名	須藤 豪太
論文題名 Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an IL-1 β -SAA1 axis			
【研究目的】 大腸がんは早期発見により低侵襲な内視鏡治療で根治切除が可能である。近年、内視鏡治療の発展により、早期大腸がんの多くは大きさや部位によらず一括切除が可能となった。早期大腸がんの中でも粘膜下層浸潤がん (T1 大腸がん) は約 10%にリンパ節転移を伴うため、内視鏡治療後の病理結果に基づいてリンパ節郭清を伴う追加外科切除を検討する。しかし、現行の転移リスク層別化基準に従って内視鏡治療後に追加外科手術を行った T1 大腸がん症例の多くが過剰な外科治療となっており、より正確な層別化マーカーの開発が望まれている。 大腸がんは癌遺伝子、癌抑制遺伝子などのジェネティック、エピジェネティックな変化の蓄積により発生、進展すると考えられている。近年の大規模なトランスクリプトーム解析の結果、大腸がんはいくつかの分子サブタイプに分類され、臨床的な予後と関連することが明らかとなった。しかし、大腸がんの分子プロファイル解析の多くは進行大腸がんを対象としており、既に多数の染色体異常や遺伝子変異が蓄積していることから、早期大腸がんの浸潤に関与する分子異常を同定することは困難であった。 今回我々は、低分化成分 (POR) に着目して早期大腸がんの分子解析を行い、新たな治療層別化マーカーや、浸潤・転移を予防する治療標的を同定することを目的とした。			
【研究方法】 T1 大腸がんの臨床検体から POR と正常成分をレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションで分離し、RNA シークエンス法 (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を行った。Serum amyloid A1 (SAA1) およびマクロファージマーカーの発現を、免疫組織染色と定量 RT-PCR で解析した。また、早期大腸がんの臨床検体 97 例における SAA1 の発現と臨床病理学的特徴を検討した。大腸がん細胞を用いて、SAA1 のノックダウンあるいはレンチウイルスベクターによる過剰発現を行い、細胞増殖・遊走・浸潤に与える影響を、Cell viability assay、Boyden chamber assay、三次元培養システムを用いて解析した。THP-1 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を用いてマクロファージへ分化誘導し、大腸がん細胞とマクロファージの相互作用を共培養実験に			

より解析した。

【研究成績及び考察】

RNA-seq により、POR における SAA1 の有意な発現上昇が明らかになり、免疫組織染色により、T1 大腸がんの浸潤先進部の POR で SAA1 が特異的に高発現していることが確認された。大腸がん細胞における SAA1 のノックダウンは、増殖に影響を与えなかったが、遊走・浸潤を抑制した。逆に SAA1 の過剰発現は、大腸がん細胞の遊走・浸潤を促進した。大腸がん細胞とマクロファージの共培養実験により、マクロファージが産生するインターロイキン 1 β (IL-1 β) が、大腸がん細胞の SAA1 発現を誘導することが示された。マクロファージによる大腸がん細胞の遊走・浸潤の促進は、SAA1 のノックダウンや、IL-1 β に対する中和抗体によって抑制された。さらに、T1 大腸がんの臨床検体を用いた免疫組織染色解析から、SAA1 陽性の浸潤先進部における M1/M2 マクロファージの集積が確認された。また大腸がん細胞が産生する SAA1 は、マクロファージの MMP-9 の発現を促進した。免疫染色から、SAA1 陽性の浸潤先進部ではマクロファージおよび好中球による MMP-9 発現が確認された。これらの結果から、T1 大腸がんの浸潤先進部では、マクロファージと大腸がん細胞が、IL-1 β と SAA1 を介して相互作用することにより、浸潤が促進されると考えられた。

SAA1 は肝細胞で産生される炎症マーカーとして有名だが、がんとの関わりも明らかにされつつある。がん患者血清中の SAA1 上昇は以前から知られており、また大腸がん細胞株や大腸がん組織における SAA1 の発現上昇も報告がある (Br J Cancer, 2000; J Histochem Cytochem, 2006)。がんにおける SAA1 の機能は長年不明であったが、近年、マウスがん細胞において SAA1 が NF- κ B シグナルによって誘導され、浸潤・転移を促進することや (Oncogene, 2015)、肺がんモデルマウスで SAA1 が転移を促進すること (Cancer Res, 2017)、NF- κ B シグナルを介した IL-1 誘導性の SAA1 が、トリプルネガティブ乳癌の進行度や死亡率と相関すること (Oncotarget, 2019) が報告されている。更に本研究の結果から、浸潤先進部における SAA1 の高発現が早期大腸がんの浸潤に関与することが強く示唆された。

IL-1 β は大腸の炎症、発がん、浸潤に関連することが知られている。IL-1 β による大腸がんの浸潤促進は、ZEB1 の発現上昇や間質の COX-2 シグナルの活性化など、複数の機序を介することが報告されている。加えて本研究の結果は、IL-1 β が SAA1 を介して大腸がん細胞の遊走、浸潤を促進することを明らかとした。

がん微小環境において、腫瘍関連マクロファージ (TAM) は IL-1 β の重要な供給源である。マクロファージは、classically activated (M1 または proinflammatory) タイプと alternatively activated (M2 または anti-inflammatory) タイプに分類されることが知られている。多くの研究で TAM は M2 マクロファージに類似すると報告されているが、近年では腫瘍の進展に伴い M1 から M2 へ変化するとも考えられている (Curr Opin Immunol,

2010)。最近、大腸がん細胞由来の conditioned medium で THP-1 細胞を分化させると、M1 マクロファージと M2 マクロファージが混在した集団に分化することが報告された (Front Immunol, 2019)。大腸がんにおける TAM の臨床的意義については多くの研究が行われ、がんの発生初期には腫瘍免疫を担い腫瘍抑制的に機能し、一旦がんが形成されると腫瘍促進的に機能すると考えられている (Immunity, 2014)。本研究では、早期大腸がんの浸潤先進部において M1 マクロファージが腫瘍促進的に機能している可能性が示唆された。

これまでの研究で、IV型コラゲナーゼである MMP-9 は大腸がん浸潤先進部に存在する好中球やマクロファージなどの間質細胞で発現が上昇し、がんの浸潤に関与している可能性が示唆されている (Br J Cancer, 1996; Int J Cancer, 1996; Mol Cancer Res, 2006)。また、SAA1 は NF- κ B シグナルを介して、THP-1 細胞の MMP-9 の発現を誘導することが報告されている (Biochem Biophys Res Commun, 2005)。本研究では、がん細胞の産生する SAA1 が腫瘍関連マクロファージの MMP-9 発現を誘導するメカニズムが明らかとなった。がん細胞の SAA1 高発現が浸潤や転移を促すことは、近年の研究で示されているが、SAA1 を介したがん微小環境の細胞間クロストークについてはほとんど報告がなく、本研究の最も独自の点である。

本研究の結果、SAA1 は早期大腸がんのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、臨床的な有用性や、予後との関連などについては不明である。本研究では SAA1 が大腸がん細胞の遊走、浸潤を促進することを示したが、その分子メカニズムは十分には解明されていない。また、SAA1 の発現と大腸がんの分化度が強く相関することを明らかにしたが、そのメカニズムは不明である。これらを明らかにするため、今後は多数例の臨床検体および動物モデルを用いて、更なる研究が望まれる。

結論

早期大腸がん浸潤先進部において、腫瘍関連マクロファージとがん細胞が IL-1 β -SAA1 axis を介して相互作用し、浸潤を促進することが明らかとなった。SAA1 は、早期大腸がんの治療層別化マーカーおよび浸潤・転移を予防する治療標的なる可能性が示唆された。

- (注) 1 学位論文の内容の要旨は、研究目的・研究方法・研究成績・考察・結論等とし、簡潔に要約すること。
- 2 報告番号は記入しないこと。
 - 3 2 頁目からも外枠だけは必ず付けること。

論文審査の要旨及び担当者

(2022年3月31日授与)

報告番号	甲第 1522 号	氏 名	須藤 豪太
論文審査 担当者	主査 仲瀬 裕志 教授	副査 鈴木 拓 教授	
	副査 鳥越 俊彦 教授	委員 小山内 誠 教授	

論文題名	Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an IL-1 β -SAA1 axis
------	--

結果の要旨

粘膜下層への浸潤・転移は、早期大腸がんの治療方針を決定する上で重要な問題である。本研究は、低分化成分（POR）に着目して早期大腸がんの分子解析を行い、新規バイオマーカーや治療標的を同定することを目的として行われた。まず、T1 大腸がんの臨床検体から POR と正常成分を分離して RNA-seq を行い、POR での serum amyloid A1 (SAA1) の高発現を同定した。次に、免疫組織染色で T1 大腸がん浸潤先進部の POR における SAA1 の高発現を確認した。大腸がん細胞株を用いた機能解析の結果、SAA1 の過剰発現は、大腸がん細胞の遊走・浸潤を促進した。共培養実験により、大腸がん細胞がマクロファージのインターロイキン 18 (IL-18) 産生を促し、かつ IL-18 が大腸がん細胞の SAA1 発現を誘導することが示唆された。さらに、大腸がん細胞由来の SAA1 は、マクロファージの MMP9 の発現を促進した。これらの細胞実験の結果は、臨床検体の免疫組織染色により確認された。本研究から、T1 大腸がんの浸潤先進部では、マクロファージとがん細胞が IL-18-SAA1 axis を介して相互作用することで浸潤を促進すると考えられ、SAA1 が早期大腸がんの治療層別化マーカーおよび治療標的となる可能性が示唆された。今後は多数の臨床検体や動物モデルを用いて更なる研究が望まれる。

本研究は、博士（医学）の学位授与に十分な内容との評価を審査委員全員より頂いた。