

京都大学	博士（医学）	氏名	尾川 諒太郎
論文題目	Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis (大腸癌の SMAD4 欠損によりケモカイン CXCL1/8 が分泌され、CXCR2 陽性腫瘍関連好中球が集積し、腫瘍の増殖に関与する)		
(論文内容の要旨) 大腸癌における癌抑制遺伝子の一つである SMAD4 は TGFβ シグナルの中心的な転写因子であり、最近では SMAD4 欠損により腫瘍から様々なサイトカイン・ケモカインが分泌され腫瘍微小環境に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。消化管外科学講座ではこれまでに SMAD4 陰性大腸癌において腫瘍関連好中球 (tumor-associated neutrophil: TAN) や骨髄由来免疫抑制細胞などの骨髄球が CCL15-CCR1 axis を介して腫瘍周囲に集積し浸潤・転移を促進する機序について報告してきた。 骨髄球は数種類のケモカイン受容体を発現していることから、大腸癌の癌微小環境において CCL15-CCR1 axis 以外のケモカイン・シグナルが関与する可能性が考えられる。その仮説のもと、はじめに SMAD4 発現が正常な大腸癌細胞株と SMAD4 発現を抑制した細胞株とを用いてケモカイン・アレイでスクリーニングしたところ、SMAD4 発現を抑制することで大腸癌細胞から特に発現誘導されるケモカインとして CXCL1 と CXCL8 があることを見出した。これらのケモカインの受容体である CXCR2 は好中球で発現しており、また大腸癌細胞株の培養上清を用いた migration assay にて好中球が CXCL1/8-CXCR2 axis を介して SMAD4 陰性大腸癌へ遊走することが明らかとなった。さらに SMAD4 陰性大腸癌細胞株の培養上清で好中球を共培養してのちにケモカイン・アレイ、サイトカイン・アレイを行ったところ、好中球自身からも CXCL1 や CXCL8 が大量に発現誘導されることを見出した。 大腸癌臨床検体(99 例)を用いた検討では、SMAD4 陰性大腸癌では陽性大腸癌に比べ、好中球 (CD66b 陽性) の腫瘍浸潤が多い傾向にあった ($P=0.05$)。さらに、SMAD4 陰性かつ浸潤好中球数が多い群は、少ない群と比べ有意に予後が悪かった ($P<0.05$)。蛍光免疫染色の検討からは、腫瘍に浸潤している好中球は CXCL1、CXCL8 の発現に加えて、マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP2、MMP9) や免疫抑制酵素 (ARG1、IDO) らを発現していることが明らかとなった。大腸癌患者の術前血清(125 例)を用いた ELISA の検討では、CXCL8 はコントロール群 (健康人) に比べ Stage II/III で有意に高値となること ($P<0.05$)、さらに CXCL8 高値群は低値群と比べ全生存期間、無再発生存期間ともに悪い傾向にあること ($P=0.07$, $P=0.08$)、が明らかとなった。一方、CXCL1 についてはそのような予後との関連は確認されなかった。 大腸癌では、SMAD4 欠損により大腸癌細胞より CXCL1、CXCL8 の発現が誘導され、その結果 CXCR2 陽性 TAN が腫瘍周囲に集積する。腫瘍に集積してきた TAN 自身も CXCL1、CXCL8 を分泌することで更に多くの CXCR2 陽性 TAN が集積される、という CXCL1/8-CXCR2 axis を介したサイトカイン/ケモカイン・カスケードの形成が大腸癌の浸潤・転移を促進する機序が明らかとなった。また血清中の CXCL8 値は大腸癌における新たな予後マーカーになりえることも示唆された。以上より、CXCL1/8-CXCR2 axis を阻害することは SMAD4 陰性大腸癌に対する新規治療ターゲットとなることが期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

大腸癌における SMAD4 欠損が腫瘍微小環境に及ぼす影響については近年注目されており、本申請者らの教室でも今までに CCR1 陽性骨髄球の役割について研究してきた。骨髄球は数種類のケモカイン受容体を発現しており、CCR1 以外のケモカイン受容体も関与している可能性がある。

本申請者らは SMAD4 発現大腸癌細胞株と SMAD4 発現を抑制した細胞株とを用いてケモカインアレイでスクリーニングしたところ、SMAD4 発現を抑制することで発現誘導されるケモカインとして CXCL1 と CXCL8 があることを見出した。これらのケモカインの受容体である CXCR2 は好中球で発現しており、大腸癌細胞株の培養上清を用いたアッセイにて CXCL1/8-CXCR2 axis が好中球の遊走に関与し、また好中球自身からも CXCL1 や CXCL8 が大量に発現誘導されることを見出した。臨床検体を用いた検討では、腫瘍に浸潤している好中球は CXCL1、CXCL8 の発現に加え、MMP2/9 や免疫抑制酵素 (ARG1、IDO) を発現していた。さらに術前血清を用いた ELISA の検討では、CXCL8 は Stage II/III で有意に高値であることや、CXCL8 高値群は低値群と比べ全生存期間、無再発生存期間ともに悪い傾向にあることが明らかとなった。

以上より、SMAD4 陰性大腸癌において CXCL1/8-CXCR2 axis は腫瘍関連好中球を介して腫瘍の浸潤、転移に関わっていること、また血清中 CXCL8 は大腸癌における新たな予後マーカーになりえることが示唆された。

以上の研究は大腸癌の腫瘍微小環境における好中球の役割の解明に貢献し、大腸癌に対する新たな治療戦略に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和元年 11 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降