

京都大学	博士（医学）	氏名	住友 亮太
論文題目	M2-like tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition through the transforming growth factor $\beta$ /Smad/zinc finger e-box binding homeobox pathway with increased metastatic potential and tumor cell proliferation in lung squamous cell carcinoma (M2様腫瘍関連マクロファージはTGF- $\beta$ /Smad/ZEB経路を介して肺扁平上皮癌の上皮間葉転換を促進し転移能を高めるとともに腫瘍細胞の増殖を促進する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>肺腺癌に比べ肺扁平上皮癌の治療薬は限られている。さて上皮間葉転換(EMT)は癌の浸潤や転移の重要なステップの一つである。一方、腫瘍関連マクロファージ(TAM)は腫瘍抑制的に働くM1型、腫瘍促進的に働くM2型が知られており、腫瘍微小環境において重要な役割を担っている。肺扁平上皮癌のEMTに対してTAMが与える影響は不明であり、臨床病理学的、基礎的に検討した。まず京都大学医学部附属病院で完全切除された肺扁平上皮癌患者221例の手術切除標本のパラフィン包埋ブロックから組織マイクロアレイを作成した。EMTの評価のため上皮系マーカーとしてE-cadherin、間葉系マーカーとしてvimentinの発現を免疫染色法で評価した。また抗iNOS抗体を用いてM1-like TAM、抗CD163抗体を用いてM2-like TAMを免疫染色法で評価し、腫瘍間質と腫瘍内の細胞密度をそれぞれ算出した。その結果、腫瘍間質のM2-like TAM密度と腫瘍径(P=0.042)、pT因子(P=0.030)、病理病期(P=0.014)の間に有意な正の関連を認めた。腫瘍間質のM2-like TAM密度と腫瘍のvimentin発現に有意な関連を認めた(P&lt;0.001)。更にM2-like TAM高密度群はM2-like TAM低密度群と比べ全生存率が有意に低かった(P=0.0174)。次にオンライン上で公開されている非小細胞肺癌185検体のsingle-cell RNA sequencingデータを解析したところ、肺扁平上皮癌においてTGF-<math>\beta</math>1の発現は主にマクロファージに局限していることが分かった。これらの結果から、TAMから分泌されたTGF-<math>\beta</math>が肺扁平上皮癌のEMTを誘導しているのではないかと考え、基礎実験を行なった。phorbol 12-myristate 13-acetateを用いてヒト単球細胞株(THP-1)をunstimulated macrophageへと誘導した。2種類のヒト肺扁平上皮癌細胞株(H226, EBC-1)とunstimulated macrophageを48時間非接触性共培養することでTAMを作成した。またpositive controlとしてunstimulated macrophageをIL-4, IL-13とともに48時間培養しM2-like macrophageを誘導した。その結果、TAMではCD163, CD206, VEGF, TGF-<math>\beta</math>1の蛋白発現が上昇しており、TAMはM2-likeなphenotypeを呈した。また細胞培養液中のTGF-<math>\beta</math>1濃度をELISA法で測定すると、unstimulated macrophageの培養液に比べTAMの培養液中のTGF-<math>\beta</math>1濃度が有意に高いことが確認できた。次にH226及びEBC-1をそれぞれのTAMと48時間非接触性共培養することでEMTが誘導されるか検証した。その結果、共培養されたH226及びEBC-1ではE-cadherin蛋白発現の減少とvimentin蛋白発現の上昇、EMT-transcription factorであるリン酸化Smad3及びZEB familyの蛋白発現の上昇を認め、TAMと共培養したH226及びEBC-1にEMTが誘導されていた。またTGF-<math>\beta</math>1による刺激でH226及びEBC-1にEMTが誘導され、TGF-<math>\beta</math>受容体阻害薬であるRepSoxの存在下にTAMとH226及びEBC-1を共培養するとEMTが抑制されることも確認できた。これらの結果から、TAMはTGF-<math>\beta</math>/Smad/ZEB経路を介してH226及びEBC-1にEMTを誘導していると結論づけた。そしてMigration assay, Invasion assayにより、TAMと共培養されたH226及びEBC-1では遊走・浸潤能の向上が確認された。またTAMとの共培養によってH226及びEBC-1の細胞増殖が向上した。以上の結果から、TAMが肺扁平上皮癌のEMTや腫瘍増殖を誘導している可能性が示唆された。上記結果は肺扁平上皮癌の新規治療薬開発に寄与する可能性がある。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

肺扁平上皮癌の上皮間葉転換(EMT)に対し腫瘍関連マクロファージ(TAM)が与える影響について研究した。肺扁平上皮癌 221 例から組織マイクロアレイを作成し、免疫染色法で臨床病理学的に評価した。その結果、腫瘍間質の M2-like TAM 密度は腫瘍径、pT 因子、病理病期、腫瘍の vimentin 発現、予後の悪化と有意に関連していた。またオンライン上で公開されている非小細胞肺癌 185 検体の single-cell RNA sequencing データの解析から、肺扁平上皮癌における TGF- $\beta$ 1 発現は主にマクロファージに局限していることが分かった。これらの結果から、TAM から分泌された TGF- $\beta$ が肺扁平上皮癌の EMT を誘導していると考え、基礎実験を行なった。phorbol 12-myristate 13-acetate を用いてヒト単球性白血病細胞株(THP-1)を unstimulated macrophage へ誘導し IL-4, IL-13 とともに 48 時間培養して M2-like macrophage を作成した。unstimulated macrophage とヒト肺扁平上皮癌細胞株(H226, EBC-1)を 48 時間非接触性共培養することで TAM を作成した。TAM は M2-like な phenotype を呈し、TGF- $\beta$ 1 の分泌能が亢進していた。TAM と共培養された H226 及び EBC-1 では TGF- $\beta$ /Smad/ZEB 経路を介して EMT が誘導されていた。さらに migration/invasion assay, 細胞増殖試験により、TAM と共培養された H226 及び EBC-1 では遊走・浸潤能と細胞増殖能の向上が確認された。以上の結果から、TAM が肺扁平上皮癌の EMT や腫瘍増殖を誘導している可能性が示唆された。

以上の研究は肺扁平上皮癌の EMT における TAM の役割の解明に貢献し肺扁平上皮癌の新規治療薬開発の可能性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 6 年 2 月 8 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