

京都大学	博士（医学）	氏 名	板 谷 喜 朗
論文題目	Loss of Smad4 From Colorectal Cancer Cells Promotes CCL15 Expression to Recruit CCR1+ Myeloid Cells and Facilitate Liver Metastasis (大腸癌細胞での Smad4 欠損により CCL15 の発現が誘導され、CCR1+骨髄由来細胞が集積し肝転移が促進される)		
[論文内容の要旨]			
(目的、方法)<i>SMAD4</i>は TGF-β シグナル伝達経路の転写因子で、大腸癌や膵癌の癌抑制遺伝子として知られ、Smad4 タンパクの発現低下を伴う大腸癌では臨床予後が悪いと報告されている。また、大腸癌モデルである <i>Apc/Smad4</i> 変異マウスでは、大腸癌細胞がケモカイン CCL9(ヒトでは CCL15 が相同遺伝子)を分泌し、癌浸潤部先端にケモカイン受容体 CCR1 陽性の骨髄球が集積し、癌細胞の浸潤を促進する。さらに肝転移マウスモデルを用いた検討では、肝臓に播種した癌細胞が分泌するケモカイン CCL15 は CCR1 陽性骨髄球を肝転移巣周囲に引き寄せ、MMP2/9 を分泌し周辺組織を消化・融解することで肝転移巣の増大を促進させ、CCR1 阻害剤投与により大腸癌肝転移は抑制され延命効果がもたらされる。以上の癌浸潤および肝転移メカニズムがヒト大腸癌の肝転移にも当てはまるかを、ヒト大腸癌細胞株、臨床切除標本を用いて検討した。			
(結果) ヒト大腸癌細胞株では <i>SMAD4</i> を knockdown および over-expression させることで CCL15 の発現がそれぞれ増加、および減少した。さらに <i>CCL15</i> 遺伝子のプロモーター解析では、転写開始点より上流 141 塩基の部位にある SBE (Smad binding element) と上流 31 塩基の部位にある TIE (TGF-β inhibitory element)が <i>CCL15</i> 発現を主に調整しており、さらに ChIP assay で Smad4 が <i>CCL15</i> のプロモーターに直接結合していることが確認された。次に、ルシフェラーゼを発現させた大腸癌細胞株を肝転移マウスモデルに使用して bioluminescent imaging で肝転移巣の増大を経時的に評価したところ、<i>SMAD4</i> を knockdown した癌細胞では肝転移が促進され、Smad4 を over-expression した癌細胞ではそれが抑制された。さらに免疫組織染色の検討では Smad4 欠損大腸癌では CCL15 の発現が増加し、肝転移巣周囲への CCR1 陽性骨髄球の集積が確認された。マウスで観察された現象が実際のヒト大腸癌肝転移において当てはまるかを検証するために、大腸癌肝転移の臨床切除標本（141 サンプル）を用いて免疫組織染色で検討したところ、肝転移巣における Smad4 と CCL15 の発現には有意な逆相関が認められた($P < 0.01$)。CCL15 陽性の大腸癌肝転移巣では、CCL15 陰性のものに比べて転移巣周囲に集族する CCR1 陽性骨髄球が 3 倍以上に有意に増加しており ($P < 0.01$)、また腫瘍径の小さいものほど集族数が多かった ($P < 0.01$)。さらに治癒切除手術が行われた症例（44 例）での無病生存期間（disease free survival）を検討したところ、CCL15 陽性の大腸癌肝転移巣では CCL15 陰性のものに比べ有意に延長していた($P = 0.04$)。			
(結語) ヒト大腸癌細胞において Smad4 が CCL15 の発現を直接負に制御する分子機序が明らかになった。マウスを用いた肝転移モデルによって、Smad4 の欠			

損により大腸癌細胞における CCL15 の発現が上昇し、転移巣周囲へ CCR1 陽性骨髄球の集積が増加することで肝転移が促進されることが示された。さらに臨床切除標本を用いた解析により、大腸癌肝転移形成の早期の段階から CCR1 陽性骨髄球が関与している可能性が示唆された。大腸癌肝転移巣では約 70%に Smad4 の発現低下を認めたが、これらの患者においては CCR1 阻害剤が大腸癌肝転移抑制に結びつく可能性が期待される。
（論文審査の結果の要旨） 大腸癌モデルである <i>Apc/Smad4</i> 変異マウスでは、癌細胞がケモカイン CCL9(ヒトでは CCL15 が相同遺伝子)を分泌し、癌浸潤先端にケモカイン受容体 CCR1 陽性骨髄球が集積し浸潤を促進する。CCL15 陽性大腸癌細胞株を用いた肝転移モデルマウスでも同様に CCR1 陽性骨髄球が転移巣周囲へ集積し、CCR1 阻害剤で肝転移が抑制される。マウスで示されたこの大腸癌肝転移メカニズムがヒトにも当てはまるかを、ヒト大腸癌細胞株、臨床切除標本を用いて検討した。ヒト大腸癌細胞株では <i>SMAD4</i> を knockdown および overexpression させることで CCL15 の発現がそれぞれ増加および減少した。また、ChIP assay や luciferase reporter assay で、Smad4 が <i>CCL15</i> の promoter に直接結合し、転写を負に制御している事が示された。Luciferase を発現させた大腸癌細胞株を肝転移モデルマウスの系で <i>in vivo</i> bioluminescent imaging を用いて経時的に観察すると、Smad4 欠損株では肝転移が促進されたのに対し Smad4 発現株では肝転移が抑制された。マウス肝転移巣の免疫組織染色では Smad4 欠損株で CCL15 発現が増加し、転移巣周囲への CCR1 陽性細胞の集積が確認された。ヒト大腸癌肝転移切除標本においても、Smad4 と CCL15 の発現の逆相関が示され、CCL15 陽性の大腸癌肝転移巣では陰性のものに比べて、転移巣周囲に集積する CCR1 陽性骨髄球が 3 倍以上に増加していた。さらに CCL15 陽性大腸癌肝転移患者の無再発生存期間は、CCL15 陰性患者にくらべて有意に短かった($P=0.04$)。大腸癌肝転移では約 50%に Smad4 発現低下を認めるが、これらの患者において CCR1 阻害剤が肝転移抑制に結びつく可能性が期待される。
以上の研究は大腸癌肝転移成立の分子生物学的メカニズムの解明に貢献しあらたな治療戦略の構築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、平成 25 年 11 月 11 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