



Title	KLK10 derived from tumor endothelial cells accelerates colon cancer cell proliferation and hematogenous liver metastasis formation
Author(s)	加藤, 一哉
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101818
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	加藤 一哉
論文題名 Title	KLK10 derived from tumor endothelial cells accelerates colon cancer cell proliferation and hematogenous liver metastasis formation (腫瘍血管内皮細胞から分泌されたKLK10は大腸癌細胞の増殖と血行性肝転移の形成を促進する)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的(Purpose)〕</p> <p>大腸癌は悪性腫瘍の中でも世界で3番目に多い癌腫であり、また肝転移は最も高頻度に認められる転移形式である。大腸癌肝転移に対する治療法は外科的切除や化学療法などが挙げられるが、根治的切除を施行しえたとしても再発率は70%と高率であり予後不良である。ところで、癌細胞はサイトカイン等を分泌することで、正常血管内皮細胞(NEC: normal endothelial cell)を、高い増殖能や浸潤能を有する腫瘍血管内皮細胞(TEC: tumor endothelial cell)に誘導するが、これは多血性腫瘍の治療標的として着目されている。大腸癌肝転移は、組織学的に血管の乏しい乏血性腫瘍であるが、血管新生阻害剤を併用した薬物療法が高い治療効果を認めており、乏血性腫瘍でありながらTECが癌の増殖・進展に関与していると推測される。本研究の目的は、大腸癌肝転移におけるTECの臨床的意義を解析し、さらに癌細胞との相互作用を解析することで、大腸癌肝転移に対する新規治療標的を同定することである。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>マウス大腸癌細胞株(CT26)懸濁液(5×10^5個/$100 \mu\text{l}$)を脾臓に投与することにより、大腸癌の血行性肝転移モデルを作成した。肝転移は14日目で評価した(以下同)。CD31マイクロビーズを用いた磁気細胞分離法により、肝転移巣よりTECを、正常脾臓からNECを分離培養した。TECおよびNECは、95%以上の細胞においてCD31陽性であり、Tube formation assayにて管腔形成を認め、血管内皮細胞であることを確認した。以下の実験は、3回以上行い、$p < 0.05$を有意差ありとした。</p> <p>次に<i>in vivo</i>で、CT26(18×10^4個)とNECまたはTEC(2×10^4個)との混合細胞を脾臓に投与した肝転移モデルを検討した。CT26+TEC群において肝転移巣は増大し、肝重量の増加を認めた(CT26群:2.1g, CT26+NEC群:2.3g, CT26+TEC群:6.1g)。転移巣における腫瘍血管数は、CT26+TEC群において2倍以上に増加し(CT26群:12個, CT26+NEC群:24個, CT26+TEC群:56個, 1視野あたり、$\times 200$)、Ki-67陽性腫瘍細胞数割合は、CT26+TEC群において高率であった(CT26群:25.0%、CT26+NEC群:34.2%、CT26+TEC群:49.8%)。</p> <p>TEC由来の腫瘍増殖促進因子を同定するため、次世代シーケンサーを用いてTECおよびNECの遺伝子発現解析を行った。TECにおいて64倍以上の発現差を認めた遺伝子は127個あり、主に細胞増殖・遊走・浸潤に関連していた。そのうち、様々な癌腫で予後因子とされ、さらに血管内皮細胞で血管内炎症に関連があるkallikrein-related peptide 10(KLK10)に関して、以降の解析を行った。qRT-PCRおよびWestern blot法でTECのKLK10の発現亢進を確認した。2種類のsiRNA(以下siKLK)を用いたKLK10の発現抑制より、TECの増殖能および遊走能の低下を認めた(増殖能53.9%低下、遊走能46.2%低下)。In vivoでは、CT26とsiKLK導入TEC(以下TEC siKLK)の混合細胞を脾臓に投与した肝転移モデルを検討したところ、CT26+TEC siKLK群で肝重量が減少した(TEC siKLK-1/2:3.4g/3.5g, Scramble siRNA:4.8g)。腫瘍血管数(TEC siKLK-1/2:33.4個/32.2個, Scramble siRNA:62.4個, 1視野あたり、$\times 200$)やKi-67陽性腫瘍細胞(TEC siKLK-1/2:38.1%/35.3%, Scramble siRNA:48.2%)にも減少を認めた。In vitroでは、TEC siKLK上清のKLK10濃度は低下し(TEC siKLK-1/2:744/669, Scramble siRNA:2393, pg/ml)、さらにCT26の増殖能は、リコンビナントKLK10の添加により上昇し、TEC siKLK10上清の添加により低下した。以上より、TECはKLK10を介したパラクリン作用によりCT26の増殖能を促進させると考えられた。</p> <p>大腸癌肝転移の切除標本におけるKLK10およびCD31発現を二重免疫蛍光染色で検討した。腫瘍細胞およびTECで共にKLK10発現を認めた症例は77例中20例に認め、その他の群と比較して無再発生存期間および全生存期間の短縮を認めた。単変量・多変量解析では、CA19-9高値と、腫瘍細胞およびTECで共にKLK10発現を認めることが独立した予後不良因子であった。</p> <p>〔総 括(Conclusion)〕</p> <p>腫瘍血管内皮細胞(TEC)から分泌されたKLK10は大腸癌細胞の増殖能を亢進させ、また肝転移形成を促進していた。TECにおけるKLK10は、大腸癌肝転移の有望な新規治療標的となりうる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 加藤 一哉				
論文審査担当者	(職)	氏 名		
	主 査	大阪大学教授	江口 英利	署 名
	副 査	大阪大学教授	竹原 徹也	署 名
	副 査	大阪大学教授	森井 英一	署 名

論文審査の結果の要旨

癌細胞はサイトカイン等を分泌することで、正常血管内皮細胞(NEC: normal endothelial cell)を、高い増殖能や浸潤能を有する腫瘍血管内皮細胞(TEC: tumor endothelial cell)に誘導するが、これは多血性腫瘍の治療標的として着目されている。大腸癌肝転移は、組織学的に血管の乏しい乏血性腫瘍であるが、血管新生阻害剤を併用した薬物療法が高い治療効果を認めており、乏血性腫瘍でありながらTECが癌の増殖・進展に関与していると推測される。大腸癌肝転移におけるTECの臨床的意義を解析し、さらに癌細胞との相互作用を解析することで、大腸癌肝転移に対する新規治療標的を同定することを本研究の目的とした。

本研究では、マウス大腸癌細胞株と腫瘍血管内皮細胞を混合投与し作成した肝転移腫瘍モデルで、腫瘍形成が促進され、腫瘍血管数やKi-67陽性腫瘍細胞数割合が増加していた。腫瘍血管内皮細胞に対する次世代シーケンスにより、kallikrein-related peptide 10(KLK10)という遺伝子の発現が亢進していることを見いだした。TECにおけるKLK10を発現抑制すると、腫瘍の増殖が抑制され腫瘍血管数やKi-67陽性腫瘍細胞数割合も減少した。さらに*in vitro*では癌細胞の増殖能が、リコンビナントKLK10の添加により上昇し、KLK10を発現抑制したTEC培養上清の添加により低下した。大腸癌肝転移の切除標本を用いた検討では、腫瘍細胞およびTECにおけるKLK10共発現群はその他の群と比較して無再発生存期間および全生存期間の短縮を認めた。これらの結果から腫瘍血管内皮細胞は、KLK10を介したパラクライン作用により大腸癌細胞の増殖能を亢進させ、また肝転移形成を促進していたため、TECにおけるKLK10は大腸癌肝転移の有望な新規治療標的となりうる可能性があることを示した。今後は、大腸癌治療への臨床応用も期待される研究成果であり、本研究は日本癌学会の英文機関紙であるCancer Science誌に掲載され、学位の授与に値すると考える。