The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	SPARC accelerates biliary tract cancer progression through CTGF-mediated tumor-stroma interactions: SPARC as a prognostic marker of survival after neoadjuvant therapy
Author(s)	高山, 碩俊
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95940
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	高山　碩俊
論文題名 Title	SPARC accelerates biliary tract cancer progression through CTGF-mediated tumor-stroma interactions: SPARC as a prognostic marker of survival after neoadjuvant therapy (SPARCはCTGFを介した癌-癌間質の相互作用を通して胆道癌を進展させる：SPARCの術前治療における予後因子としての意義)

論文内容の要旨(Abstract of Thesis)

〔目　的(Purpose)〕

胆道癌は外科切除が唯一の根治的治療であるが、R0切除率は70%と低く、局所再発率も高い。そのため、切除による治療成績向上のためは癌浸潤部を制御できる(術前)治療の開発が必要と考え、教室では、癌浸潤部では治療抵抗因子の発現が亢進している事、癌微小環境に不均一性が存在する事を示してきた。今回、胆道癌は他癌と比較し癌間質が豊富であることから、治療抵抗因子としての癌関連線維芽細胞(CAF)に着目した。CAFは化学療法抵抗性に関与することが示唆されているが、腫瘍内不均一性や治療抵抗性にかかわる癌-癌間質の相互作用については検討の余地がある。これまでCAFに関する研究で、secreted protein acidic and rich cysteine(SPARC)の癌間質発現上昇が胆道癌における予後不良因子となることを示してきた。SPARCは、細胞-細胞外マトリクス間の相互作用を仲介するmatricellular proteinであり、癌における発現と予後との強い関連性が証明されている事とは相反し、機能については未だ不明な部分が多い。本研究では同分子に着目し、癌悪性化を導く癌-癌間質の相互作用のメカニズムと、相互作用の腫瘍内不均一性について検討するとともに、SPARC発現の術前治療における意義について検討する事を目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

胆道癌切除検体(術前治療なし92例、術前化学療法23例、術前化学放射線療法21例)を用いてSPARCの免疫染色を行い、200倍視野における癌間質SPARC蛋白発現強度を癌中心部と癌浸潤部で、4段階(0～3)で評価し算出した。術前治療なし例92例では癌浸潤部でのSPARC蛋白発現が亢進していた(中心部：2.28±1.70、浸潤部:2.69±1.81, p=0.014)。手術単独症例50例における予後を検討したところ、SPARC高発現群は予後不良であった(5年無再発生存率：41.9% vs 22.3%、p=0.0326、5年生存率：75.1% vs 30.2%、p=0.0165)。術前治療に応じた癌浸潤部間質のSPARC蛋白発現を比較したところ、術前化学放射線療法例において術前治療なし例と比較してSPARC蛋白発現が低下しており(術前治療なし：2.68±1.81、術前化学療法：2.28±2.36、術前化学放射線療法：1.95±1.53。p<0.01)、術前化学放射線療法例は術前治療なし例と比較し無再発生存率、全生存率ともに予後良好であった(5年無再発生存率：28.0% vs 80.3%、p<0.01、5年生存率：43.9% vs 92.9%、p<0.05)。

次に、浸潤部を模倣した細胞モデルとして、胆道癌細胞株のNOZを用いて*in vitro* selectionを行い、高浸潤株を樹立した。正常皮膚線維芽細胞NHDFをNOZ親株、NOZ高浸潤株それぞれと共培養し、NHDFにおける*SPARC*発現をqRT-PCRで評価したところ、NOZ高浸潤株との共培養群での*SPARC*発現上昇が認められた(相対発現量1.27倍、p<0.05)。

SPARCの機能について検討するため、recombinant human SPARC proteinをNOZ高浸潤株に暴露させた後に、増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。浸潤能や遊走能に変化を認めず、増殖能は有意に上昇した(72時間後の増殖率、control群：2.19倍、rhSPARC暴露群：2.70倍、p<0.01)。

さらに、NOZ親株とNOZ高浸潤株に対してmRNA microarrayを行い、発現遺伝子の比較を行った。細胞間伝達物質の"cytokine"、"growth factor"に着目して検討した結果、connective tissue growth factor(*CTGF*)が高浸潤株で高発現していた(fold change=3.46)。CTGFはcellular communication network family(CCN family)の一つであり、過去の研究では組織線維化や細胞周期の促進、浸潤、遊走に関与すると報告されている。NOZ高浸潤株にsi*CTGF*を投与し、CTGFの制御による浸潤能の低下を確認した(1視野の浸潤細胞数平均値、si*CTGF*群:siControl群=23.56:105.06、p<0.01)。

NHDFのrecombinant human CTGF protein投与によるCAFへの分化を、SPARCとαSMAの上昇で検討した。qRT-PCR(*SPARC*:相対発現量1.32倍、p<0.01、*ACTA2*:相対発現量1.35倍、p<0.01)、Western Blotting、ELISA(SPARC分泌量:培養24時間後の相対吸光度：1.19倍、p<0.05)のそれぞれにおいて上昇を認めた。

最後に、NHDFを、Gemcitabineと放射線に暴露したNOZ高浸潤株との共培養を行い、SPARCをはじめとするCAFのマーカー発現をqRT-PCRで検討した。暴露なし群と比較して、暴露群における*SPARC*(相対発現量：0.74、p<0.01)、*FAP*(相対発現量：0.19、p<0.01)の発現は有意に低下した。

〔総　括(Conclusion)〕

胆道癌切除検体において、癌浸潤部の間質SPARC高発現は予後不良因子であり、術前化学放射線療法例では同発現が低下しており、術前治療なし例、術前化学療法例と比べて予後良好であった。*in vitro*実験において、CTGFが線維芽細胞のSPARC発現上昇に寄与している事、SPARCは浸潤胆道癌細胞の増殖能を上昇させる事、化学放射線療法暴露後の浸潤胆道癌細胞と線維芽細胞を共培養すると線維芽細胞のSPARC発現は低下することを示した。以上の結果より、胆道癌浸潤部の癌間質細胞におけるSPARCは、CTGFを介した癌-癌間質相互作用を通して胆道癌悪性化を誘導していること、化学放射線療法により低下し、術前化学放射線療法で予後の改善が見込まれることを示した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）高山　碩俊

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	江口 英利
	副　査	大阪大学教授	青島 高弘
	副　査	大阪大学教授	島津 研三

論文審査の結果の要旨

胆道癌において癌-癌間質相互作用により悪性化が誘導される事が示されているが、その相互作用の腫瘍内不均一性については議論の余地がある。本研究は、癌-癌間質相互作用のメカニズムと不均一性を明らかにする事を目的とした。切除検体に対する免疫染色の検討で癌浸潤部での間質SPARC高発現が予後不良因子であった。また、外因性SPARC蛋白による胆道癌細胞の増殖能が亢進した。*In vitro* selectionの手法で癌浸潤部癌細胞を模倣した胆道癌高浸潤株を樹立した。mRNA microarrayにより胆道癌高浸潤株において*CTGF*の発現が亢進していた。外因性CTGF蛋白により繊維芽細胞のSPARC、αSMA、COL1A1発現が亢進した。化学放射線照射後の癌細胞を線維芽細胞と共培養すると線維芽細胞における*SPARC*発現が低下した。本研究は胆道癌浸潤部においてSPARCはCTGFを介した癌-癌間質相互作用を通して悪性化を誘導していること、化学放射線療法により胆道癌浸潤部におけるSPARC発現が低下し、術前化学放射線療法で予後の改善が見込まれることを示した。よって本研究結果は、学位の授与に値すると考えられる。