

Periostin が食道扁平上皮癌の進展に及ぼす
分子機構の解析
—ADAM17 との関連に注目して—

いし ばし ゆう すけ
石 橋 勇 輔

(外科系プライマリー・ケアー学)

防衛医科大学校

令和4年度

目 次

第 1 章	緒言	1 頁
第 2 章	食道扁平上皮癌における Periostin の発現と臨床病理学的因子との関連性	
第 1 節	背景と目的	4 頁
第 2 節	対象と方法	5 頁
第 3 節	結果	8 頁
第 4 節	考察	10 頁
第 5 節	小括	11 頁
第 3 章	Periostin が食道扁平上皮癌細胞株の増殖・遊走および ADAM 17 の活性化に与える影響	
第 1 節	背景と目的	13 頁
第 2 節	対象と方法	14 頁
第 3 節	結果	20 頁
第 4 節	考察	23 頁
第 5 節	小括	24 頁
第 4 章	全体の考察	26 頁

第 5 章 結論	27 頁
謝辭	29 頁
略語一覽	31 頁
引用文献	33 頁
図表	39 頁

第1章 緒言

2018年の統計調査によると、食道癌は男性に多く、罹患率は7番目に、癌関連死亡では6番目に多い悪性腫瘍である⁽¹⁾。近年の外科手術手技、化学放射線療法の進歩や免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitor; ICI)の開発などの集学的治療の目覚ましい進歩にも関わらず、食道癌は術後5年生存率がいまだ15~25%と予後不良な癌腫であり⁽²⁾、新たな治療法の開発や集学的治療を行う際における治療方針決定のためのバイオマーカーの探索は喫緊の課題である。

これまで我々は、食道癌患者における術前の全身性炎症反応に着目し、好中球リンパ球比 (NLR)や血小板リンパ球比 (PLR)などの末梢血中の血球分画比、およびC-reactive protein (CRP)アルブミン比 (CAR)が予後予測因子となり得ることを報告してきた^(3,4)。全身性の炎症反応や炎症に関連する血球分画比が術後の予後と関連する機序に関しては十分に解明されていないが、腫瘍局所の炎症反応は腫瘍微小環境における腫瘍細胞の浸潤、転移と密接な関連を持つことが報告されており、腫瘍局所の炎症反応が全身性に波及し癌の進展を促進する可能性が指摘されている⁽⁵⁾。

近年、癌間質に発現している Periostin が腫瘍局所のマクロファージなどから誘導される炎症反応で構築される微小環境、すなわち「炎症性微小環境」の形成に関わる中心的な分子として着目されている⁽⁶⁾。Periostin は細胞機能を調節するマトリセルラータンパク質であり、cancer-associated fibroblasts (CAFs)と癌細胞とのクロストークを媒介する中心的な役割を担っており、癌微小環境における血管新生、炎症反応、腫瘍免疫などに関与していると報告されている。Periostin は多くの悪性腫瘍において高発現するとともに、腫瘍の浸潤や増殖に関連していると報告されている⁽⁷⁾。さらに近年、癌細胞に対する治療標的とし

て Periostin を用いた新規治療薬の開発が進んでおり、特にトリプルネガティブ乳癌においては、Periostin のエクソン 17 中和抗体を用いた治療薬の開発が進行中である⁽⁸⁾。一方、食道扁平上皮癌における Periostin 発現の意義や、癌細胞の増殖や進展に与える影響についての報告はこれまでにない。

Periostin は癌の増殖、浸潤、転移と密接に関連する matrix metalloproteinases (MMPs)、および MMP 近縁遺伝子ファミリーである ADAMTS-4 (a disintegrin and a metalloproteinase with thrombospondin motifs)などの発現の誘導に関与することが指摘されており、MMP 近縁遺伝子ファミリーを介する腫瘍増殖への関与も指摘されている^(9,10)。その中でも ADAM17 は TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme)とも呼ばれ、細胞膜に存在する pro-tumor necrosis factor- α (pro-TNF- α)や interleukin (IL)-6 受容体 α (IL-6R α)をシェディングし、TNF- α や可溶性 IL-6R α を細胞外に放出するなど、さまざまな炎症性 mediator を誘導することから、Periostin と同様に炎症性疾患や腫瘍局所の炎症に関わる分子として注目されている⁽¹¹⁾。さらに ADAM17 は悪性腫瘍の増殖・転移に強く関わる epidermal growth factor receptor (EGFR)シグナルの活性化に深く関与することが知られており、食道扁平上皮癌の 6 割以上の症例で高発現している⁽¹²⁾。一方で癌微小環境での Periostin や ADAM17、およびこれらの相互作用が癌の増殖・遊走に関わる分子機構については十分に解明されていない。

本研究では、まず初めに食道扁平上皮癌における Periostin 発現の臨床病理学的意義や、予後との関連性を検討した。また、これまで報告してきた NLR、PLR、CAR などの全身性炎症・栄養マーカーと Periostin 発現との関連性についても検討を行った。次に CAFs から分泌される Periostin による食道扁平上皮癌細胞株への増殖および遊走能への影響と、Periostin 受容体阻害抗体が増殖と遊走能に与える影響について検討した。最後に Periostin が癌細胞の増殖および遊

走能に及ぼす影響の分子機構として ADAM 17 に着目し、ADAM17 の発現や活性化に与える影響について検討した。

第2章 食道扁平上皮癌における Periostin の発現と臨床病理学的因子との関連性

第1節 背景と目的

本邦における食道癌に対する治療戦略は、深達度、リンパ節転移、遠隔転移の3つの要素からステージングを行い、年齢、performance status (PS)などを考慮し、内視鏡治療、手術、放射線治療、化学療法、またはそれらを組み合わせた集学的治療が行われる。切除可能な Stage II/III の進行食道癌に対しては、JCOG9907 試験の成績より術前に cisplatin/ 5-fluorouracil 療法 (FP 療法)を行った後に手術を実施することが推奨されている⁽¹³⁾。また最近では JCOG1109 試験の結果により、FP 療法に docetaxel を追加した docetaxel/ cisplatin/ 5-fluorouracil 療法 (DCF 療法) が新たな術前化学療法として開発された⁽¹⁴⁾。さらに遠隔転移を有する食道癌や再発食道癌においては免疫チェック阻害薬 (ICI)を併用した薬物療法が行われるようになった⁽¹⁵⁾。

このように食道癌治療における基本戦略において薬物療法が非常に重要な役割を果たしている。一方で、DCF 療法は高い奏効率を有する反面、重篤な血液毒性などの有害事象を伴うことが知られており、高齢者や PS の悪化した症例では投与が困難となることが多い。また ICI についても、単独では奏効率が低いことに加え、重篤な免疫関連有害事象を呈する症例もあり、熟練した医師が慎重に使用する必要がある。このように食道癌における化学療法は未だ発展途上であり、有害事象の少ない新たな分子標的薬の開発が望まれる。

Periostin は 1999 年に Horiuchi らによって名付けられたマトリセルラータンパク質であり、名称は主に骨膜 (periosteum)や歯根膜 (periodontal ligament)に存在することに由来する⁽¹⁶⁾。Periostin は様々な腫瘍増殖機構に関与し、特に炎症性

微小環境の形成や癌に伴う線維化に重要な役割を果たすことが報告されている⁽⁶⁾。大腸癌、非小細胞性肺癌、乳癌、肝細胞癌、胃癌などの様々な癌腫において、免疫染色で Periostin が高発現する症例や血清中に Periostin が高値となる症例では予後不良であることが知られている⁽¹⁷⁻²²⁾。また食道扁平上皮癌については、プロテオミクス解析や DNA マイクロアレイなどによる検討で、Periostin は腫瘍組織において高発現し、その高発現は予後不良因子であると報告されている⁽²³⁻²⁶⁾。

そこで本章では、食道扁平上皮癌切除検体において免疫組織化学染色により Periostin の発現とその局在を検討し、臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。さらに Periostin の発現と、これまで教室で当検討してきた NLR、PLR、CAR 等の予後に関連する全身性炎症・栄養マーカーとの関連性について検討した^(3,4)。

第2節 対象と方法

1) 症例

2009年から2016年までの間、防衛医科大学校病院で食道扁平上皮癌に対して根治的食道切除が施行された171例を対象とした。本研究は防衛医科大学校倫理委員会で承認を得た（承認番号: 4100）。またすべての対象患者および家族に対して十分な説明を行い、文章による同意を取得した。

2) 免疫組織化学染色

腫瘍先進部を含む代表断面のホルマリン固定パラフィン包埋標本を4 μ m厚に薄切し、下記の如く免疫組織化学染色を行った。キシレンによる脱パラフィン後、濃度勾配をつけたエタノールを用いて親水処理を行ったのち、オートク

レーブにて 121°C、15 分間で抗原を賦活化した。5%過酸化水素水に 10 分間浸透させて内因性ペルオキシダーゼを阻害した後、スキムミルクにより非特異的反応を抑制した。1 次抗体反応として 100 倍希釈した抗ラビット Periostin モノクローナル抗体 (ab14041, Abcam, Cambridge, UK)を用いて 4°Cで一晩インキュベートした。2 次抗体は EnvisionTM+system anti-mouse (Dako, Carpinteria, CA) を使用して室温で 2 時間反応させたのち、0.1% diaminobenzidine (DAB) 溶液で発色を施した後に 1 分 30 秒間 hematoxylin による核染色を追加した。

Periostin の評価方法に関しては、食道扁平上皮癌組織の先進部において、抗 Periostin 抗体陽性の間質細胞が、がん間質細胞全体に占める割合の 50%以上である場合を Periostin 高発現、50%未満の場合を Periostin 低発現とした (図 1)。評価に関しては、予後を含むすべての臨床病理学的情報を知らされていない 2 名の医師 (Y.I, T.E) により判定を行った。

3) 蛍光二重免疫組織化学染色

第 2 章第 2 節 2) で使用したホルマリン固定パラフィン包埋切片を 100 倍希釈抗ラビット Periostin モノクローナル抗体 (ab14041, Abcam, Cambridge, UK)に加え、100 倍希釈抗マウス CD68 モノクローナル抗体 (clone PG-M1, M0876; DAKO Cyto-mation)、100 倍希釈抗マウス fibroblast-specific protein (FSP)-1 モノクローナル抗体 (ab218511; Abcam)、もしくは 100 倍希釈抗マウス α -smooth muscle actin (SMA)モノクローナル抗体 (clone 1A4; Dako, Carpinteria, CA)を用いて蛍光二重免疫組織化学染色を行った。

1 次抗体反応までの手順は第 2 章第 2 節 2)と同様の手順で行い、2 次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗ラビット IgG 抗体 (ab150077, Abcam)、Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG 抗体 (ab150116, Abcam)を使用し、1 時間常温にて反応さ

せた後、DAPI 溶液 (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, Paris, France)を用いて核染色を行った。評価に関しては共焦点顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて行った。

4) イムノブロット法

食道扁平上皮癌手術症例の新鮮凍結標本検体 (10 例) を用いてイムノブロット法により Periostin のタンパク定量を行った。腫瘍および腫瘍から十分離れた食道組織 (正常組織) より採取した組織にそれぞれ 2×sodium dodecyl sulfate (SDS) -sample buffer に 2-メルカプトエタノールを加え、Bioruptor® (BM Equipment Co., Ltd., Tokyo, Japan) で超音波処理し、100°Cで 10 分間インキュベートした。SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12.5%アクリルアミドゲル)を用いて試料中のタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜への転写を行った。PVDF 膜を Block-Ace™ (DS Pharma Biomedical Co, Ltd, Osaka, Japan)により 2 時間室温でブロッキング後、抗 Periostin 抗体 (0.5µg/mL, ab14041; Abcam)、抗 GAPDH 抗体 (1µg/mL, ab125247; Abcam)とそれぞれ 4°Cで一晩インキュベートした。1 次抗体と反応後、0.1%の tween®-20 を含む PBS (PBS-T) で 10 分間計 3 回洗浄を行った後、2 次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 抗体 (Dako)と室温で 2 時間反応させた。目的バンドの検出は、PBS-T にてメンブランを 10 分間計 4 回洗浄し、発光基質 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)を加えて 5 分間反応させた後、C-DiGit chemiluminescent 169 scanner (LI-COR C-DiGit Blot Scanner, Lincoln, Nebraska, USA)により解析し定量化を行った。

5) 全身性炎症・栄養マーカーの評価

術前化学療法非施行例では食道癌手術直前の採血により、術前化学療法施行症例に関しては、術前化学療法の影響を除外するために化学療法施行前の採血を使用した。NLR は好中球数をリンパ球数で、PLR は血小板をリンパ球数で、CAR は CRP 値をアルブミン値でそれぞれ除することで算出した。

6) 統計学的手法

Periostin の発現と臨床病理学的背景因子との関連は、カイ二乗検定を用いて検討し、母集団の数が少なく期待値が 5 未満となる場合には Fisher の直接確率検定を用いた。Periostin の発現と全身性炎症・栄養マーカー、およびその構成因子との関連は Mann-Whitney U 検定を用いて検討した。生存率に関しては、全生存期間 (OS, overall survival) では全死亡を、無再発生存期間 (RFS, relapse-free survival) では再発および死亡をイベントとして Kaplan-Maier 法で算出し、Log-rank 検定を用いて解析した。単変量解析にて有意な相関を示した因子に関して、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。P 値 < 0.05 を有意とし、各統計の解析は JMP® pro14.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。各グラフは平均値±標準誤差で表記した。

第3節 結果

1) 食道扁平上皮癌組織における Periostin の発現の検討

対象症例における Periostin の発現は、Periostin 高発現が 117 例 (68.4%)、Periostin 低発現が 54 例 (31.6%)であった。また、Periostin は腫瘍細胞には発現せず、がん間質で強く発現していた。蛍光二重免疫組織化学染色では Periostin は腫瘍関連マクロファージのマーカーである CD68 陽性細胞では発現を認め

ず、CAFs のマーカーである α -SMA および FSP-1 陽性細胞において発現を認めた (図 2)。免疫ブロット法では、Periostin は腫瘍組織で強く発現し、正常組織ではほとんど発現を認めなかった ($p = 0.003$) (図 3)。

2) Periostin の発現と臨床病理学的因子との関連性

Periostin の発現と臨床病理学的因子との関連性を表 1 に示す。Periostin 高発現例は深達度 ($p < 0.0001$)およびステージが有意に高く ($p < 0.0001$)、また胸腔鏡手術症例が少なかった ($p = 0.003$)。性別 ($p = 0.64$)、年齢 ($p = 0.85$)、リンパ節転移 ($p = 0.05$)、腫瘍占居部位 ($p = 0.77$)、分化度 ($p = 0.08$)、および術前化学療法施行の有無 ($p = 0.07$)に関しては、両群間に差を認めなかった。

3) Periostin の発現と再発及び予後との関連性

Periostin 高発現、低発現別の OS および RFS に関する生存曲線を図 4 に示す。3 年生存率は、Periostin 高発現例で 43.6%、Periostin 低発現例で 81.5%、3 年無再発率は Periostin 高発現例で 35.0%、Periostin 低発現例で 62.9%であった。また 5 年生存率は Periostin 高発現例で 37.5%、Periostin 低発現例で 71.1%、5 年無再発率は Periostin 高発現例で 32.5%、Periostin 低発現例で 52.9%と OS、RFS とともに Periostin 高発現例で有意に不良であった ($p < 0.001$) (図 4)。

4) Periostin の発現と全身性炎症・栄養マーカーとの関連

Periostin の発現と NLR、PLR、CAR との関連を図 5 に示す。Periostin 高発現例は、低発現例と比較して PLR (189.6 ± 8 vs. 159.3 ± 12 ; $p < 0.05$)、CAR (0.36 ± 0.06 vs. 0.14 ± 0.09 ; $p < 0.05$)が有意に高値であった。NLR に関しても Periostin 高発現例は、低発現例と比較して高い傾向を認めた (3.27 ± 0.19 vs. 2.65 ± 0.28 ; $p =$

0.07)。また、各マーカーの構成因子との関連では、Periostin 高発現例は、低発現例と比較して有意に CRP 値 (1.15 ± 0.23 mg/dL vs. 0.52 ± 0.23 mg/dL; $p < 0.05$) が高値で、アルブミン値 (3.76 ± 0.04 g/dL vs. 4.04 ± 0.06 g/dL; $p < 0.05$) が低値であった。一方で好中球数 (4251 ± 184 / μ L vs. 3848 ± 272 / μ L; $p = 0.22$)、リンパ球数 (1519 ± 53 / μ L vs. 1648 ± 78 / μ L; $p = 0.17$)、血小板数 (234419 ± 11719 / μ L vs. 254188 ± 7961 / μ L; $p = 0.16$) に関しては両群間に差を認めなかった (図 6)。

5) OS に関与する臨床病理学的因子の検討

OS に対する臨床病理学的因子の単変量および多変量解析結果を表 2 に示す。単変量解析では、性別 ($p = 0.0191$)、深達度 ($p < 0.0001$)、リンパ節転移分類 ($p = 0.0396$)、腫瘍分化度 ($p = 0.0450$)、Periostin 発現 ($p < 0.0001$)、NLR ($p = 0.0166$)、CAR ($p < 0.0001$) が OS と有意な関連を示した。上記 7 因子に関する Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析では、性別 ($p = 0.0321$)、深達度 ($p = 0.0175$)、CAR ($p = 0.0427$) に加え、Periostin の発現 ($p = 0.0363$) が独立した予後予測因子として選択された。

第 4 節 考察

本検討における食道扁平上皮癌の免疫組織化学染色において、Periostin 抗体で染色される間質細胞が、がん間質細胞全体に占める割合が 50% 以上であった症例は約 70% であった。Periostin は癌間質に強く染色され、癌細胞自体にはほとんど染色を認めなかった。また、イムノブロット法において Periostin は腫瘍組織に強く発現し、正常組織ではほとんど発現を認めなかった。さらに、蛍光二重免疫染色において、CAFs のマーカーである α -SMA や FSP-1 陽性細胞において Periostin の発現を認めたのに対して、腫瘍関連マクロファージのマーカー

である CD68 陽性細胞では Periostin の発現を認めなかった。以上から、食道扁平上皮癌においては、Periostin は癌間質細胞の中でも CAFs が主要な分泌細胞である可能性が高いと考えられた。

腫瘍局所の炎症性微小環境では、CAFs から分泌された Periostin が腫瘍細胞上の Integrin α V β 3 や Integrin α V β 5 などのレセプターを介して YAP-TAZ シグナル伝達路を活性化し、癌細胞からの interleukin (IL)-6 分泌が促進される。さらに CAFs に存在する IL-6 レセプターを介して JAK2-STAT3 シグナル伝達経路が活性化され、CAFs からの Periostin 分泌が促進されるという positive feedback loop の存在が考えられている⁽²⁷⁾。本研究では腫瘍局所において Periostin が高発現している症例では、全身性の炎症・栄養マーカーである NLR、PLR、および CAR が上昇しており、全身性の炎症・栄養マーカーの構成因子の中でも CRP が有意に高値であった。炎症局所で産生される IL-1 や IL-6 は、肝臓での CRP などの急性期炎症性タンパクの産生に関与していることから、腫瘍局所の炎症性微小環境は全身性の炎症反応に関連している可能性が示唆された。また、今回の検討では食道扁平上皮癌症例において Periostin 高発現例では低発現例と比較して OS、RFS とともに不良であり、他癌腫と同様に食道扁平上皮癌においても Periostin 発現は独立した再発及び予後予測因子である可能性が示唆された。

本研究の限界として、単施設による後向き研究のため、周術期の治療にばらつきがあり、症例数が少ないこと、また術前に Stage II/III と診断された症例では、術前化学療法による影響を排除できないことが挙げられる。今後多数の症例により追加検証を行う必要がある。

第 5 節 小括

Periostin は食道扁平上皮癌の癌間質に強く発現し、蛍光二重免疫染色の結果

から、癌間質の CAFs に由来するものと考えられた。Periostin 高発現例では進行例が多く、予後不良であった。また腫瘍組織での Periostin の発現は NLR、PLR、CAR 等の全身性の炎症・栄養マーカーとの関連を認めた。

第3章 Periostin が食道扁平上皮癌細胞株の増殖・遊走および ADAM 17 の活性化に与える影響

第1節 背景と目的

第2章において、食道扁平上皮癌組織での Periostin は、癌間質に強く染色され、さらに α -SMA や FSP-1 などの CAFs のマーカーが陽性の細胞で Periostin の発現を認めたことから、Periostin は癌間質に存在する CAFs から分泌されている可能性が高いと考えられた。

そこで本章では、食道扁平上皮癌患者の手術検体から腫瘍組織より CAFs、および正常組織から線維芽細胞 (NFs, normal fibroblasts) を分離培養し、それぞれにおける Periostin の発現、培養上清への Periostin 分泌能を検討した。さらにヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いて、CAFs あるいは NFs の培養上清が癌細胞の遊走能、増殖能に与える影響を *in vitro* で検討し、加えて Periostin 受容体阻害抗体による遊走能と増殖能に与える効果について検討した。

また本章では、Periostin が食道扁平上皮癌細胞の増殖・遊走能を促進するメカニズムとして癌の悪性度に強く関わる ADAM ファミリーに着目した。ADAM は MMP 近縁遺伝子ファミリーであり、その生物学的機能は多様でタンパク質のシェディングや Integrin などへの結合による細胞の接着、運動、増殖、遊走などに不可欠な調節因子であると考えられている^(28,29)。その中で ADAM ファミリーの一員である ADAM17 は、細胞表面から生理活性型 TNF- α を放出する TNF- α 変換酵素として初めて認識された。そのことから別名 TACE (Tumor necrosis factor- α -converting enzyme) とも呼ばれ、細胞膜に存在する IL-6R、Notch 受容体、EGFR リガンドなど 70 種類以上の膜結合タンパク質を放出する役割を果たすことで広く知られるようになった。これまで食道扁平上皮癌

においては、ADAM17が腫瘍組織に高発現しているという報告があるものの、ADAM17の発現と腫瘍増殖に関わる分子作用機序に関しては不明である⁽¹²⁾。さらに Periostin はこれまで ADAMTS (ADAM with thrombospondin motifs)-4、MMP-2、MMP-9、MMP-13 の発現を上昇させることが報告されているが^(9, 30, 31)、Periostin が ADAM17 の活性化に及ぼす影響や、これらと腫瘍増殖との関連性に関しては報告されていない。

本研究では、食道扁平上皮癌において Periostin が ADAM17 の発現や活性化に与える影響、そして Periostin と ADAM17 が食道扁平上皮癌細胞株における増殖能・遊走能に与える影響について検討した。

第2節 対象と方法

1) 対象症例

2019年10月から2020年10月の間、防衛医科大学校病院にて根治的切除を施行した食道扁平上皮癌症例10例を対象とした。本研究は防衛医科大学校倫理委員会で承認を得た(承認番号: 2959)。またすべての対象患者および家族に対して十分な説明を行い、文章による同意を取得した。

2) 食道扁平上皮癌細胞株

食道扁平上皮癌細胞株である TE-1、TE-8、および TE-10 は、Riken BRC cell bank (Riken, Tsukuba, Japan) から購入し、BEX 社 (東京) に依頼して Short Tandem Repeat 解析法により細胞認証テストを行った。

3) CAFs および NFs の培養

食道扁平上皮癌手術検体から腫瘍および切除検体の口側の非癌部の漿膜下層

組織より、それぞれ約 5 mm 角の組織片を採取し、CAFs および NFs の培養に用いた。腫瘍内の heterogeneity を排除するため、1 症例あたり 3 カ所の腫瘍組織より組織片を採取した。

組織片を 10%ウシ胎児血清 (FBS, fetal bovine serum)、および抗生剤 (100IU/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン)を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEMTM)培地上で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。純度の高い細胞を使用するために、3~7 継代したものを実験に使用した。

培養 14 日目には、CAFs、NFs とともに紡錘形の細胞が得られた (図 7A)。腫瘍組織より得られた細胞が CAFs であることを確認するため、定性 PCR により、線維芽細胞マーカー (α -SMA、FSP-1、fibroblast activation protein)、および Periostin が陽性であり、単球マーカー (CD14)、血管内皮マーカー (CD31)、リンパ球マーカー (CD45)、造血系前駆細胞マーカー (CD34)、食道扁平上皮マーカー (cytokeratin 4)が陰性であることを確認した (図 7B)。

4) イムノブロット法

CAFs、NFs、培養上清、および食道扁平上皮癌細胞株での Periostin や α -SMA の発現をイムノブロット法で確認するために、10%トリクロロ酢酸を用いて培養上清のタンパク沈殿物に加え、CAFs、NFs、および食道扁平上皮癌細胞株の溶解液を作成した。イムノブロット法に関しては、第 2 章第 2 節 3)と同様の手法で施行した。

5) Total RNA の抽出および cDNA 合成

CAFs または NFs、食道扁平上皮癌細胞株からの total RNA の抽出には、ISOGEN II (Nippon gene, Tokyo, Japan)を添加し、ホモジナイズした後に製品プ

ロトコルに従った。抽出した total RNA を鋳型として Prime Script RT-reagent Kit™ (Takara Bio Inc.) を用いて単鎖 cDNA の合成を行った。

6) CAFs および NFs の培養上清を用いた食道扁平上皮癌細胞株の細胞遊走試験
細胞遊走能の確認はスクラッチアッセイにより評価を行った。実験方法を以下に述べる。Hydroxyurea (10µg/mL)を用いて細胞周期の同調ならびに増殖停止を行ったのち、6 ウェルプレートにて食道扁平上皮癌細胞株を CAFs または NFs の培養上清と共培養し、1000µL 用のピペットチップ先端にてスクラッチを作成した。さらに、それぞれに Periostin と OC-20 (5µg/mL; AdipoGen, Incheon, Korea)抗体、または IgG 抗体 (5µg/mL)を添加後 24 時間と 48 時間の時点でのスクラッチ部に向かう癌細胞の遊走面積を ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて評価した。

7) CAFs の培養上清を用いた食道扁平上皮癌細胞株の細胞増殖試験

細胞増殖能の評価は Ki-67 標識による細胞免疫染色法と Bromodeoxyuridine (BrdU) (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland)の取り込みを Cell Proliferation ELISA 法で評価した。

Ki-67 標識による細胞免疫染色法に関しては、4 チャンバー型スライド (Lab-Tek II; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に食道扁平上皮癌細胞株を培養し、24 時間の無血清培地への交換による細胞周期の同調ならびに増殖停止を行ったのち、CAFs または NFs の培養上清、および OC-20 抗体 (5µg/mL)または IgG 抗体 (5µg/mL)を添加し 48 時間共培養した。酢酸エタノールによる細胞固定を行った後に、抗 Ki-67 抗体 (1µg/mL; LS-B12782; LsBio, Seattle, WA)と 4°C で一晩インキュベートした。2 次抗体以降は第 2 章第 2 節 2)と同様の手順で行っ

た。評価に関しては、光学顕微鏡 (400 倍)で観察し、核が褐色に染色されたものを陽性とし、陽性細胞の占める割合 (陽性細胞数/全腫瘍細胞数)を百分率にて算出した。

Cell Proliferation ELISA 法に関しては、24 時間の無血清培地への交換による細胞周期の同調ならびに増殖停止を行ったのち、食道扁平上皮癌細胞株を CAFs または NFs の培養上清との共培養を行い、さらに、それぞれに OC-20 抗体 (5 μ g/mL)または IgG 抗体 (5 μ g/mL)を添加し 48 時間共培養した。BrdU 標識溶液(10 μ M; Roche, Basel, Switzerland)を培地に添加し 2 時間後に BrdU 標識溶液を除去後、100 倍希釈抗 BrdU 抗体 (Roche)を添加した。BrdU の吸光度(450nm)は、iMarkTM microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測定した。

8) Periostin 刺激による ADAM17 や細胞内 ERK1/2 の発現

食道扁平上皮癌細胞株 (TE-8)を recombinant human Periostin (rhPeriostin; R&D Systems, Minneapolis, USA)や CAFs の培養上清にて刺激を行い、48 時間経過後に第 3 章第 2 節 3)と同様の手技にてタンパクを回収し、抗 ADAM17 抗体 (AB19027; Chemicon Temecula, CA)、抗 ERK1/2 抗体 (137F5, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)、抗 P-ERK1/2 抗体 (20G11, Cell Signaling Technology)を用いてイムノブロット法による ADAM17 や細胞内 ERK1/2 の発現の変化を検討した。さらに、OC-20 抗体 (5 μ g/mL)や ERK1/2 阻害剤 (50 μ M, PD98059; CAS 167869-21-8, Gibbstown, USA)による ADAM17 の発現に対する効果について検討した。

9) ADAM17 の活性化の評価 (シェディングアッセイ)

ADAM17 の活性化の評価として、活性化 ADAM17 が細胞膜上の TGF- α や IL-1 receptor type 2 (IL-1R2)を選択的に切断する特徴を利用し、切断された際に分

離される TGF- α や IL-1R2 由来の alkaline phosphatase (AP) を測定した (シェディングアッセイ)^(31,32)。シェディングアッセイには、マウスの胚線維芽細胞 (MEFs; mouse embryonic fibroblasts)、および ADAM17 ノックアウト処理を行った MEFs (A17KOMEFs) を用いて行った (防衛医科大学校整形外科学講座堀内准教授より供与)。各 MEFs に Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて TGF- α 、もしくは IL-1R2 の遺伝子導入を行った。遺伝子導入を行った 24 時間後に rhPeriostin (1 μ g/mL)、CAF の上清、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100ng/mL; AdipoGen, San Diego, CA, USA)、抑制因子として ERK1/2 阻害剤 (PD98059, 50 μ M) や MMP/ADAM 阻害剤 (BB94, 2 μ M; R&D Systems) をそれぞれ投与し、1、6、12、24、48 時間後に培養上清を回収した。PMA は ADAM17 の活性化を促進するポジティブコントロールとして使用した。培養上清中の AP は 4-ニトロフェニルホスファターゼと反応させた後、iMark microplate reader (Bio-Rad) を用いて 405nm の吸光度にて測定を行った。

10) 食道扁平上皮癌細胞株における Integrin および ADAM17 の発現

TE-1、TE-8、TE-10 における Integrin と ADAM17 の mRNA 発現を第 3 章第 2 節 4) と同様に RT-PCR 法にて確認を行った。加えて ADAM17 の発現に関して、第 3 章第 2 節 3) に記載のイムノブロット法とリアルタイム定量的 RT-PCR にて定量的に評価した。リアルタイム定量的 RT-PCR については cDNA を鋳型として SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) を用いて ADAM17 の mRNA 発現を解析した。全ての反応は二重反復試験で施行し、平均値を示した。PCR 反応終了後、増幅産物の特異性を融解曲線分析にて確認した。mRNA の相対的発現量の評価は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) により発現を補正し、Multiplate RQTM (Takara Bio Inc.) ソフトウェアを用いて $\Delta\Delta C_t$ 法にて行

第3節 結果

1) CAFs、NFs、培養上清、および食道扁平上皮癌細胞株での Periostin の発現

イムノブロット法における検討では、CAFs の培養上清で CAFs の細胞溶解液と比較して Periostin が強く発現し、NFs の細胞溶解液や培養上清にはほとんど発現を認めなかった (図 8A)。またいずれの食道扁平上皮癌細胞株 (TE-1、TE-8、TE-10) の溶解液にも Periostin の発現を認めなかった (図 8B)。

2) CAFs の培養上清が食道扁平上皮癌株の遊走能・増殖能に及ぼす影響

ア) CAFs の培養上清を用いた食道扁平上皮癌細胞株の遊走能に関する検討

食道扁平上皮癌細胞 (TE-1、TE-8、TE-10) と CAFs、あるいは NFs の培養上清とを共培養した。TE-1 あるいは TE-8 を CAFs の培養上清と共培養したところ、NFs の培養上清と共培養した場合と比較して 48 時間後の遊走能が亢進していた (TE-1: $p = 0.08$ 、TE-8: $p < 0.05$) (図 9A、図 9B)。また、これらの CAFs の培養上清に Periostin の受容体阻害抗体である OC-20 抗体を添加することにより、48 時間後の遊走能は有意に抑制された ($p < 0.05$)。一方で、TE-10 に関しては、CAFs の培養上清と共培養による遊走能、および OC-20 抗体による遊走能の変化は認められなかった (図 9C)。

イ) CAFs の培養上清が食道扁平上皮癌細胞株の増殖能に及ぼす影響

TE-1 および TE-8 では、CAFs の培養上清を添加した場合には NFs の培養上清の添加した場合と比較して Ki-67 の陽性割合が有意に高率であった。また、これらに OC-20 抗体を添加した場合には、Ki-67 陽性割合は有意に低率であった ($p < 0.01$) (図 10)。一方で、TE-10 に関しては、CAFs の培養上清の添加による Ki-67 陽性割合に変化を認めなかった。同様に、TE-1 および TE-8 では、

CAFs の培養上清添加により有意に BrdU の取り込み量が増加し、OC-20 抗体投与により抑制されたが ($p < 0.01$)、TE-10 に関しては CAFs の培養上清の添加によって BrdU の取り込み量に変化を認めなかった (図 11)。

3) rhPeriostin および CAFs 培養上清による食道扁平上皮癌細胞株での ADAM17 の発現と ERK リン酸化に与える影響

rhPeriostin および CAFs の培養上清による TE-8 の ADAM17 の発現、および細胞内 ERK のリン酸化を検討した (図 12)。その結果、TE-8 での ADAM17 の発現および細胞内 ERK のリン酸化は、rhPeriostin の濃度依存性に発現が亢進した ($p < 0.05$)。さらに、TE-8 を CAFs の培養上清で刺激した場合には、ADAM17 の発現や細胞内 ERK リン酸化は有意に上昇し、これらは OC-20 抗体投与により抑制された。また、NFs の培養上清では ADAM17 の発現および細胞内 ERK のリン酸化は認められなかった。さらに、rhPeriostin および CAFs 培養上清による ADAM17 の発現の亢進は、ERK 阻害剤 (PD98059)によっても有意に抑制された (図 13)。

4) rhPeriostin による MEFs の ADAM17 の活性化に関する検討

TGF- α を遺伝子導入した MEFs に rhPeriostin (1 μ g/mL)、あるいは ADAM17 活性化の positive control として phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を添加したところ、時間依存性に培養上清中の TGF- α の AP 活性量は上昇した (図 14A)。rhPeriostin 刺激により上昇した MEFs の培養上清中の AP 活性量は、ERK 阻害剤 (PD98059)や MMP/ADAM 阻害剤 (BB94)の投与により有意に抑制された ($P < 0.01$) (図 14B)。さらに ADAM17 ノックアウトマウス由来の MEFs (A17KO MEFs) では、rhPeriostin 刺激による AP 活性量に変化をほとんど認めなかった

(図 14C)。IL-1R2 を遺伝子導入した MEFs の実験においても TGF- α の遺伝子導入した場合と同様の結果であった (図省略)。以上より Periostin による ADAM17 の活性化には、ERK1/2 シグナル伝達経路を介するものと考えられた。また、ADAM17 ノックアウトマウス由来の MEFs においても、rhPeriostin 刺激による AP 活性量の上昇が僅かに認められており、Periostin 刺激による ADAM17 活性化以外のメカニズムによっても TGF- α 、IL-1R2 のシェディングが促進される可能性が示唆された。

5) Periostin による Integrin を介した MEFs の ADAM17 活性化、および食道扁平上皮癌細胞株の増殖能に関する検討

Periostin による ERK1/2 および ADAM17 の活性化への Integrin の関与を検討するために、OC-20 (5 μ g/mL) 抗体による ADAM17 活性化や TE-8 における増殖能の変化を検討した。さらに OC-20 抗体と同様に Integrin α V β 3、 α V β 5 阻害作用を持つペプチドである Cilengitide (0.1 μ g/mL; R&D Systems) を用いて同様の検討を行った。その結果、rhPeriostin によって上昇した MEFs の ADAM17 の活性化や TE-8 の増殖能は、OC-20 抗体および Cilengitide 投与により有意に抑制された ($p < 0.01$) (図 15A, B)。

6) Periostin 刺激による TE-8 から放出される TGF- α タンパク量

rhPeriostin 投与により TE-8 培養上清中の TGF- α タンパク量は増加する傾向を認めた ($p = 0.06$)。また、PD98059 および BB94 により ERK1/2 や MMP/ADAM の阻害を行うことにより、培養上清中の TGF- α タンパク量は抑制される傾向を認めた (各 $p = 0.14$ 、 $p = 0.06$) (図 16)。

7) 食道扁平上皮癌細胞株における Integrin や ADAM17 の発現検討

食道扁平上皮癌細胞株での Integrin および ADAM17 の発現を RT-PCR および イムノブロット法により検討した (図 17)。その結果、Integrin α V、Integrin β 5 の mRNA の発現に細胞株間で差を認めなかったが、TE-10 では ADAM17 mRNA の発現が TE-1、TE-8 と比較して弱く、イムノブロット法においても TE-10 では ADAM17 タンパクの発現が低かった。

第 4 節 考察

本検討において食道扁平上皮癌由来の CAFs の培養上清中に Periostin が高発現しており、NFs の培養上清中には発現を認めなかった。さらに、TE-1、TE-8 では、CAFs の培養上清と共培養することで、遊走能と増殖能が亢進したが、いずれの細胞株においても NFs の培養上清の添加では、遊走能と増殖能に変化を認めなかった。また、CAFs の培養上清により亢進した遊走能と増殖能は、Periostin と integrin α V β 3 や integrin α V β 5 との結合を阻害する OC-20 抗体投与によって抑制された。これらの結果から、食道扁平上皮癌においては CAFs から分泌される Periostin が、腫瘍細胞上の integrin に作用することで腫瘍の遊走能や増殖能を促進する可能性が示唆された。

さらに本章の検討では、rhPeriostin や CAFs から分泌される Periostin が ADAM17 を活性化し、ERK1/2、MMP/ADAM や Integrin の阻害を行うことで、ADAM17 の活性化が抑制されることが判明した。ADAM17 の活性化の機序は非常に複雑であり、Rhomoid 5 Homolog 2 (iRhom2)、Polo like kinase 2、MAP kinase や protein kinase C (PKC) などの細胞内キナーゼによるリン酸化や、G-protein coupled receptor、toll-like receptor 4、P2X7 といった受容体の活性化などにより制御されていると報告されている⁽³⁴⁻⁴⁰⁾。本研究では Periostin が Integrin

$\alpha V\beta 3$ や $\alpha V\beta 5$ などの受容体を介して細胞内 ERK1/2 のリン酸化を促進し、ADAM17 の発現や活性を上昇させるといった、新たな機序を証明した。一方、Integrin と ADAM17 の相互作用に関しては、メサンギウム細胞における Integrin $\alpha 5\beta 1$ と ADAM17 の結合体がプロテアーゼを不活化状態に保つという報告もあり^(41, 42)、細胞の種類によって ADAM17 と Integrin の相互作用や機能が異なる可能性がある。

また本研究において、食道扁平上皮癌細胞株の中でも TE-1 や TE-8 では Periostin による遊走能や増殖能の亢進を認めたのに対して、TE-10 では Periostin の遊走能や増殖能に対する効果が乏しかった。TE-10 では TE-1 や TE-8 と比較して ADAM17 の mRNA およびタンパクの発現が低く、これらが Periostin による遊走能や増殖能の違いに関与していると推察され、さらにこの現象は Periostin による遊走能や増殖能には ADAM17 が深く関与している傍証となり得ると考えられた。

本研究の限界として、CAFs の採取検体数が少ないことが挙げられる。進行食道扁平上皮癌では、ほとんどの症例で術前化学療法が施行されており、腫瘍が著明に縮小している症例では CAFs の採取および培養が困難であった。今後、より多くの症例からの CAFs を用いた検証を行う必要がある。さらに今回の検討は *in vitro* のみの解析であり、今後は *in vivo* での Periostin の解析や腫瘍進展に関する研究を行う必要がある。

第 5 節 小括

CAFs から分泌される Periostin により食道扁平上皮癌細胞株 TE-1、TE-8 における遊走能、増殖能は有意に促進され、OC-20 抗体の投与によりそれらは抑制された。rhPeriostin や CAFs の培養上清の添加により MEFs における ADAM17

発現上昇や活性化および細胞内 ERK リン酸化の亢進が見られた。rhPeriostin 刺激により TE-8 から分泌される TGF- α タンパク量は増加し、ERK や ADAM の阻害剤を用いることにより抑制された。さらに Integrin を阻害することにより MEFs の ADAM17 の活性化は抑制され、TE-8 の増殖能は抑制された。

第4章 全体の考察

本研究では、食道扁平上皮癌において Periostin は腫瘍組織に高発現し、正常組織ではほとんど発現を認めなかった。これまでの食道扁平上皮癌におけるプロテオミクス解析や DNA マイクロアレイの報告においても、正常組織と比較して腫瘍組織において Periostin の発現が有意に高いことが報告されている^(22, 23)。しかしながら既報では、Periostin の産生細胞、および局在に関しては明らかにされておらず、腫瘍細胞から分泌されているのか、あるいは CAFs のような非上皮性細胞由来なのかは不明であった。第2章の免疫染色および蛍光二重免疫染色の結果から、Periostin は間質細胞、特に CAFs に強く発現しており、またイムノブロットによる解析では腫瘍細胞自体ではなく CAFs から分泌されていることが判明した。

さらに第3章の検討では、CAFs から分泌される Periostin は食道扁平上皮癌細胞株の遊走能や増殖能を促進し、それらは Periostin と Integrin α V β 3、 α V β 5 の結合を阻害する OC-20 抗体を用いることにより抑制された。また、第3章において Periostin が ADAM17 の発現や活性化を促進し、それらは Integrins や ERK の阻害剤を用いることで抑制されていた。以上の結果から、食道扁平上皮癌においては、CAFs から分泌される Periostin が腫瘍細胞上の Integrins に作用して細胞内 ERK1/2 のリン酸化、ADAM17 の活性化を介して TGF- α などの炎症性 mediator を産生し、これが CAFs からのさらなる Periostin の産生を促進させる positive feedback loop の存在が考えられた (図 18)。本研究では、腫瘍内微小環境での Periostin や ADAM17 を介した炎症反応が、食道扁平上皮癌における腫瘍増殖および遊走能に関与する分子機構を解明した。将来的には上記 positive feedback loop を阻害する新たな治療薬の開発につながる基礎データの一助となる可能性があると考えられる。

第5章 結論

食道扁平上皮癌における Periostin 発現の意義および腫瘍増殖に与える影響や分子機構に関して以下のことを明らかにした。

- 1) 食道扁平上皮癌症例では、Periostin はイムノブロット法により正常組織では発現がなく、腫瘍組織に特異的に発現することが証明された。また免疫組織化学染色において、Periostin 抗体で染色される間質細胞が、がん間質細胞全体に占める割合の 50%以上が陽性であった症例は 171 例中 117 例 (68.4%) であった。Periostin は腫瘍細胞ではなく間質に強く染色され、特に CAFs に発現していた。また、Periostin の高発現は腫瘍の進行度や予後とも強く関連し、全身性の炎症・栄養マーカーとの関連も認めた。
- 2) Periostin は CAFs の培養上清中に高発現し、正常組織での線維芽細胞やその培養上清中では発現していなかった。CAFs の培養上清の添加により食道癌細胞株 (TE-1、TE-8) の遊走能、および増殖能は促進され、その作用は抗 Periostin 阻害抗体 (OC-20) 処理により抑制されたことから、CAFs の培養上清中の Periostin が食道癌細胞株の遊走能および増殖能に関与していることが窺われた。また ADAM17 の発現が弱い TE-10 においては、Periostin による遊走能、増殖能の変化は認められなかった。
- 3) Periostin や CAFs の培養上清を添加することにより、TE-8 細胞での ADAM17 の活性化、および細胞内 ERK のリン酸化が亢進した。Periostin と Integrin の相互作用を阻害することにより、ADAM17 の活性化は抑制され、食道扁平上皮癌細胞株の増殖能は抑制された。以上より、CAFs から分泌された Periostin が腫瘍細胞上の Integrin に作用し、細胞内 ERK のリン酸化を介して ADAM17 を活性化することにより、癌微小環境における炎症反応を惹起し、食道扁平上皮癌細胞株の遊走能や増殖能を促進する可能性が考え

られた。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました防衛医科大学校病院医療安全・感染対策部の辻本広紀教授、外科学講座の上野秀樹教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始ご教示をいただきました防衛医科大学校外科学講座の望月早月助教、整形外科学講座堀内圭輔准教授の両氏に深く感謝いたしますとともに、研究にご協力いただきました講座の諸先生方に感謝いたします。

本研究の主旨は、以下の学会において発表した。

- ・第 75 回 日本食道学会学術集会 (2021 年 9 月、東京)
- ・第 52 回 日本結合組織学会学術大会 (2020 年 9 月、Web 開催)
- ・第 53 回 日本結合組織学会学術大会 (2021 年 6 月、東京)

Young Investigation Award 受賞

- ・第 122 回 日本外科学会定期学術集会 (2022 年 4 月、熊本)
- ・第 67 回 国際外科学会日本部会総会 (2022 年 6 月、千葉)

Young Investigation Award 受賞

- ・第 77 回 日本消化器外科学会総会 (2022 年 7 月、横浜)
- ・第 27 回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2022 年 8 月、愛媛)

獲得研究費

- ・2020 年度 金原一郎記念医学医療振興財団基礎医学医療研究助成金「食道扁平上皮癌におけるペリオスチンの発現とその阻害による治療効果の検討; 50 万円」
- ・2021 年度 防衛医学基盤研究 C「Periostin による ADAM17 活性化と食道扁平上皮癌細胞増殖・転移機構の解明; 135 万円」

本研究の主旨は、以下の論文として発表し、後半の内容に関しては投稿準備中である。

Ishibashi Y, Tsujimoto H, Hiraki S, Kumano I, Yaguchi Y, Horiguchi H, Nomura S, Ito N, Shinto E, Aosasa S, Yamamoto J, Ueno H: Prognostic value of preoperative systemic immunoinflammatory measures in patients with esophageal cancer, *Annals of Surgical Oncology* 25(11): 3288-3299, 2018

Ishibashi Y, Tsujimoto H, Yaguchi Y, Kishi Y, Ueno, H: Prognostic significance of systemic inflammatory markers in esophageal cancer: Systematic review and meta-analysis, *Annals of Gastroenterological Surgery* 4(1): 56-63, 2020

Ishibashi Y, Tsujimoto H, Einama T, Mochizuki S, Kouzu K, Nomura S, Ito N, Harada M, Sugawara H, Shinto E, Kishi Y, Ueno H: Correlation between immunoinflammatory measures and Periostin expression in esophageal squamous cell carcinoma: A single-center, retrospective cohort study, *Annals of Surgical Oncology* 28(2):1228-1237, 2021

略語一覧(アルファベット順)

AP	alkaline phosphatase
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
BrdU	bromodeoxyuridine
CAFs	cancer-associated fibroblasts
CAR	C-reactive protein to albumin ratio
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESCC	esophageal squamous cell carcinoma
FAP	fibroblast-activation protein
FBS	fetal bovine serum
FSP	fibroblast-specific protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	hematoxylin-eosin
HRP	horseradish peroxidase
IL-1R2	interleukin-1 receptor type 2
MMP	matrix metalloproteinase
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
NFs	non-cancer-associated fibroblasts
NLR	neutrophil to lymphocyte ratio
OS	overall survival
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF	polyvinylidene difluoride
PLR	platelet to lymphocyte ratio
RFS	relapse-free survival

SDS	sodium dodecyl sulfate
TACE	tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TGF- α	transforming growth factor- α

引用文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. *Lancet*. 2013;381:400–412.
3. Ishibashi Y, Tsujimoto H, Hiraki S, Kumano I, Yaguchi Y, Horiguchi H, et al. Prognostic value of preoperative systemic immunoinflammatory measures in patients with esophageal cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2018;25(11):3288-99.
4. Ishibashi Y, Tsujimoto H, Yaguchi Y, Kishi Y, Ueno H. Prognostic significance of systemic inflammatory markers in esophageal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Annals of gastroenterological surgery*. 2020;4(1):56-63.
5. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
6. Kudo A. Introductory review: periostin—gene and protein structure. *Cellular and molecular life sciences*. 2017;74(23):4259-68.
7. Liu Y, Huang Z, Cui D, Ouyang G. The multiaspect functions of periostin in tumor progression. *Periostin*. 2019:125-36.
8. Ikeda-Iwabu Y, Taniyama Y, Katsuragi N, Sanada F, Koibuchi N, Shibata K, et al. Periostin Short Fragment with Exon 17 via Aberrant Alternative Splicing Is Required for Breast Cancer Growth and Metastasis. *Cells*. 2021;10(4):892.
9. Attur M, Yang Q, Shimada K, Tachida Y, Nagase H, Mignatti P, et al. Elevated expression of periostin in human osteoarthritic cartilage and its potential role in matrix

- degradation via matrix metalloproteinase - 13. *The FASEB Journal*. 2015;29(10):4107-21.
10. Watanabe T, Yasue A, Fujihara S, Tanaka E. PERIOSTIN regulates MMP-2 expression via the $\alpha v\beta 3$ integrin/ERK pathway in human periodontal ligament cells. *Archives of oral biology*. 2012;57(1):52-9.
11. Hirano T, Murakami M. COVID-19: a new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. *Immunity*. 2020;52(5):731-3.
12. Liu H, Zhu Y, Yang Q, Shen Y, Zhang X, Chen H. Expression and clinical significance of ADAM17 protein in esophageal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):4391-8.
13. Ando N, Kato H, Igaki H, Shinoda M, Ozawa S, Shimizu H, et al. A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Annals of surgical oncology*. 2012;19(1):68-74.
14. Nakamura K, Kato K, Igaki H, Ito Y, Mizusawa J, Ando N, et al. Three-arm phase III trial comparing cisplatin plus 5-FU (CF) versus docetaxel, cisplatin plus 5-FU (DCF) versus radiotherapy with CF (CF-RT) as preoperative therapy for locally advanced esophageal cancer (JCOG1109, NExT study). *Japanese journal of clinical oncology*. 2013;43(7):752-5.
15. Kato K, Shah MA, Enzinger P, Bennouna J, Shen L, Adenis A, et al. KEYNOTE-590: Phase III study of first-line chemotherapy with or without pembrolizumab for advanced esophageal cancer. *Future Oncology*. 2019;15(10):1057-66.

16. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor β . *Journal of bone and mineral research*. 1999;14(7):1239-49.
17. Ben Q-W, Zhao Z, Ge S-F, Zhou J, Yuan F, Yuan Y-Z. Circulating levels of periostin may help identify patients with more aggressive colorectal cancer. *International journal of oncology*. 2009;34(3):821-8.
18. Xu X, Chang W, Yuan J, Han X, Tan X, Ding Y, et al. Periostin expression in intra-tumoral stromal cells is prognostic and predictive for colorectal carcinoma via creating a cancer-supportive niche. *Oncotarget*. 2016;7(1):798.
19. Hong L-Z, Wei X-W, Chen J-F, Shi Y. Overexpression of periostin predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*. 2013;6(6):1595-603.
20. Puglisi F, Puppini C, Pegolo E, Andreatta C, Pascoletti G, D'Aurizio F, et al. Expression of periostin in human breast cancer. *Journal of clinical pathology*. 2008;61(4):494-8.
21. Lv Y, Wang W, Jia W-D, Sun Q-K, Li J-S, Ma J-L, et al. High-level expression of periostin is closely related to metastatic potential and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology*. 2013;30(1):1-9.
22. Li J-S, Sun G-W, Wei X-Y, Tang W-H. Expression of periostin and its clinicopathological relevance in gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2007;13(39):5261.

23. Pawar H, Kashyap MK, Sahasrabudde NA, Renuse S, Harsha H, Kumar P, et al. Quantitative tissue proteomics of esophageal squamous cell carcinoma for novel biomarker discovery. *Cancer biology & therapy*. 2011;12(6):510-22.
24. Kashyap MK, Marimuthu A, Kishore CJH, Peri S, Keerthikumar S, Prasad TSK, et al. Genomewide mRNA profiling of esophageal squamous cell carcinoma for identification of cancer biomarkers. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(1):36-46.
25. Wang W, Sun Q-K, He Y-F, Ma D-C, Xie M-R, Ji C-S, et al. Overexpression of periostin is significantly correlated to the tumor angiogenesis and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(2):593.
26. Yamauchi N, Kanke Y, Saito K, Okayama H, Yamada S, Nakajima S, et al. Stromal expression of cancer-associated fibroblast-related molecules, versican and lumican, is strongly associated with worse relapse-free and overall survival times in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2021;21(6):1-8.
27. Ma H, Wang J, Zhao X, Wu T, Huang Z, Chen D, et al. Periostin promotes colorectal tumorigenesis through integrin-FAK-Src pathway-mediated YAP/TAZ activation. *Cell reports*. 2020;30(3):793-806. e6.
28. Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Science*. 2007;98(5):621-8.
29. Mochizuki S, Ao T, Sugiura T, Yonemura K, Shiraishi T, Kajiwara Y, et al. Expression and function of a disintegrin and metalloproteinases in cancer-associated fibroblasts of colorectal cancer. *Digestion*. 2020;101(1):18-24.
30. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, et al. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by

inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(7):2292-306.

31. Johansson MW, Khanna M, Bortnov V, Annis DS, Nguyen CL, Mosher DF. IL - 5 - stimulated eosinophils adherent to periostin undergo stereotypic morphological changes and ADAM 8 - dependent migration. *Clinical & Experimental Allergy*. 2017;47(10):1263-74.
32. Sahin U, Weskamp G, Zheng Y, Chesneau V, Horiuchi K, Blobel CP. A sensitive method to monitor ectodomain shedding of ligands of the epidermal growth factor receptor. *Epidermal Growth Factor: Springer*; 2006. p. 99-113.
33. Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, et al. ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine*. 2015;71(2):238-45.
34. Schwarz J, Schmidt S, Will O, Koudelka T, Köhler K, Boss M, et al. Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor α ectodomain shedding. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(5):3080-93.
35. Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto A, Sakai M, Gunji Y, et al. Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology*. 2014;155(3):1080-90.
36. Yin J, Fu-Shin XY. ERK1/2 mediate wounding-and G-protein-coupled receptor ligands-induced EGFR activation via regulating ADAM17 and HB-EGF shedding. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(1):132-9.

37. Choi Y, Kim JW, Nam KH, Han S-H, Kim J-W, Ahn S-H, et al. Systemic inflammation is associated with the density of immune cells in the tumor microenvironment of gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2017;20(4):602-11.
38. Barberà-Cremades M, Gómez AI, Baroja-Mazo A, Martínez-Alarcón L, Martínez CM, de Torre-Minguela C, et al. P2X7 receptor induces tumor necrosis factor- α converting enzyme activation and release to boost TNF- α production. *Frontiers in immunology*. 2017;8:862.
39. McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, et al. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS. *Science*. 2012;335(6065):229-32.
40. Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacological research*. 2013;71:19-22.
41. Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin in kidney mesangial cells. *PloS one*. 2012;7(3):e33350.
42. Trad A, Riese M, Shomali M, Hedeman N, Effenberger T, Grötzinger J, et al. The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblast-carcinoma cell interactions. *International journal of oncology*. 2013;42(5):1793-800.

図表

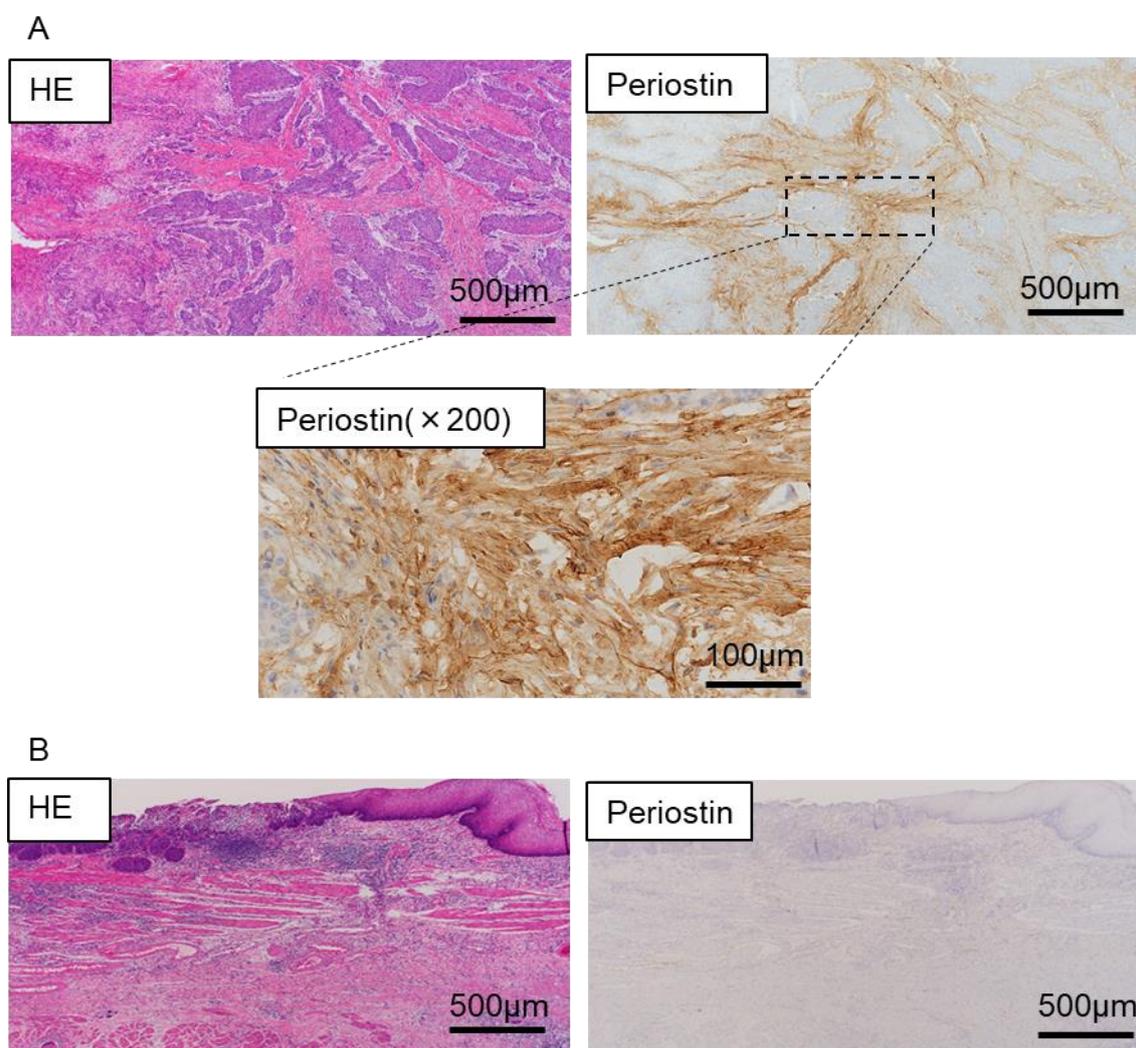


図 1 Periostin の免疫組織化学染色

(A)Periostin 高発現例。食道扁平上皮癌先進部の間質において、抗 Periostin 抗体で染色される面積の割合ががん間質全体の 50%以上認められる症例を陽性とした。(B)Periostin 低発現例。

HE; hematoxylin-eosin

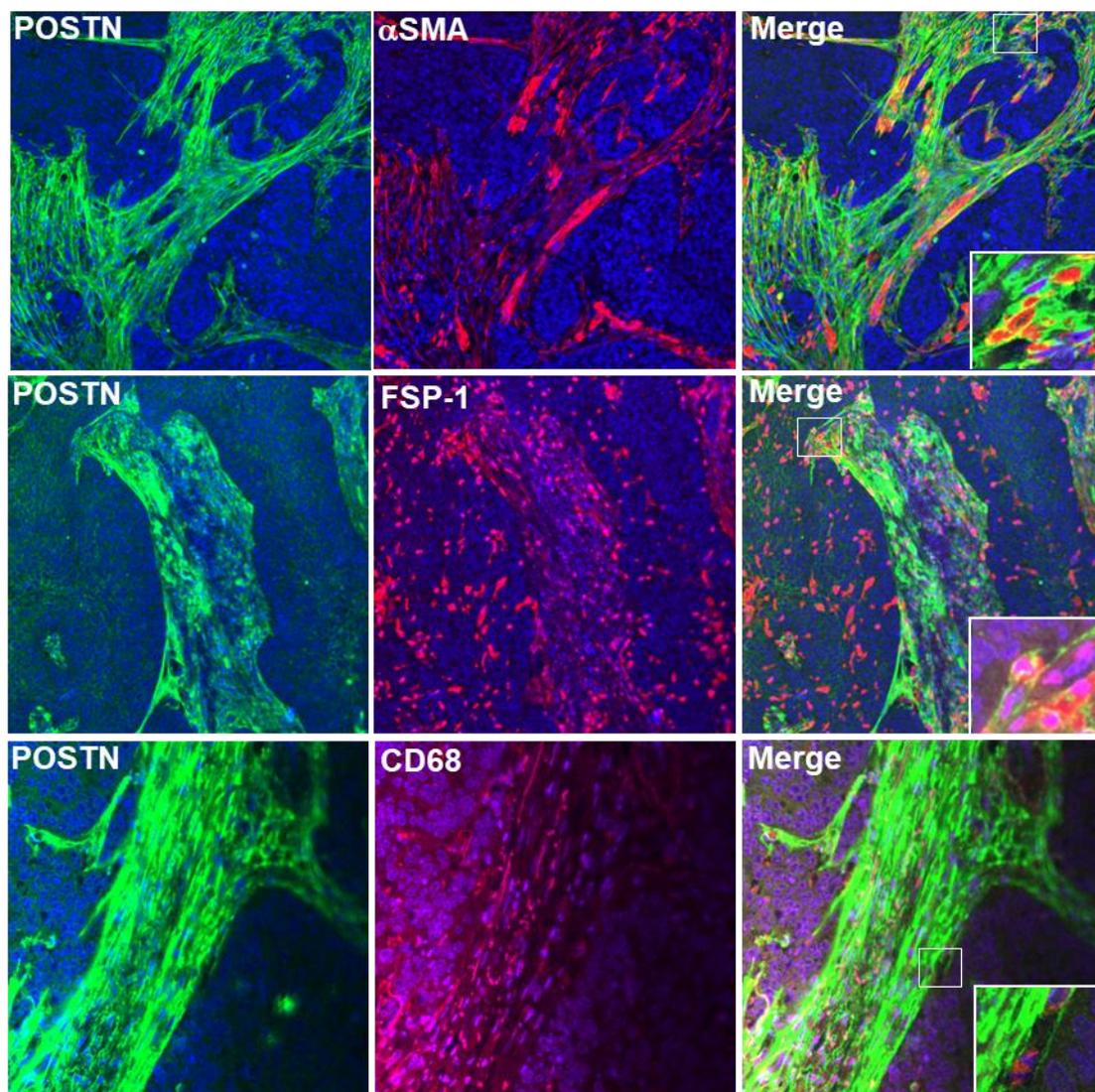


図 2 蛍光二重免疫組織化学染色

Periostin (緑)は CAFs のマーカーである α -SMA (赤)や FSP-1 (赤)と共染色され (黄)、マクロファージのマーカーである CD68 (赤)とは共染色されなかったことから、Periostin は間質細胞の中でも CAFs で発現していると考えられた。

α -SMA; alpha-smooth muscle actin, FSP-1; fibroblast-specific protein

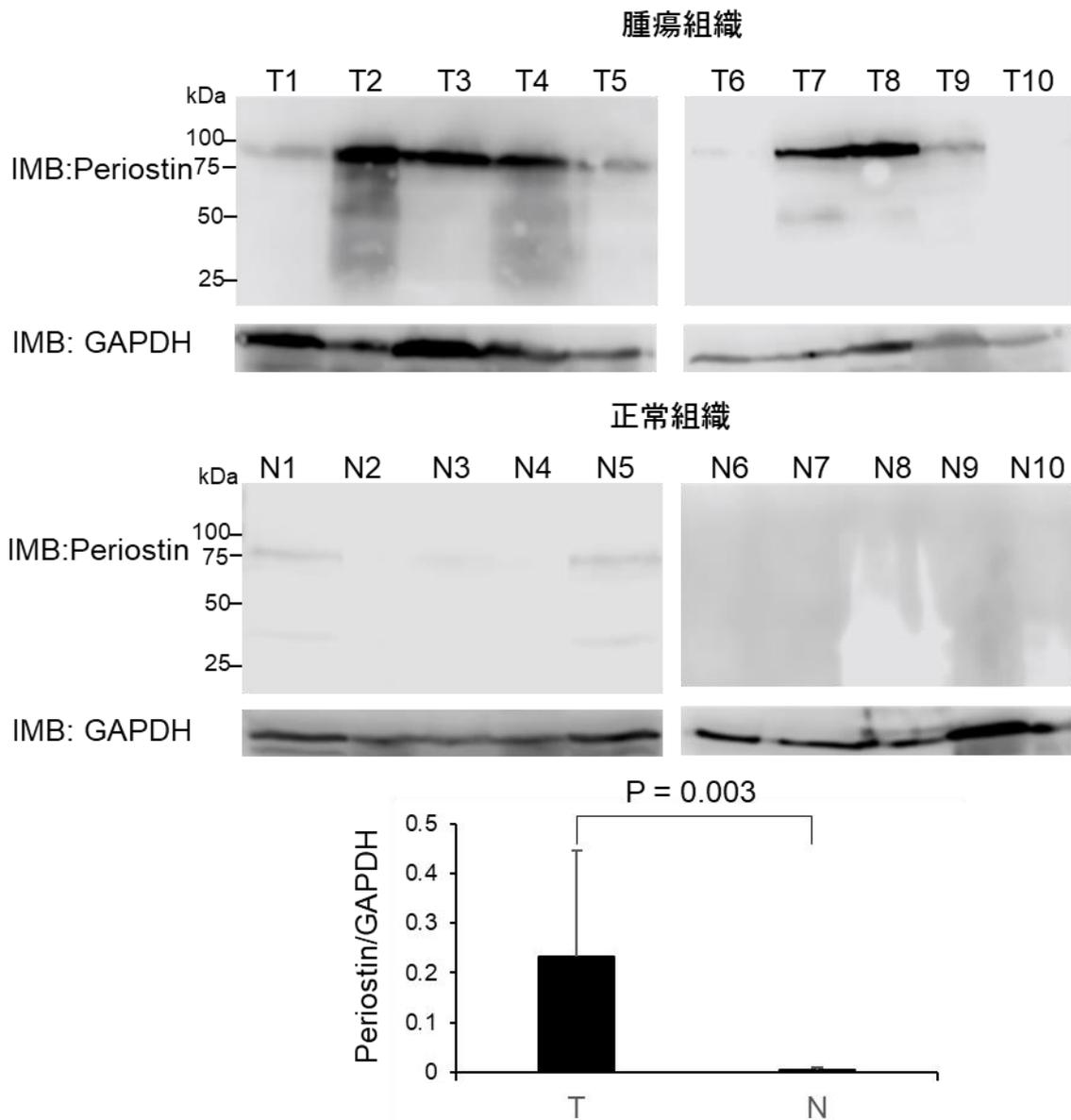


図3 腫瘍組織と正常組織における Periostin の発現

イムノブロットでは、Periostin は腫瘍組織 (n = 10)において強く発現を認め、正常組織 (n = 10)においてはほとんど発現を認めなかった (P = 0.003)。

T; 腫瘍組織、N; 正常組織

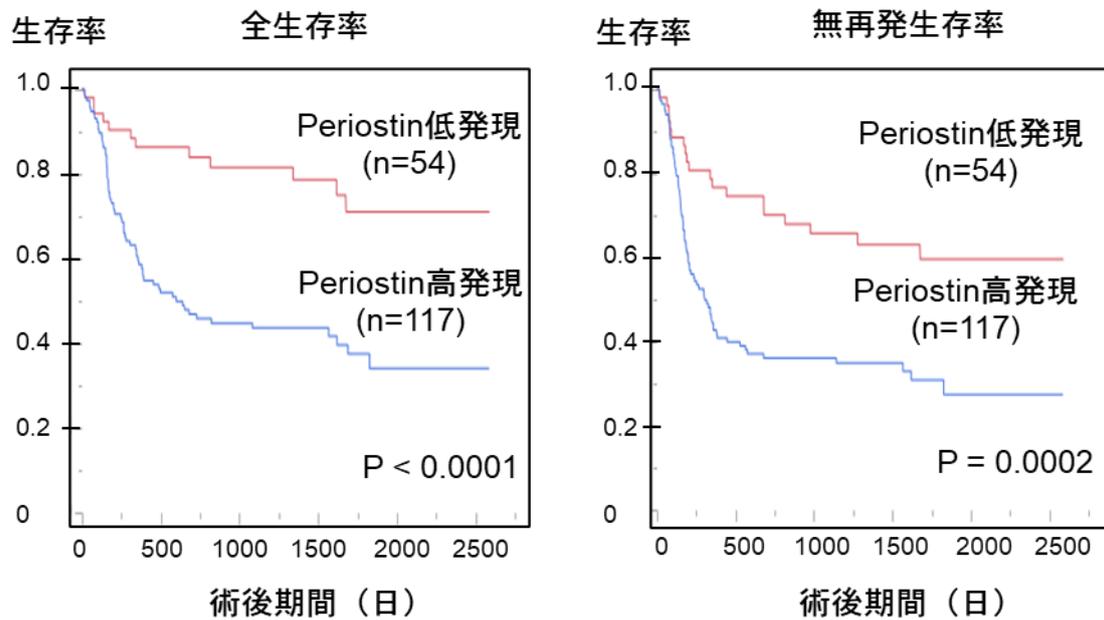


図 4 Periostin 発現別の全生存率および無再発生存率

Periostin 高発現例 (n = 54)は、Periostin 低発現例 (n = 117)と比較して、全生存率 ($P < 0.001$)、無再発生存率 ($P = 0.0002$)ともに有意に低値であった。

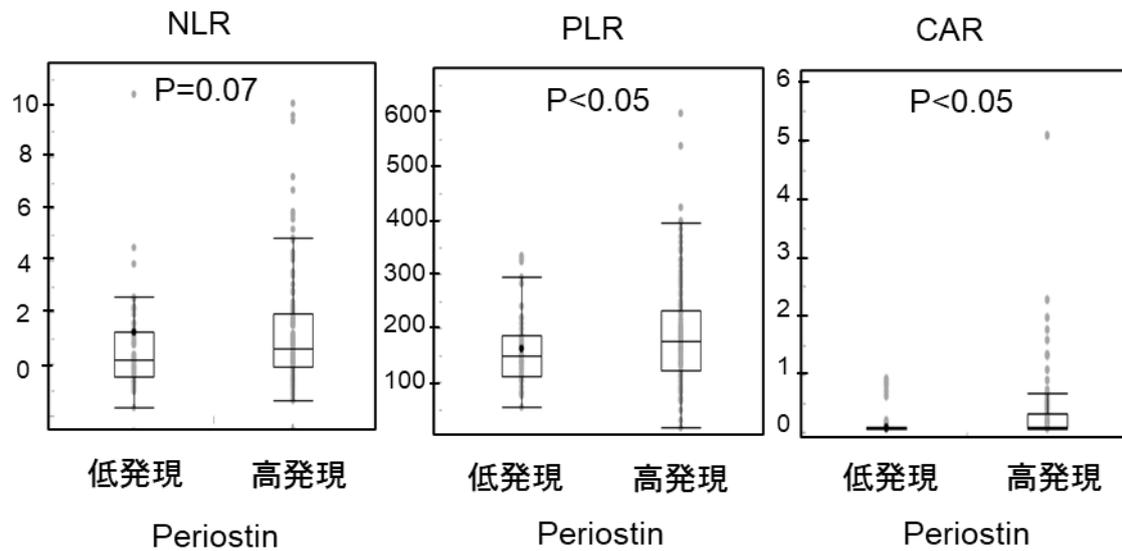


図 5 食道癌組織での Periostin の発現と全身性炎症・栄養マーカーとの関連

Periostin 高発現例は、低発現例と比較して NLR が高い傾向を認めた(3.27 ± 0.19 vs. 2.65 ± 0.28 ; $P = 0.07$)。PLR (189.6 ± 8.0 vs. 159.3 ± 12.0 ; $P < 0.05$)、CAR (0.36 ± 0.06 vs. 0.14 ± 0.09 ; $P < 0.05$)に関しては Periostin 高発現例は、低発現例と比較して有意に高値であった。各グラフは平均値±標準誤差で表記した。

NLR; neutrophil to lymphocyte ratio, PLR; platelet to lymphocyte ratio, CAR; C-reactive protein to albumin ratio

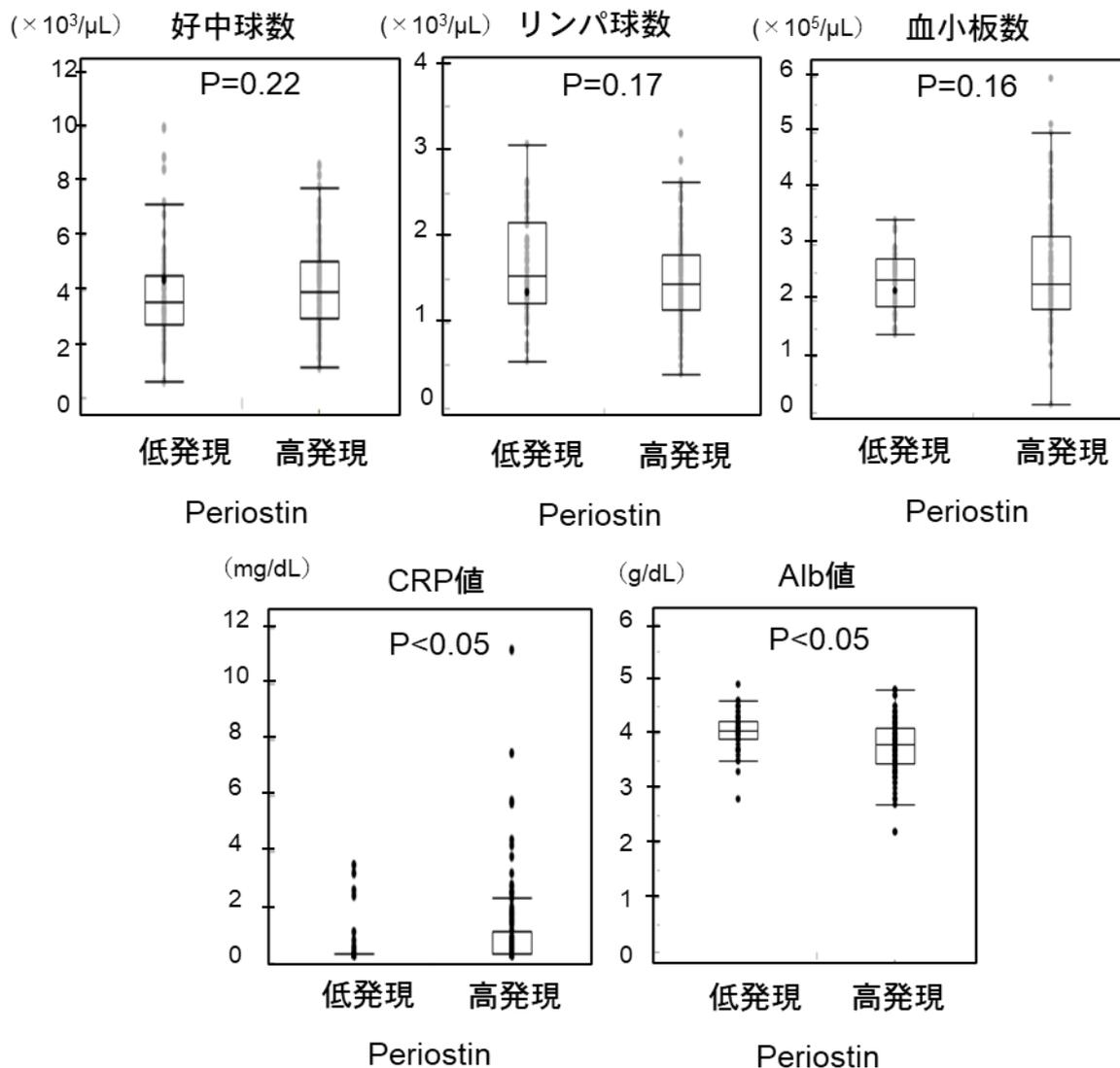


図 6 Periostin の発現と全身性炎症・栄養マーカーの構成因子との関連

Periostin 高発現例は、低発現例と比較して好中球数 ($4251 \pm 184 /\mu\text{L}$ vs. $3848 \pm 272 /\mu\text{L}$; $P = 0.22$)、リンパ球数 ($1519 \pm 53 /\mu\text{L}$ vs. $1648 \pm 78 /\mu\text{L}$; $P = 0.17$)、血小板数 ($234419 \pm 11719 /\mu\text{L}$ vs. $254188 \pm 7961 /\mu\text{L}$; $P = 0.16$)に関して両群間に差を認めなかった。一方で Periostin 高発現例は、低発現例と比較して CRP 値 ($1.15 \pm 0.23 \text{ mg/dL}$ vs. $0.52 \pm 0.23 \text{ mg/dL}$; $P < 0.05$)が有意に高値で、アルブミン値 ($3.76 \pm 0.04 \text{ g/dL}$ vs. $4.04 \pm 0.06 \text{ g/dL}$; $P < 0.05$)が有意に低値であった。各グラフは平均値±標準誤差で表記した。

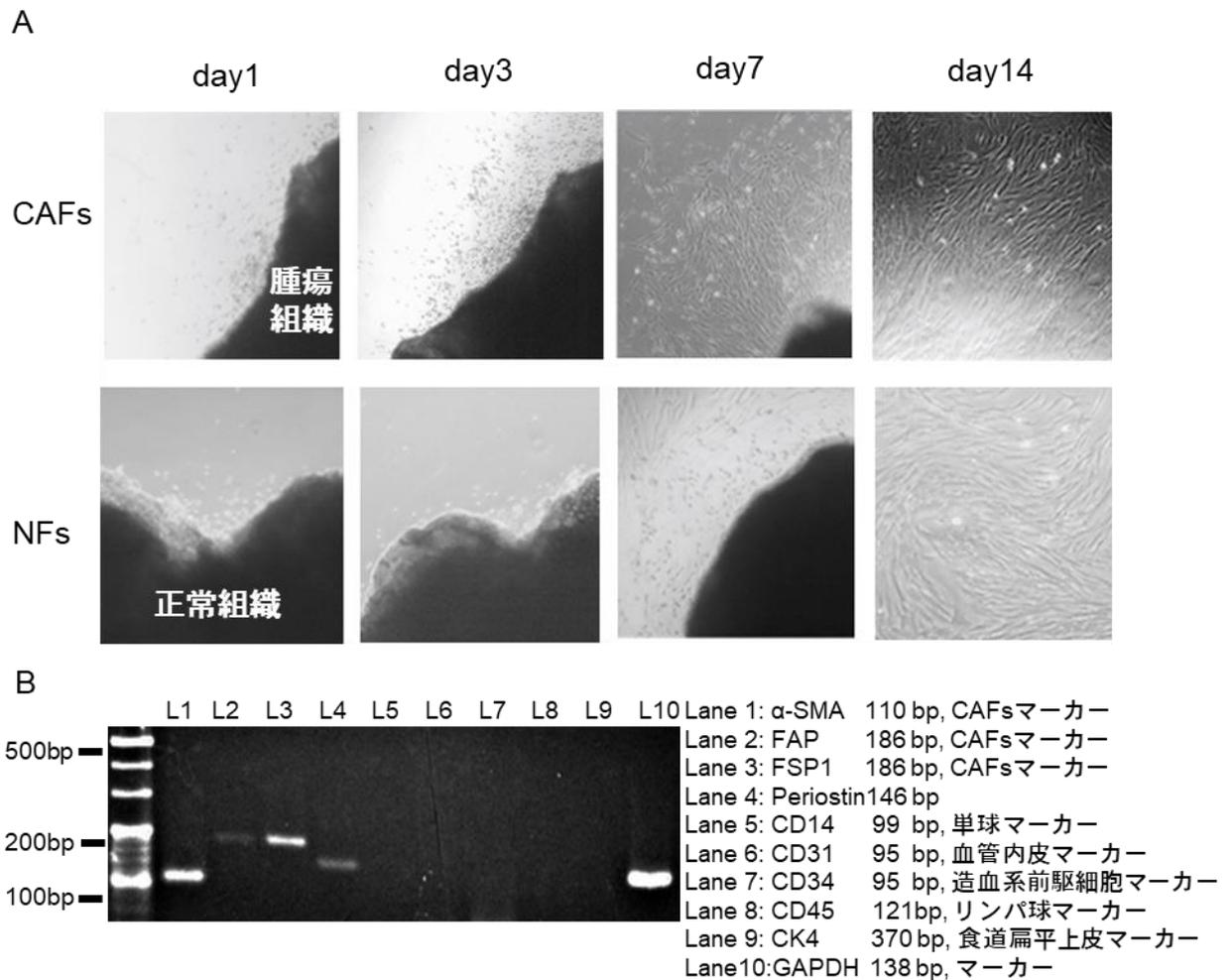


図7 CAFs と NFs の培養

(A)腫瘍組織と正常組織からの CAFs と NFs の培養。食道扁平上皮癌手術検体から腫瘍および正常組織の漿膜下層組織をそれぞれ採取し、CAFs および NFs をそれぞれ培地上で培養した。培養 14 日目の段階で CAFs、NFs 共に紡錘形の線維芽細胞が培養され、その後 3~7 継代して実験に使用した。(B)CAFs における線維芽細胞マーカーの発現。培養した CAFs から Total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。線維芽細胞マーカー (α -SMA、FAP、FSP-1)、および Periostin が陽性で、血球マーカー (CD14、CD31、CD34、CD45)や食道扁平上皮マーカー (CK4)が陰性であることを確認した。

CAF; cancer-associated fibroblasts, NF; normal fibroblasts, α -SMA; alpha-smooth muscle actin, FAP; fibroblast-activation protein, FSP; fibroblast-specific protein

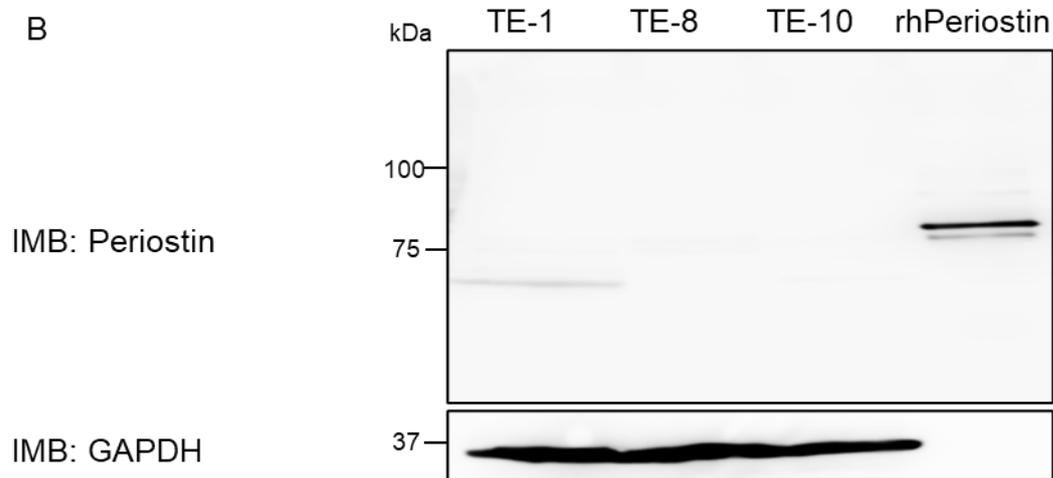
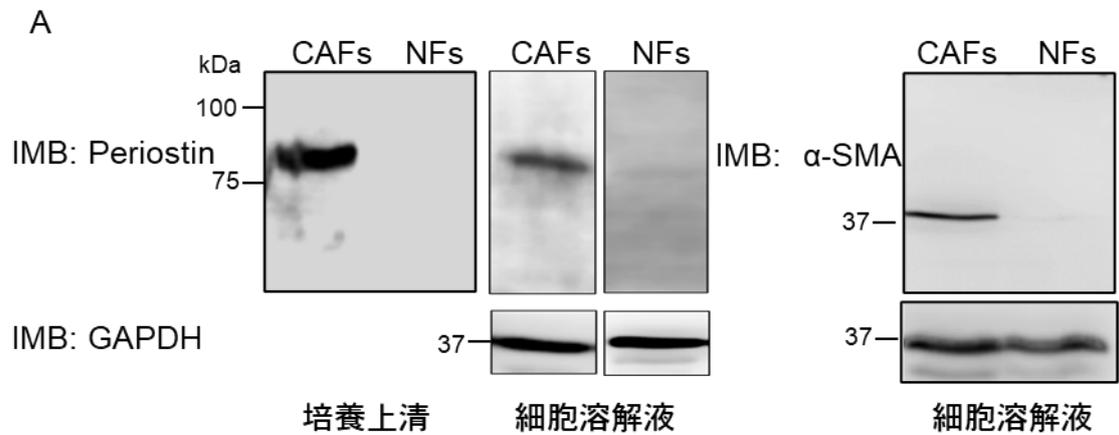


図 8 イムノブロット法による Periostin 発現の検討

(A)CAFs および NFs における培養上清と細胞内での Periostin の発現。CAFs 上清で細胞溶解液と比較して Periostin が強く発現し、NFs の細胞溶解液や培養上清には Periostin の発現はほとんど認めなかった。CAFs の溶解液では α -SMA の発現を確認した。(B)食道扁平上皮癌細胞株溶解液における Periostin 発現。食道扁平上皮癌細胞株 (TE-1、TE-8、TE-10)の細胞溶解液では Periostin は発現していなかった。

CAF; cancer-associated fibroblasts, NF; normal fibroblasts, rhPeriostin; recombinant human Periostin

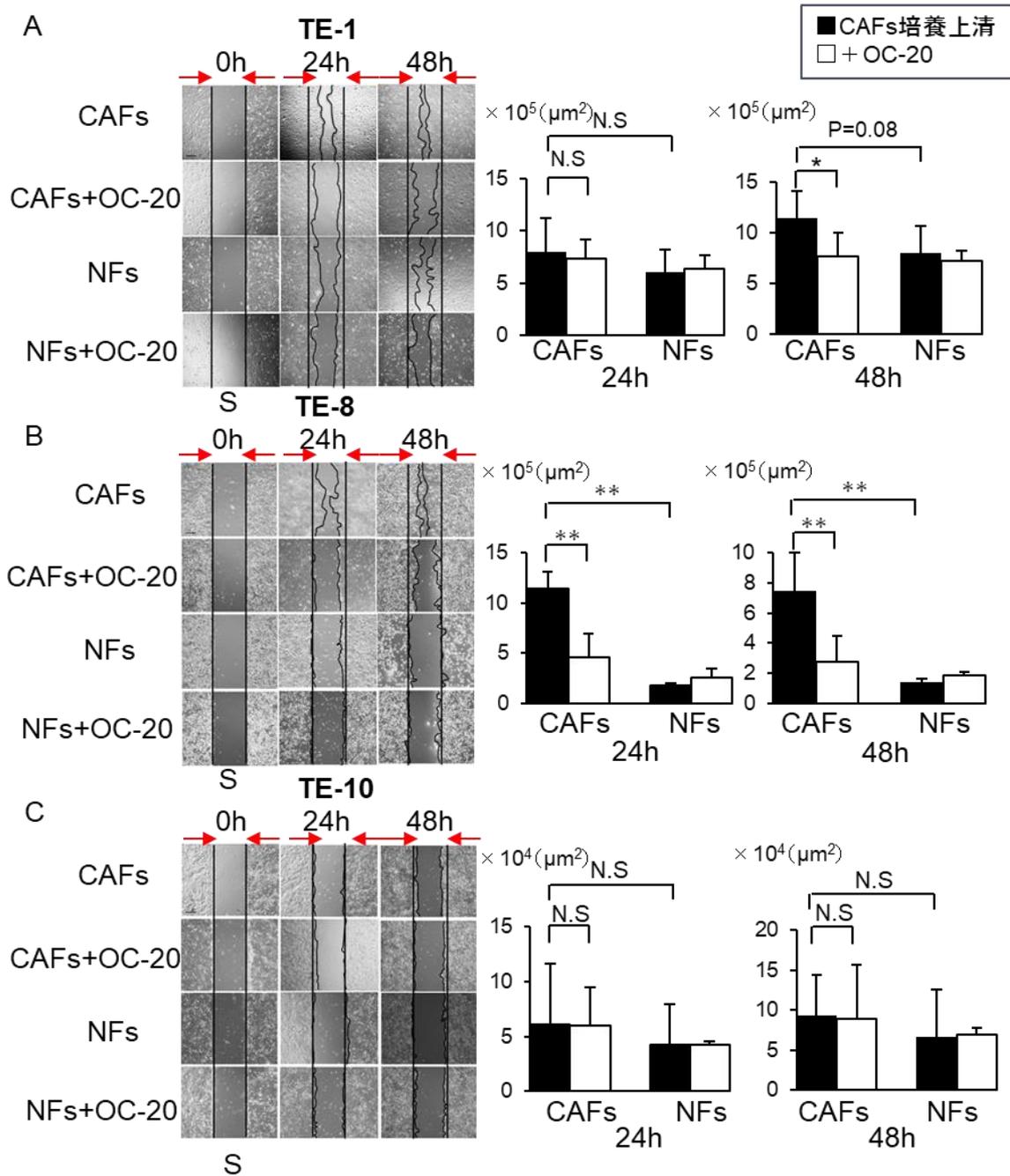


図9 CAFsの培養上清による食道扁平上皮癌細胞株の遊走能に与える影響

TE-1、TE-8ではCAF'sの培養上清添加によりスクラッチ(S)に向かう遊走能が促進され、OC-20抗体投与により有意に抑制された(A, B)。TE-10ではCAF'sの培養上清添加やOC-20抗体投与によって遊走能に変化を認めなかった(C)。各実験は独立して繰り返し4回以上施行し、同様の結果を得た。S; Scratch, CAF's; cancer-associated fibroblasts, NF's; normal fibroblasts * P < 0.05, ** P < 0.01

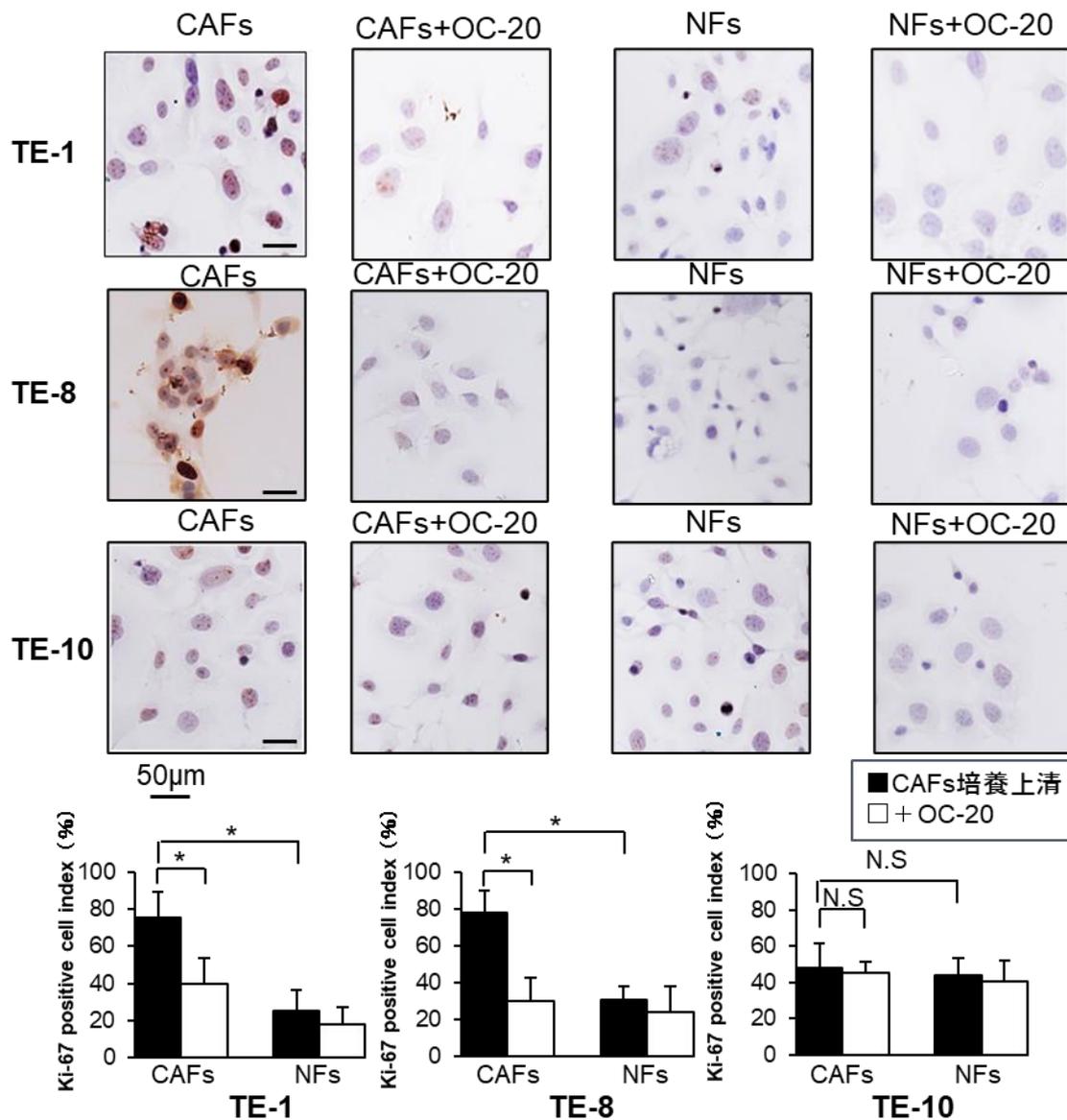


図 10 CAFs の培養上清による食道扁平上皮癌細胞株の増殖能に与える影響 (Ki-67 免疫染色)

光学顕微鏡 (400 倍) で核が褐色に染色されたものを Ki-67 陽性とし、全腫瘍細胞数中の陽性細胞の占める割合 (陽性細胞数/全腫瘍細胞数) を百分率にて算出した。TE-1 および TE-8 では、CAFs の培養上清添加により有意に Ki-67 の発現が上昇し、それらは OC-20 抗体投与により抑制された。TE-10 に関しては CAFs の培養上清添加や OC-20 抗体投与によって変化を認めなかった。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行し、同様の結果を得た。

CAF; cancer-associated fibroblasts, NF; normal fibroblasts * P < 0.01

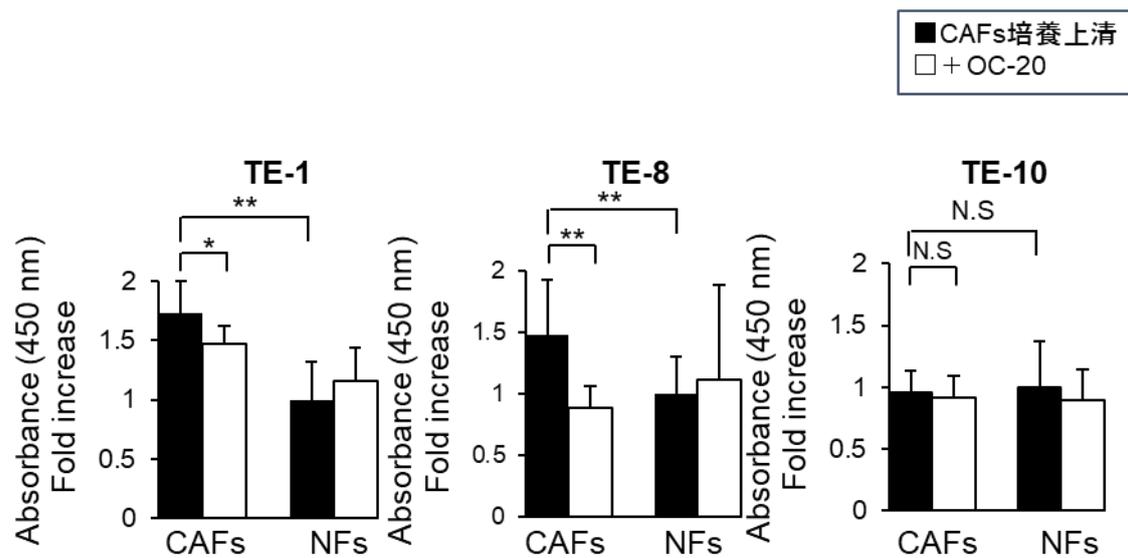


図 11 CAFs の培養上清による食道扁平上皮癌細胞株の増殖能に与える影響 (Cell Proliferation ELISA 法)

TE-1 および TE-8 では CAFs の培養上清添加により有意に BrdU の取り込みが上昇し、それらは OC-20 抗体投与により有意に抑制された。TE-10 に関しては CAFs の培養上清添加や OC-20 抗体投与によって BrdU の取り込みに変化を認めなかった。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行した。各実験は独立して繰り返し 3 回以上施行し、同様の結果を得た。

CAF; cancer-associated fibroblasts, NF; normal fibroblasts, BrdU;

Bromodeoxyuridine * P < 0.05, ** P < 0.01

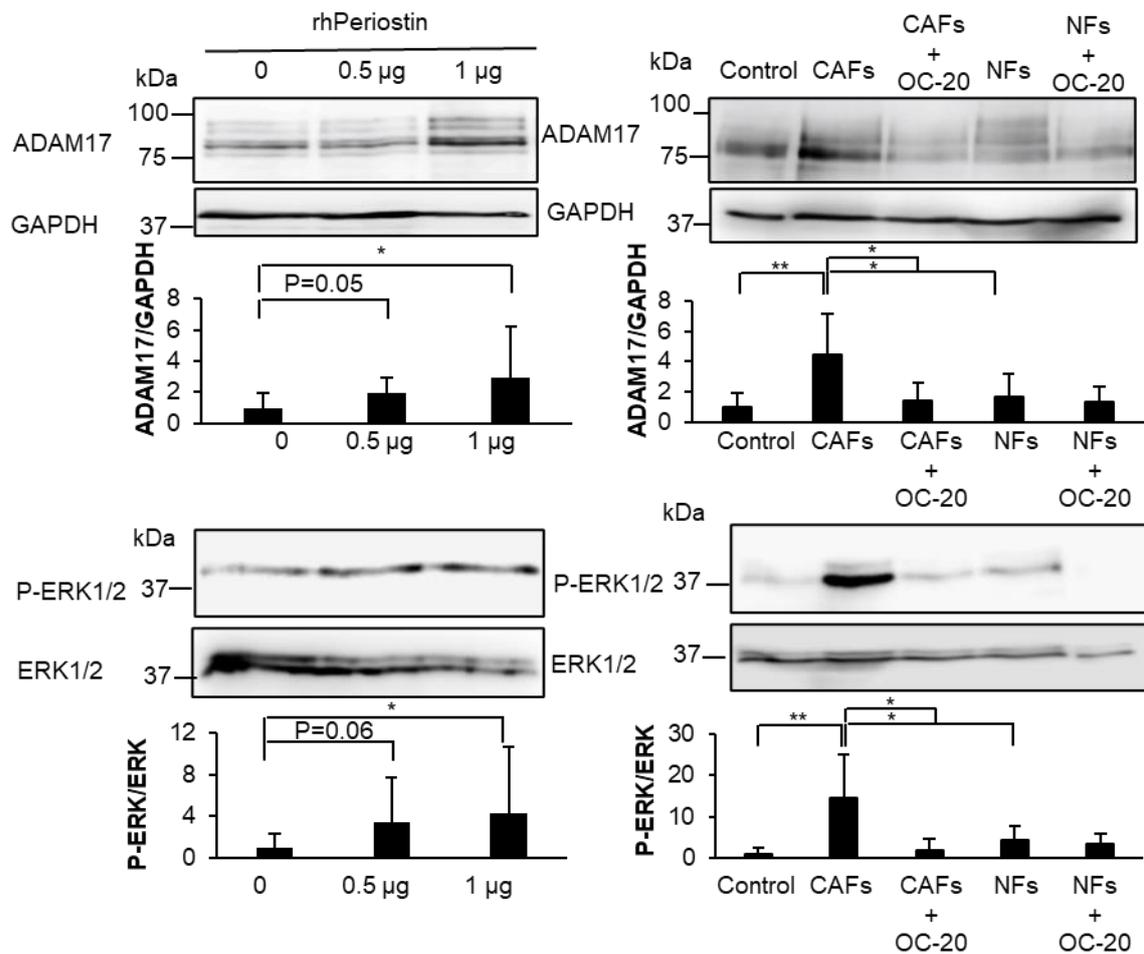


図 12 rhPeriostin や CAFs の培養上清による TE-8 の ADAM17 の発現や細胞内 ERK1/2 リン酸化の検討

rhPeriostin または CAFs の培養上清添加により TE-8 の ADAM17 発現や細胞内 ERK のリン酸化は濃度依存性に上昇し、それらは OC-20 抗体投与により有意に抑制された。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行し、同様の結果を得た。

CAFs; cancer-associated fibroblasts, NFs; normal fibroblasts, rhPeriostin; recombinant human Periostin * P < 0.05, ** P < 0.01

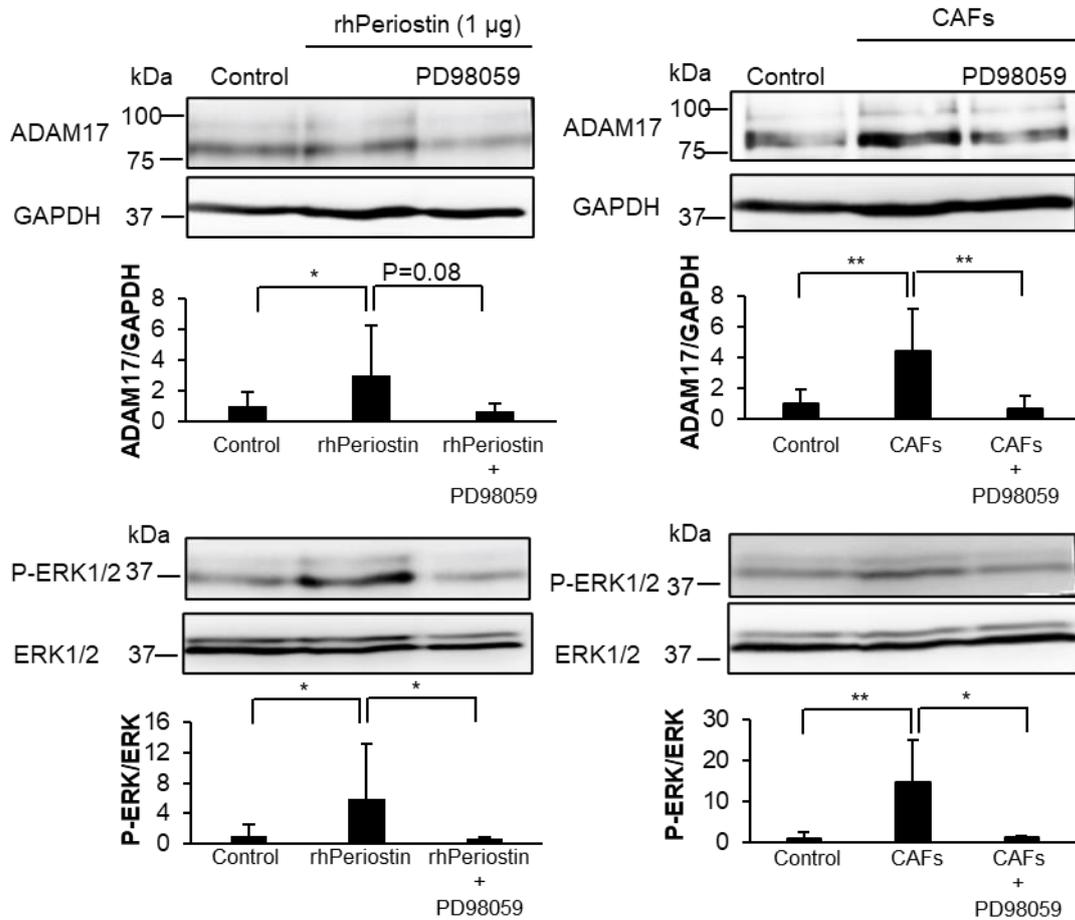


図 13 ERK 阻害剤 (PD98059)投与による TE-8 の ADAM17 や細胞内 ERK1/2 発現の抑制効果

rhPeriostin または CAFs の培養上清添加による TE-8 の ADAM17 発現や細胞内 ERK のリン酸化は、ERK 阻害剤 (PD98059)の投与により有意に抑制された。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行し、同様の結果を得た。

CAFs; cancer-associated fibroblasts, rhPeriostin; recombinant human Periostin

* P < 0.05, ** P < 0.01

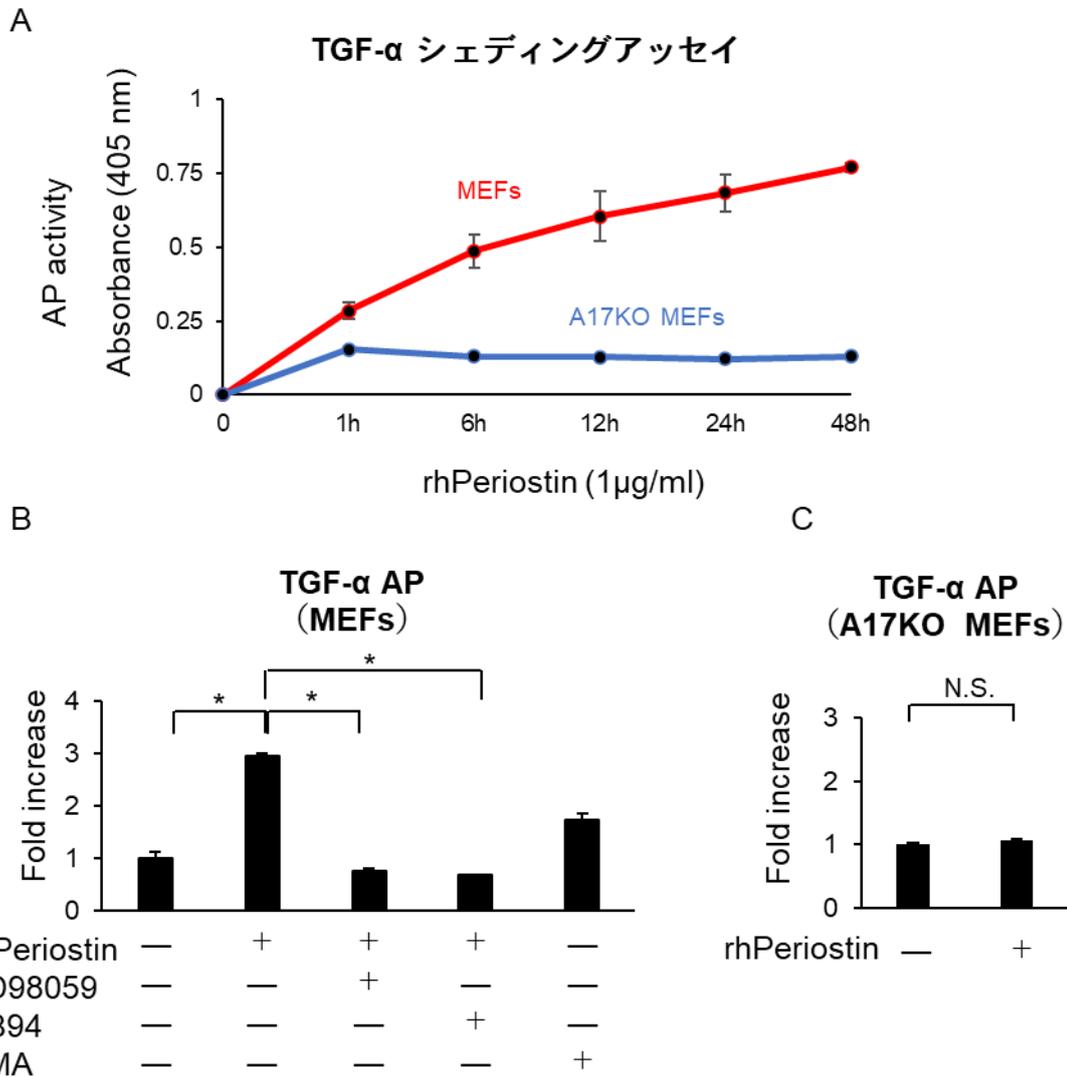


図 14 MEFs における rhPeriostin を用いたシェディングアッセイ (TGF- α)

TGF- α を遺伝子導入した MEFs に rhPeriostin を添加したところ、経時的に TGF- α の AP 活性量が増加し (A)、それらは ERK 阻害剤 (PD98059)および MMP/ADAM 阻害剤 (BB94)の投与により有意に抑制された (B)。ADAM17 をノックアウトマウス由来の MEFs では、rhPeriostin 投与により TGF- α の AP 活性量に変化を認めなかった (C)。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行し、同様の結果を得た。

MEFs; mouse embryonic fibroblasts, AP; alkaline phosphatase, PMA; phorbol 12-myristate 13-acetate, A17KO; ADAM17 knock out * P < 0.01

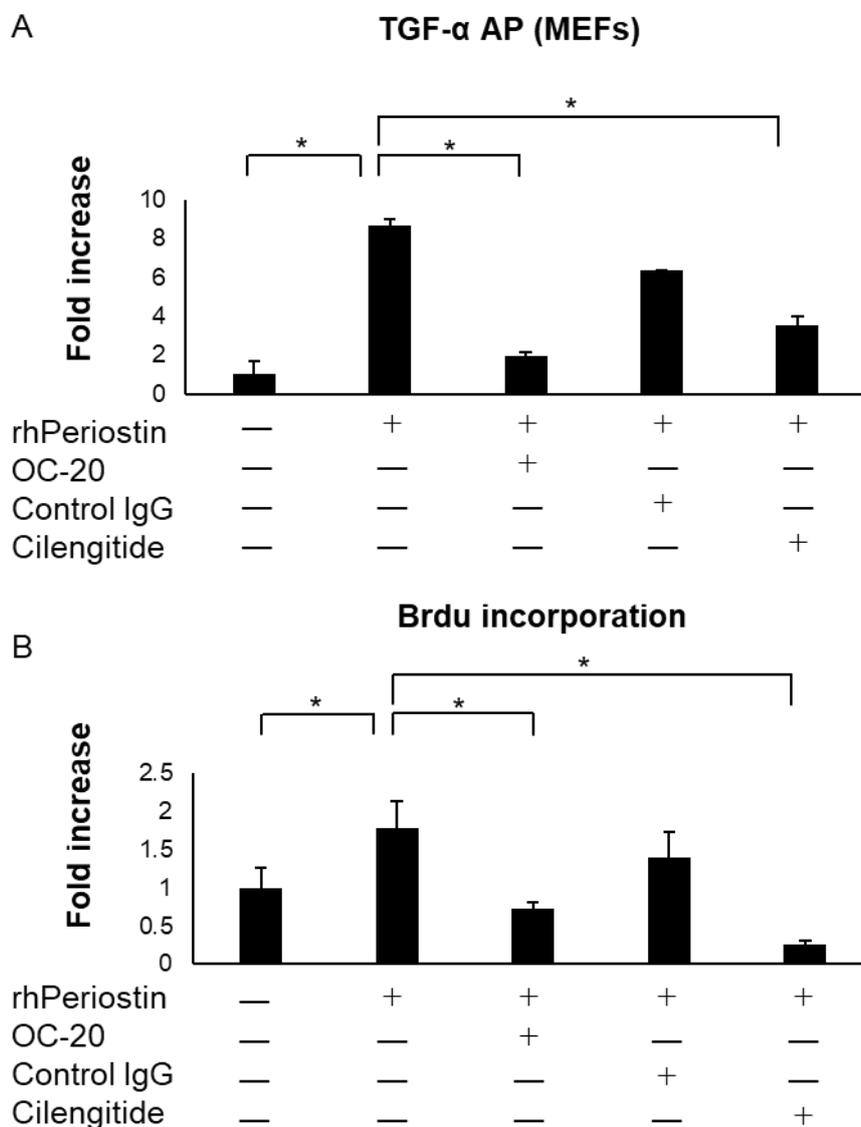


図 15 Periostin 受容体阻害抗体 (OC-20)、Integrin 阻害剤 (Cilengitide)を用いた ADAM17 活性化や増殖能抑制に関する検討

Periostin 受容体阻害抗体 (OC-20)、Integrin 阻害剤 (Cilengitide)の投与により rhPeriostin で促進された MEFs の ADAM17 の活性化は有意に抑制された(A)。

Periostin 受容体阻害抗体 (OC-20)、Integrin 阻害剤 (Cilengitide)の投与により rhPeriostin で促進された TE-8 の増殖能は有意に抑制された(B)。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行し、同様の結果を得た。

MEFs; mouse embryonic fibroblasts, AP; alkaline phosphatase * <0.01

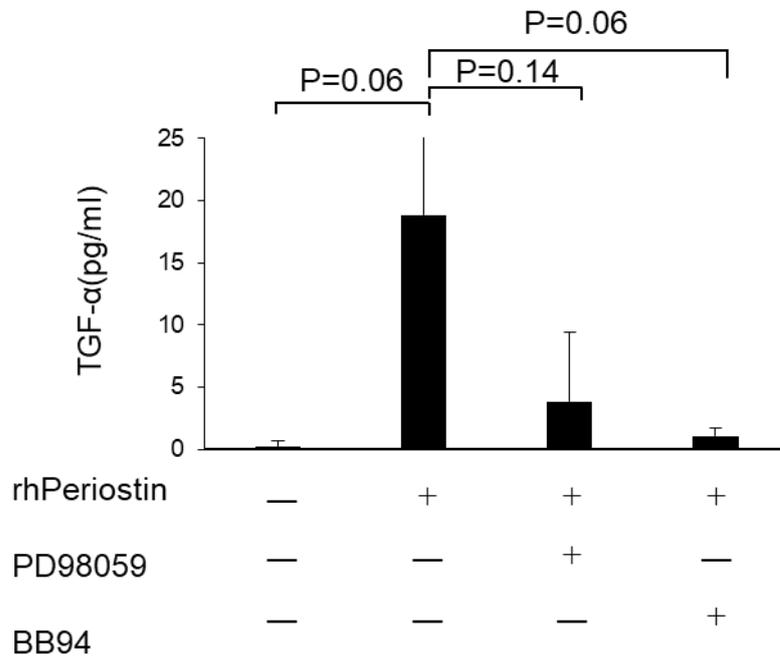


図 16 rhPeriostin 投与による TE-8 培養上清中の TGF- α タンパク量の変化

rhPeriostin 投与により TE-8 培養上清中の TGF- α タンパク量は増加する傾向を認めた。また、ERK 阻害剤 (PD98059)や MMP/ADAM 阻害剤 (BB94)の投与により、TGF- α タンパク量は抑制される傾向を認めた。各実験は独立して繰り返し 4 回以上施行し、同様の結果を得た。

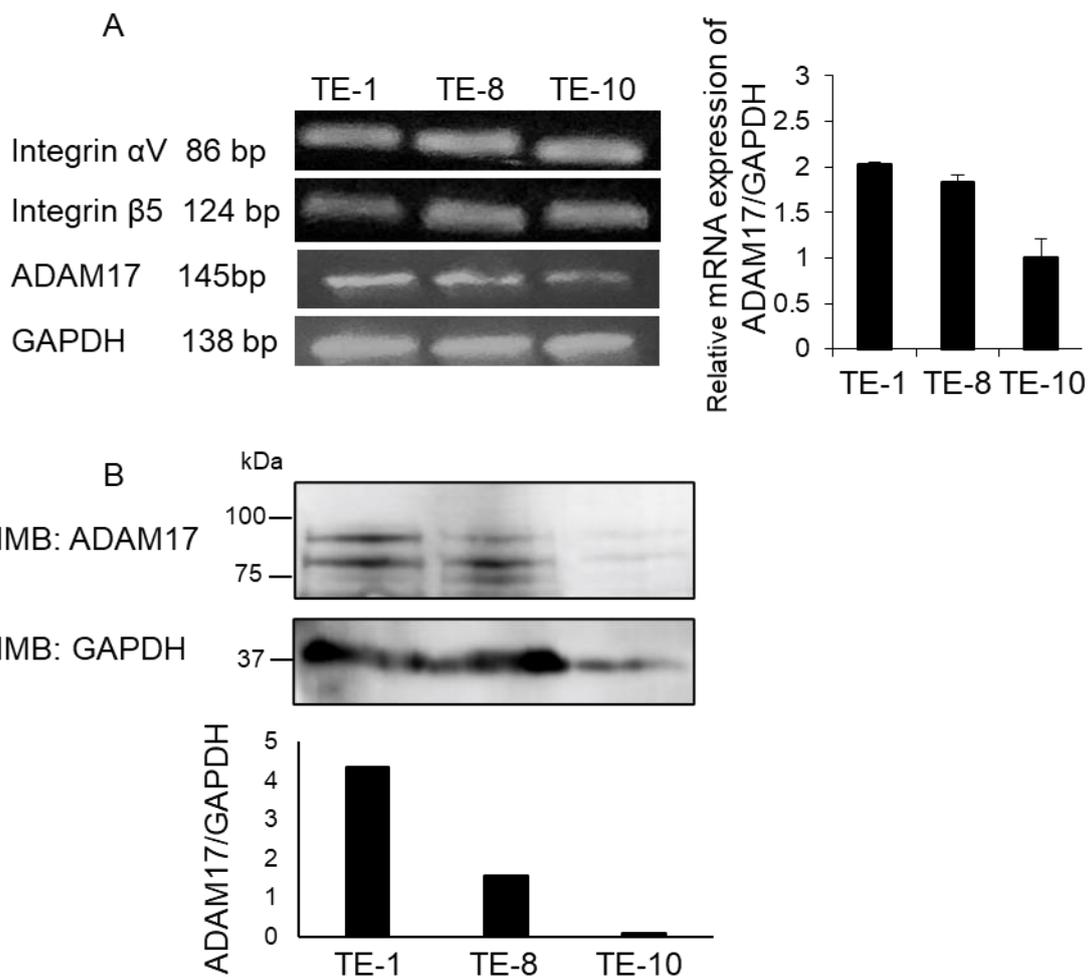


図 17 食道扁平上皮癌細胞株 (TE-1、TE-8、TE-10)における Integrin、および ADAM17 の発現

TE-10 では TE-1、TE-8 と比較して、Integrin α V、Integrin β 5 の mRNA の発現には差はみられなかったが(A)、ADAM17 mRNA および ADAM17 タンパクの発現が弱かった(B)。

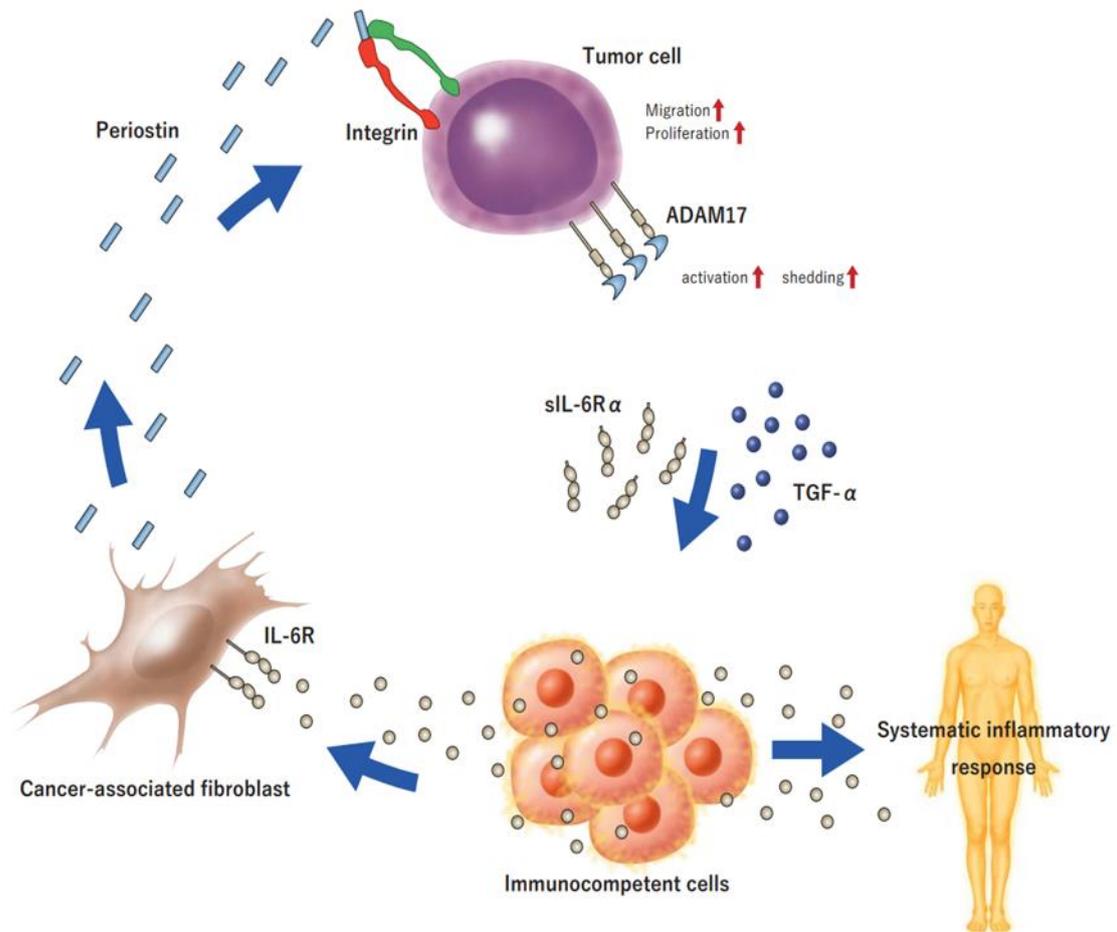


図 18 本検討結果からの仮説

CAFs から分泌された Periostin は癌細胞の Integrin $\alpha\text{V}\beta 3$ 、 $\alpha\text{V}\beta 5$ に結合し、腫瘍細胞の増殖・遊走を促進する。また細胞内 ERK1/2 のリン酸化を促進して ADAM17 を活性化し、TGF- α 、sIL-6R α などの mediator を放出し、産生促進された IL-6 が CAFs 上の IL-6R に結合して、さらなる Periostin の産生を促進させるという positive feedback loop が、食道扁平上皮癌の遊走、増殖に関わる可能性が示唆された。

表 1.Periostin 発現と臨床病理学的因子との関連性

因子	カテゴリー	症例数 (%)	Periostin		P 値
			陰性	陽性	
性別	女性	25(15)	9(17)	16(14)	0.640
	男性	146(85)	45(83)	101(86)	
年齢	< 65	40(23)	12(22)	28(24)	0.850
	≥ 65	131(77)	42(78)	89(76)	
深達度	T1	58(34)	36(67)	22(19)	<0.0001
	T2	22(13)	4(7)	18(15)	
	T3	78(46)	13(24)	65(56)	
	T4	13(7)	1(2)	12(10)	
リンパ節転移	N0	70(41)	29(54)	41(35)	0.050
	N1	45(26)	14(26)	31(27)	
	N2	34(20)	5(9)	29(25)	
	N3	22(13)	6(11)	16(14)	
ステージ	I	44(26)	28(52)	16(13)	<0.0001
	II	37(22)	8(15)	29(25)	
	III	72(42)	14(26)	58(50)	
	IV	18(11)	4(7)	14(12)	
腫瘍分化度	高分化型	14(8)	7(13)	7(6)	0.080
	中分化型	141(82)	45(83)	96(82)	
	低分化型	16(10)	2(4)	14(12)	
術式 (胸部)	開胸手術	47(27)	7(13)	40(34)	0.003
	胸腔鏡手術	124(73)	47(87)	77(66)	
術前化学療法	有	94(55)	24(44)	70(60)	0.070
	無	77(45)	30(56)	47(40)	

表 2. OS に関する単変量および多変量解析

	単変量解析 HR (95% CI)	P 値	多変量解析 HR (95% CI)	P 値
性別		0.0191		0.0321
女性	Ref.		Ref.	
男性	2.415 (1.14-6.24)		2.303 (1.07-6.02)	
年齢		0.2228		
< 65	Ref.			
≥ 65	1.403 (0.82-2.56)			
壁深達度		<0.0001		0.0175
T1-T2	Ref.		Ref.	
T3-T4	3.249 (2.00-5.49)		1.957 (1.12-3.53)	
リンパ節転移		0.0396		0.4964
N0-N1	Ref.		Ref.	
N2-N3	1.640 (1.02-2.59)		1.189 (0.72-1.95)	
腫瘍分化度		0.0450		0.1965
高/中分化型	Ref.		Ref.	
低分化型	2.042 (1.02-3.72)		1.595 (0.77-3.03)	
Periostin		<0.0001		0.0363
陰性	Ref.		Ref.	
陽性	3.375 (1.89-6.58)		1.962 (1.04-3.99)	
NLR		0.0166		0.1999
< 3.84	Ref.		Ref.	
≥ 3.84	1.821 (1.12-2.89)		1.388 (0.84-2.26)	
PLR		0.0933		
< 170	Ref.			
≥ 170	1.465 (0.94-2.30)			
CAR		<0.0001		0.0427
< 0.088	Ref.		Ref.	
≥ 0.088	2.653 (1.69-4.23)		1.663 (1.02-2.76)	

