

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18422

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いた腫瘍関連マクロファージ誘導モデルマウスの樹立と治療薬の探索

研究課題名(英文) Establishment of humanized mouse model of tumor associated macrophage and application for evaluation of anti-tumor drug

研究代表者

刈谷 龍昇(Kariya, Ryusho)

熊本大学・エイズ学研究センター・特任助教

研究者番号：40757663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍関連マクロファージ:TAMのモデルマウスの作製を試みた。免疫系ヒト化マウスに移植したヒト腫瘍組織内に浸潤したヒトマクロファージは極めて微量であった。そこで他の腫瘍微小環境構成細胞である線維芽細胞に着目した。ヒト線維芽細胞株を胆管がん細胞株の培養上清で培養すると、腫瘍増殖に重要なIL-6、MCP-1の産生が誘導され、これらサイトカインの産生はステロイドやp38、HSP90阻害剤により抑制されることが明らかとなった。ヒト線維芽細胞とヒト胆管がん細胞をマウスに共移植すると、腫瘍単独移植に比べ腫瘍の増殖が激しいことを明らかにしたが、この増殖促進効果はp38阻害剤で抑制することが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish the mouse model of Tumor associated macrophage (TAM). We injected human tumor cell line into humanized mouse, but human macrophage was not penetrated to human tumor tissue. Therefore we focused on fibroblast which is other component of tumor microenvironment. Production of IL-6 and MCP-1 which are important for tumor cell proliferation and macrophage migration were upregulated when fibroblast was cultured by supernatant of tumor cell line. And these cytokine production by fibroblast were suppressed by treatment of steroid, p38 inhibitor and HSP90 inhibitor. Tumor cell proliferation in vivo was promoted by co-injection of fibroblast and tumor cells. But this phenomenon was not inhibited by p38 inhibitor treatment.

研究分野：実験動物学

キーワード：腫瘍関連マクロファージ がん関連線維芽細胞 ヒト化マウス モデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織はがん細胞に加えて炎症細胞や線維芽細胞、細胞外基質などの間質組織から構成され、これらは腫瘍微小環境を構築している。これらの間質細胞は増殖因子やサイトカイン、血管新生因子を産生し、がん細胞の浸潤、悪性化、転移の誘導に重要な役割を果たしている。近年、がん細胞だけでなく、腫瘍微小環境を標的とした治療法が次々と開発されつつある。最近臨床で使われるようになった血管新生阻害剤や骨転移阻害剤などは、いずれも腫瘍微小環境を標的とした薬剤である。がん細胞は遺伝的異常の頻度が高く、薬剤耐性を獲得しやすいことが知られている。一方、腫瘍微小環境を標的とした場合には治療抵抗性を生じにくく、がん細胞を標的とした抗がん剤と併用することによって更なる効果が期待される。

マクロファージは、腫瘍微小環境形成に重要な役割を果たしており、ヒト臨床検体において、多数のマクロファージががん細胞周囲に存在していることが明らかとなっている。腫瘍組織に浸潤したマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage: TAM) へと形質変化し、腫瘍の増殖をサポートすることが知られている。マクロファージの TAM への分化には、腫瘍が作り出す、低酸素などのがん微小環境が重要であり、*in vivo*での解析が必要である。しかし TAM の研究は *in vitro*での実験や臨床検体、マウス由来マクロファージを用いた研究が多く、*in vivo*でヒト由来マクロファージを TAM へと分化させた報告は少ない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト化マウスを用いて TAM 誘導マウスモデルを樹立し、TAM の誘導機序の解明と、TAM を標的とした新規治療法の確立に供することである。通常マクロファージは腫瘍化細胞を貪食し、腫瘍を退縮させる働きがある。しかし多くの固形がんにおいて腫瘍に浸潤したマクロファージは TAM へと形質を変化させ、腫瘍の増殖をサポートする。これまでヒト由来マクロファージの TAM への分化を *in vivo*で再現した報告は少なく、TAM の分化機序には不明な点が多かった。本研究はヒト由来マクロファージの TAM 誘導マウスモデルを樹立し、TAM を制御することによる新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) TAM モデルマウスの樹立

新規高度免疫不全マウス (Nude GFP-Rag2/Jak3 欠損マウス) に臍帯血由来造血幹細胞を移植することでマウス体内にヒト免疫細胞が流れる免疫系ヒト化マウスを作製した。この免疫系ヒト化マウスにヒト胆管がん細胞株を移植し、生着した腫瘍組織中に浸潤するヒトマクロファージをフローサイトメトリー法と免疫組織染色にて確認し

た。

#### (2) *in vitro*におけるがん関連線維芽細胞の誘導

ヒト線維芽細胞 (Fibroblast:FB) 株 OUMS を様々なヒト胆管がん細胞株の培養上清中で 48 時間培養し、OUMS が産生する炎症性サイトカインの量をフローサイトメトリーにて検討した。また、上記で上昇したサイトカインのうち IL-6 に関しては ELISA を用いて 6 時間ごとに定量試験を行った。

#### (3) 線維芽細胞のがん細胞への浸潤能評価

トランスウェルの上層に OUMS、下層にヒト胆管がん細胞株 M213 を播種、もしくは培養液のみを満たしておき、24 時間後に上層から下層へ遊走してくる OUMS 細胞の数を定量した。また遊走してきた OUMS 細胞を培養し上清を回収、ゼラチンゼイモグラフィにて MMP-2,9 の活性を検討した。

#### (4) 阻害剤スクリーニング

低分子阻害剤ライブラリーを含む胆管がん細胞株培養上清中で OUMS 細胞株を培養し、培養上清に対し、IL-6 の ELISA を行うことで、がん関連線維芽細胞誘導阻害剤のスクリーニングを行った。効果のあった阻害剤に関しては、IL-6 以外の炎症性サイトカイン MCP-1、についても ELISA を行った。

#### (5) がん関連線維芽細胞の *in vivo*における腫瘍増殖に与える影響の検討

ヒト胆管がん細胞株 M213 を単独、もしくは赤色蛍光色素 mCherry でラベルしたヒト線維芽細胞株と一緒に高度免疫不全マウス Balb/c Rag2/Jak3 欠損マウスの皮下に移植し、2 週間後にマウスを解剖し、腫瘍の大きさを比較検討した。また、摘出した腫瘍組織に対し免疫組織染色を行い、mCherry 陽性細胞の有無を検出することで、腫瘍組織内にヒト線維芽細胞が残存し、腫瘍の増殖をサポートしているか検討を行った。同様の実験を免疫系ヒト化マウスに対しても行い、ヒト線維芽細胞を共移植した場合、ヒトマクロファージが腫瘍組織内に浸潤するか検討を行った。

#### (6) p38 阻害剤、IL-6 阻害剤の *in vivo*における抗腫瘍効果の検討

ヒト胆管がん細胞株 M213 を単独、もしくはヒト線維芽細胞株と一緒に高度免疫不全マウスに移植し、p38 阻害剤もしくは抗 IL-6 抗体を投与した。腫瘍細胞移植後 2 週間でマウスを解剖し、腫瘍の大きさを検討することで、p38 阻害剤、抗 IL-6 抗体のがん関連線維芽細胞に与える影響を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) TAM モデルマウスの樹立

免疫系ヒト化マウスにヒト胆管がん細胞株 (M213) を移植して作製した担癌マウスの腫瘍組織内にヒトマクロファージが浸潤するかフローサイトメトリーや免疫組織染色にて検討したが、浸潤したヒトマクロファージは極めて微量であり、大部分はマウス由来マクロファージとマウス由来線維芽細胞で

占められていた。特に線維芽細胞の浸潤が多かったため、今後の実験はマクロファージ以外の腫瘍微小環境構成細胞である線維芽細胞に着目した。

(2) *in vitro*におけるがん関連線維芽細胞の誘導

ヒト線維芽細胞株 OUMS を様々な胆管がん細胞株の培養上清で培養したところ、胆管がんやマクロファージの増殖に重要な IL-6 に加え、マクロファージの浸潤増殖に重要な MCP-1 の産生が強力に誘導された(図1)。このことから、がん細胞は線維芽細胞を IL-6 や MCP-1 を産生するがん関連線維芽細胞へと形質変化させ、がん細胞によって誘導されたがん関連線維芽細胞は IL-6, MCP-1 を産生し、腫瘍組織内にマクロファージを誘導し、誘導されたマクロファージが TAM へと形質を変化させ、腫瘍の増殖に寄与している可能性が考えられる。したがって、線維芽細胞のがん関連線維芽細胞への分化を抑制することで、結果的に TAM をも抑制し、腫瘍の増殖を抑制することが可能であると考えられる。また、がん細胞培養上清で培養することで特に顕著に上昇の見られた IL-6 に関しては6時間ごとに培養上清を回収し、ELISAにてIL-6の産生量を定量した。IL-6のELISAの結果より、胆管がん培養上清で培養後、わずか6時間でIL-6の産生が増強されることが明らかとなった。

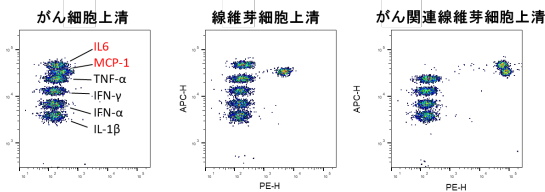


図1 がん関連線維芽細胞の誘導

(3) 線維芽細胞のがん細胞への浸潤能評価

トランスウェルを用いた線維芽細胞の浸潤能を検討したところ、線維芽細胞はMMPを活性化することにより腫瘍細胞に浸潤することが明らかとなった(図2)。したがって、腫瘍細胞は自身のもとへ線維芽細胞を遊走させ、遊走してきた線維芽細胞をがん関連線維芽細胞に形質変化させることで、自身の増殖に有利な環境を形成している可能性が示唆された。

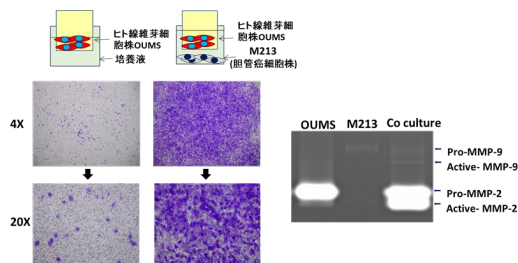


図2 線維芽細胞のがん細胞への浸潤

(4) 阻害剤スクリーニング

低分子阻害剤ライブラリーを用いた阻害剤スクリーニングより、胆管がん培養上清により産生誘導されるヒト線維芽細胞が産生するサイトカイン(IL6, MCP-1)はステロイドや p38 阻害剤、HSP90 阻害剤により顕著に抑制され、特に p38 阻害剤の効果は強力であることが明らかとなった。この結果より、ステロイドや p38 阻害剤、HSP90 阻害剤はがん関連線維芽細胞をターゲットとした抗腫瘍薬のシーズとなりうる可能性が示唆された。

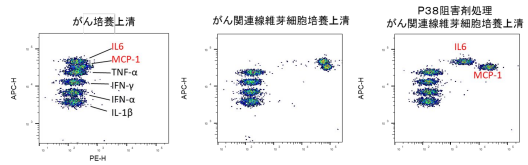


図3 p38阻害剤のがん関連線維芽細胞誘導に与える影響の評価

(5) がん関連線維芽細胞の *in vivo*における腫瘍増殖に与える影響の検討

免疫系ヒト化マウスの皮下に OUMS とヒト胆管がん細胞株 M213 を共移植したところ、M213 単独移植したものに比べ、腫瘍の増殖は激しかった(図4)が、ヒト化していない高度免疫不全マウスでも同様の現象がみられたことから、線維芽細胞はマクロファージ非依存的に腫瘍の増殖をサポートしていることが示唆された。また免疫系ヒト化マウスに線維芽細胞と M213 細胞を移植してもヒトマクロファージの浸潤は確認できなかった。また、生着し増殖した胆管がん腫瘍組織内に共移植したヒト線維芽細胞が残存しているか、免疫組織染色にて確認したところ、増大した腫瘍組織内にヒト線維芽細胞は残存していなかった。しかしながら、ヒト線維芽細胞を共移植することで *in vivo*における腫瘍の増大が増強されたことから、本モデルではヒト線維芽細胞は腫瘍生着の極めて初期に腫瘍の増殖、生着をサポートしている可能性が示唆された。

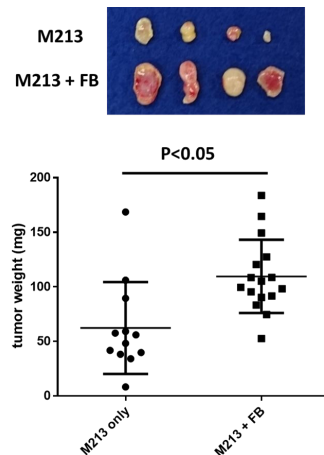


図4 がん関連線維芽細胞の腫瘍増殖に与える影響

(6) p38 阻害剤、IL-6 阻害剤の *in vivo* における抗腫瘍効果の検討

線維芽細胞による腫瘍増殖促進効果は抗 IL-6 抗体で抑制されたが、p38 阻害剤では抑制することが出来なかった。本研究では p38 阻害剤は効果を示さなかったため、投与量等の検討を進め、再度効果を検討していく。また、今後はステロイドや HSP90 阻害剤との相乗効果も検討していく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

日本サイトメトリー学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

刈谷 龍昇 (KARIYA, RYUSHO)

熊本大学・エイズ学研究センター・特任助教

研究者番号：40757663

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )