

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08093

研究課題名(和文) 難治性犬移行上皮癌に対するNSAIDs治療における腫瘍随伴マクロファージの関連性

研究課題名(英文) Association of paraneoplastic macrophages in the treatment of NSAIDs for refractory canine transitional cell carcinoma

研究代表者

星野 有希 (Hoshino, Yuki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：80523323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：犬のPBMCよりM様細胞に誘導する複数の方法を実施し、M様細胞に対して評価を行った。PBMCから誘導したM様細胞はいずれも形態的、機能的、および遺伝的にM様であると思われた。FBS無添加培地に誘導因子を用いる方法が最も効率よくM様を採取できると思われた。これらのM様の網羅的遺伝子解析としてRNA-seqを実施し、発現遺伝子を比較した。得られたM様を犬の膀胱移行上皮癌細胞と共培養したところ、抗腫瘍作用が増強する可能性が考えられた。本研究によりFBS無添加培地で誘導したM様細胞は、今後の実験に十分使用可能であり、犬の腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬のマクロファージを効率よく分離・培養する方法を開発し、得られたマクロファージの正常解析を実施した。これらのマクロファージの発現遺伝子はマウス・ラット・ヒトと異なる部分が多く認められた。また、マクロファージには間接的な抗腫瘍効果があることが予想された。腫瘍微小環境における犬のマクロファージの役割が少しずつ判明してきている。

研究成果の概要(英文)：Some methods for inducing M-like cells from canine PBMC were performed, and M-like cells were evaluated. All M-like cells derived from PBMC appeared to be morphologically, functionally, and genetically M-like. It seems that the method using an inducer in the FBS-free medium can collect M-like cells most efficiently. RNA-seq was performed as a comprehensive gene analysis of these M-like cells, and the expressed genes were compared. When the obtained M-like cells were co-cultured with canine transitional cell carcinoma cells, it was considered that the antitumor effect might be enhanced. This study suggests that M-like cells induced in FBS-free medium can be sufficiently used for future experiments and may enhance the antitumor effect on canine tumors.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：犬マクロファージ RNA-seq M2型抑制

1. 研究開始当初の背景

生体内での移行上皮癌に対する NSAIDs の抗腫瘍効果の発現には、腫瘍細胞に対する直接作用だけではなく、腫瘍細胞周囲に存在するマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞といった癌間質への間接作用が関わっているのではないかと考えられた。しかし犬のマクロファージの効率的な誘導法はまだ確立されておらず、またその性状もヒトやマウスと異なる可能性が報告されている。

ヒトでは M2 型マクロファージが PGE2 の産生を促進することがすでに知られているため、犬においても NSAIDs の抗腫瘍効果にはマクロファージが重要なのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

犬のマクロファージの効率の良い誘導法を確立しその性状解析を実施すること、および犬の膀胱移行上皮癌における NSAIDs の抗腫瘍効果を移行上皮癌細胞の浸潤におけるマクロファージとの相互作用の点に着目して解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1). 犬のマクロファージ(M)の誘導法の比較として犬の PBMC より以下の 2 つの方法で M の誘導を実施した。

MACS による抗 CD14 抗体陽性細胞分離から RPMI1640 培地 + 犬血清を用いる培養法

FBS 無添加 M 基礎培地を用いて PBMC を培養し、2%犬血清添加(M0)、LPS+IFN 添加(M1)、IL-4+I-13 添加(M2)により 3 種類の M 様細胞に誘導する方法

(2). M 様細胞の細胞数計測、発現遺伝子の解析、形態観察、および貪食能の評価を実施した。

(3). M の網羅的遺伝子解析として RNA-seq を実施し、M0M1M2 様細胞の発現遺伝子を比較した。

(4). M を犬の膀胱移行上皮癌細胞と共培養し、培養上清中の PGE2 濃度および発現遺伝子を比較した。

(5). M と膀胱移行上皮癌細胞を共培養、NSAIDs 添加、M2 型を抑制、M1 型を誘導後細胞障害試験を実施した。

4. 研究成果

(1). 犬の M の誘導法

FBS 無添加培地に誘導因子を用いる方法が最も効率よく M を採取可能であった。

(2). M 様細胞の細胞数計測、発現遺伝子の解析、形態観察、および貪食能の評価

健康なビーグル犬の末梢血 20 mL から比重遠心法によって得られた PBMC の平均数 ($\times 10^6$) \pm SE は、 27 ± 2.5 個 ($n=16$) であった。また本培養法によって末梢血 20 mL から得られた M0, M1, M2 の平均数 ($\times 10^6$) \pm SE は、それぞれ 8.8 ± 1.8 個 ($n=6$)、 4.0 ± 1.1 個 ($n=6$)、 5.7 ± 0.5 個 ($n=2$) であった。M0 および M1, M1 および M2 間の細胞数には有意差があった ($p < 0.01$)。

培地中の細胞を光学顕微鏡で観察したところ、M0 では大きく扁平、M1 では小さく円形、M2 では大きく扁平または紡錘状の特徴を示す細胞を多く確認した。継代を続けたところ、M0 は継代ごとに徐々に細胞生存率が低下し、最大 7 回の継代が可能であった。M1 と M2 は 1 回の継代で細胞生存率が大幅に低下し、2 回以上の継代は困難であった。また、すべての M は -80 での凍結保存が可能で、融解後は生細胞数の減少がみられたもののシャーレ底への付着を確認した。一次抗体に抗 Iba1 抗体を用いた蛍光免疫染色では、すべての M において核は青色、細胞質は緑色を呈し、細胞形態は光学顕微鏡での観察による結果と同様であった。M1 においてはすべての細胞の細胞質が染色されたわけではなく、核のみが確認できた細胞も存在した。

蛍光ビーズを添加した培地で培養した M を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞の核は青色、ビーズは緑色を呈した (図 2)。明視野画像と合わせることで、ビーズが M0, M1, M2 の細胞質内に存在していることを確認した。フローサイトメリーにより、細胞内における緑色蛍光物質の蓄積を認めた。得られたサイトグラムの細胞集団をゲーティングしてヒストグラムと照合したところ、M0 では大きく内部構造が複雑な細胞集団で、M1 では小さく内部構造が複雑でない細胞集団で、M2 では大きく内部構造が複雑な細胞集団と小さく内部構造が複雑でない細胞集団の両方で貪食を確認した。貪食率 (%) の平均値は $M2 < M0 < M1$ で、M2 と比較して M1 の貪食率は有意に高かった (図 4)。

膀胱移行上皮癌細胞と共培養した M を観察したところ、M および腫瘍細胞の核は青色、M の細胞質は緑色、腫瘍細胞の細胞質は赤色を呈した。すべての M について、腫瘍細胞と混在している細胞集団を確認した。

(3). M の網羅的遺伝子解析

M0 に特に多く発現していた上位 5 遺伝子は、*CCDC80*、*OLR1*、*SLC2A5*、*RXFP1*、*MAPK13* であった。*CCDC80* は、ヒトで腫瘍増殖抑制因子として報告されている Delta-opioid receptor (DRO1) をコードする。*OLR1* は M のアポトーシス誘導によりアテローム形成に関与するレクチン型酸化 LDL 受容体をコードする。*SLC2A5* は腸管腔におけるグルコース輸送を担うことで知られる GLUT 5 をコードするが、ヒトの単核細胞ではミクログリアに特異的に発現し末梢器官の M ではめったに発現しない。犬の単核細胞における GLUT 5 についての報告はまだないが、M0 で多く発現していることから、犬では脳と末梢

器官の M₁ における GLUT 5 発現分布がヒトとは異なる可能性がある。RXFP1 は Relaxin / insulin-like peptide family receptor 1 (RXFP1) をコードし、RXFP1 ノックアウトマウスにおいて単球走化性タンパク質 (monocyte chemoattractant protein 1; MCP1) レベルの増加をはじめとする炎症作用が誘発されたという報告がある。MAPK13 は p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK) の一つであり、炎症性サイトカインや LPS の刺激を受けると炎症反応に関わる様々な因子を調節する。

M1 に特に多く発現していた上位 5 遺伝子は、*IL1B*, ENSCAFG00000015206, *SAA1*, *IFNG*, *ALDH1A1* であった。*IFNG* がコードする IFN- γ は M1M₁ に分極化させる因子の一つであり、活性化した M1 は *IL1B* がコードする IL-1 β のような炎症性サイトカインを産生する。SAA1 がコードする循環血清アミロイド A1 (serum amyloid A1; SAA1) は、ヒトにおいて M1 で特異的に発現する。*ALDH1A1* がコードするレチナルデヒドロゲナーゼ 1 (retinal dehydrogenases 1; RALDH1) はマウスでは M1 での発現が多いが、ヒトでは M2 での発現が報告されている。

M2 に特に多く発現していた上位 5 遺伝子は、*PLA2G5*, ENSCAFG00000024191, *CA4*, *CLEC4G*, *EDNRB* であった。*PLA2G5* がコードする分泌性ホスホリパーゼ A2 (phospholipase A2 group 2; PLA2G5) は脂肪組織において M2 誘導および慢性炎症抑制作用を示す。*CA4* がコードする炭酸脱水素酵素 4 (carbonic anhydrase 4; CA4) は、二酸化炭素の可逆的水和を触媒する膜結合型酵素の一つであり、その正確な機能は不明である。*CLEC4G* がコードする C 型レクチン受容体の一つである LSECtin は、マウスの大腸において M₂ の貪食能に作用して、アポトーシス細胞のクリアランス促進および組織修復に関与する。*EDNRB* がコードするエンドセリン受容体 B (endothelin receptor B; EDNRB) は M₂ での発現は報告されていないが、アトピーモデルマウスのグリア細胞では低親和性 Fc γ 受容体 および IFN- γ 受容体をコードする遺伝子とともに発現レベルが上昇したという報告がある。

その他、2 つのタイプの M₁ 間での遺伝子発現量の違いを比較した。M0 と比較して M1 では、好中球や炎症細胞の集簇に関与する *IL17F* と *LUM* は上方制御されたが、マウスの貪食能をもつ M₁ での発現が報告されている *C1QB* と *MRC1* や細胞接着および遊走プロセスに関与するフィブロネクチンをコードする *FN1* など、多くの遺伝子発現が下方制御された。M0 と比較して M2 では、Th2 細胞や好塩基球、好酸球の活性化に関与する *IL-33*, M2 マーカー遺伝子として報告のあった *CD206* をコードする *MRC1*, 神経細胞の接着と移動に関与する *L1CAM*, 細胞接着や遊走、血管新生および組織形成に関与する *VCAN* が上方制御され、腫瘍転移抑制に関与する *ITIH5* や骨髄由来 M₂ で多く発現する *C1QB* が下方制御された。M1 および M2 間では、M0 と比較した場合よりも多くの遺伝子発現量の差があり、それぞれ 3 群で比較した場合に特に発現している遺伝子が上方制御されていた。

(4). M₁ と膀胱移行上皮癌細胞の共培養後 PGE₂ 濃度測定。

単培養条件で培養した M₁ では、M0 および M2 と比較して M1 で有意に PGE₂ 産生量が高値であった。これは COX-2 をコードする *PTGS2* 遺伝子の発現レベルは M0 で低く M1 では M0 および M2 と比較して 5 倍以上であることと相関していると思われた。

腫瘍培養上清添加条件では M0 と M2 における PGE₂ 産生が上昇し、M1 においては減少した。腫瘍培養上清による刺激を受けた M₁ は M2 様または TAM 様に変化したと考えられた。

(5). M₁ と膀胱移行上皮癌細胞の共培養後細胞障害試験。

M₁ と膀胱移行上皮癌細胞を共培養し、M2 型 M₁ を抑制する corosolic acid、M1 型 M₁ を誘導する E7046 の細胞障害試験を実施したところ、E7046 には明確な変化は認めなかったが、corosolic acid 添加の膀胱移行上皮癌細胞に対する細胞障害作用は増強した。従って M2 型を抑制することにより犬 M₁ の抗腫瘍作用が増強する可能性が考えられた。また、NSAIDs 添加により移行上皮癌細胞の細胞障害作用には明確な変化は認められなかったが、M₁ の形態が変化した。この変化を検出することが今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安齋莉穂 星野有希
2. 発表標題 無血清培地を用いた犬マクロファージの誘導法とその性状解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------