

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590416

研究課題名（和文）

再生医学的視点による腫瘍内マクロファージの樹状細胞への再分化法の確立

研究課題名（英文）

Establishment of method to re-educate macrophage differentiation towards dendritic cells on the view of regeneration medicine.

研究代表者

齊尾 征直 (SAIO MASANA0)

国立大学法人琉球大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40242721

研究成果の概要（和文）：

Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)単独でF4/80陽性腫瘍内マクロファージ(TIM)を処理してもマクロファージの性質は変化しなかったが、GM-CSF に加えてM-CSF受容体(M-SCF-R)に対する siRNAで抑制しながらTIMを処理すると細胞内のシグナルタンパクの一部の変化がみられ、樹状細胞の時にみられるタンパクの発現がみられた。以上より、TIMを単球由来樹状細胞様の形質に再教育できることが示され、マクロファージの可塑性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) treatment alone could not alter expression level of macrophage differentiation. On the other hands, when the TIM was treated with GM-CSF and siRNA for macrophage colony stimulating factor (M-CSF) receptor (M-CSFR) altered the expression of signal pathway proteins towards dendritic cell like feature. Above findings indicated we successfully re-educated (re-differentiated) TIM towards monocyte-derived dendritic cells like population and we showed the macrophage plasticity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍内マクロファージ・マウス

1. 研究開始当初の背景

現時点では抗腫瘍免疫治療だけではがん患者が完治しないことが多いのは事実だが、2008年のNature Medicineでは、「癌間質のみを精製して解析すると、癌免疫の指標

の一つである Th1 サイトカインの量とがん患者の予後が相関する」と報告され、癌間質が抗腫瘍性であることが生命予後改善に重要と示されている。また、2008年10月の国際樹状細胞シンポジウム（神戸）で

は、末期の肝癌で治療をあきらめた患者が自然治癒したり、樹状細胞治療に反応して、悪性黒色腫が完治するなどの例が報告された。これは患者の免疫機構には、がんを完治させる潜在能力があるという証である。では、なぜ完治しない場合があるのかというと、癌に対する免疫応答を負に制御している制御性T細胞や腫瘍内マクロファージなどの存在が浮上する。中でも腫瘍内マクロファージが患者の予後と負に相関することが多いという事実は 2006 年の米国癌学会誌に海外の研究室から総説としてまとめられ、国内では熊本大学の竹屋教授らのグループが本年英国病理学会誌に、CD163 や CD204 陽性マクロファージ数と脳の悪性膠芽腫の予後との負の相関を報告し、如何にしてマクロファージの機能を止めるかは近年注目を集めている。

2. 研究の目的

教科書的に血中の単球から分化する細胞には、大きくマクロファージと樹状細胞があるが、腫瘍内ではマクロファージが優位である。そしてその理由は、**腫瘍細胞からマクロファージへの分化促進因子が出ているから**である。そこで本申請では以下を明らかにすることを目的とする。免疫治療によって、腫瘍内マクロファージの成熟分化は抑制されるのみならず、細胞自体の性格が樹状細胞様に改変される可能性があり、マクロファージには可塑性があるため、実験的に腫瘍内浸潤マクロファージが樹状細胞へと再誘導できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

腫瘍組織内の細胞を F4/80 というマクロファージのマーカー分子によって、マクロファージとそれ以外の細胞に分け、マクロファージと樹状細胞の分化に関わる分泌蛋白・膜蛋白や細胞内情報伝達に関わる因子を網羅的に解析する。それにより、マクロファージ自身と周囲の組織における①マクロファージへの分化促進系と、②樹状細胞への分化抑制系を明らかにする。腫瘍内のマクロファージを対象にして、マクロファージへの分化促進因子や樹状細胞への分化抑制因子を抗体を用いて阻害したり、それらに対する受容体の発現を siRNA で抑制しながら樹状細胞への分化を促進させる GM-CSF, IL-4, Flt-3L など処理して、樹状細胞への再分化法を確立する。

詳細は、以下。

マウス

C57BL/6 と BALB/c の 6-8 週齢のオスを SLC (Wilmington, MA, USA) から購入して使用。細胞

MCA38(マウス大腸癌株)を使用。10%FCS と L-glutamate、penicilin-streptomycin の入った RPMI を培地で、5% CO₂, 37°C で培養した。

細胞の接種

6-8 週齢の C57BL/6 マウスの皮下に、 3×10^6 個の腫瘍細胞を接種した

腫瘍内浸潤細胞の回収

腫瘍を皮下に接種してから 14-21 日後に、マウスを安楽死させ、腫瘍を清潔に回収した。マウスから取り出した腫瘍を細かく裁断し、腫瘍溶解酵素(collagenase Type I (0.05 mg/ml)、collagenase Type IV (0.05 mg/ml)、hyaluronidase (0.025 mg/ml)、DNase I (0.01 mg/ml)、soybean trypsin inhibitor)を加え 37°C で 15 分培養した。

溶解された細胞を集め、低張緩衝液(0.155 M NH₄Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO₃)を用いて赤血球を溶解した。その後、F4/80⁺ の細胞を manufacturer's instructions に従って (MACS, Miltenyi Biotec, Berdish-Gladbach, Germany) 社製のカラムと anti-F4/80 magnetic immunobeads を用いて分離した。

Multiple PCR and real-time PCR analysis Trizol (Invitrogen Life Technologies) を用いて RNA を精製し、Superscript III RT (Invitrogen Life Technologies) を使って、RNA を reverse transcription した。その後、multiple PCR analysis を行った。100 ng の cDNA samples と、positive control DNA を、multiple primer や buffer、Taq polymerase と混ぜた。multiple primer は、Multiplex PCR kits を使用した。使用したキットは、chemokine receptors (CCR Set 1, CCR Set 2), Chemokine Genes set-1, Chemokine Gene set-2, Signaling Receptor Set1, Sepsis Cytokines set-2, Inflammatory Cytokine Genes Set-1, CD antigen Set1 and TH1/TH2 Cytokines Set2, (Maxim Biotech, Inc, South San Francisco, CA)。増幅された DNA は、5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、ethidium bromide で発色して解析した。

Real-time PCR analysis

600 ng の RNA を Superscript III RT を用いて reverse-transcription し、real-time PCR analysis のために、5 μl の cDNA sample にそれぞれ、1 μl ずつ 10 μM の upper と lower primer を加え、3 μl の PCR grade

water (Roche Diagnostics)と、10 μ l の concentrated Syber Green と、Taq enzyme-premixed reaction mixture (SYBR® Premix Ex Taq™, Takara Bio, Seta, Siga, Japan) を混ぜた。この解析に用いた primer pair のシーケンスを Table 1 に示す。PCR のプログラムは、95° C、5分を1サイクル、95° Cで10秒、60° Cで10秒、72° Cで10秒を1サイクルとして45サイクル行い、melting curve analysis process を用いて解析した。使用した機器は Light Cycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)を使用した。

SDS-PAGE and immunoblotting

F4/80⁺ 細胞を PBS で 3 回洗い、lysis solution [50 mM Tris-HCl, pH. 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 5 mM iodoacetamide, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical P-8340)] で 1 時間反応させた。遠心後その上澄みを 10% PAGE gels を用いて電気泳動した。その後、polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に転写した。そのメンブレンを skim milk でブロッキング後、0.002 mg/ml の anti-mouse stat1(clone 42, BD transduction laboratories)、anti-mouse stat3(clone 84, BD transduction laboratories)、anti-mouse stat5(clone 89, BD transduction laboratories)、anti-stat6(rabbit polyclonal, cell signaling) を Can Get Signal™ Immunoreaction Enhancer Solution 1(Toyobo Co, Ltd. Osaka, Japan). で希釈して使用し、1 時間反応させた。洗ったあと、メンブレンを 16 ng/ml の HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (both from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) を Can Get Signal™ Immunoreaction Enhancer Solution 2 で希釈して 1 時間反応させた。その後、ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) で発色させ、the Cool Saver Lumino-capture system (Model AE-6955, ATTO, Tokyo, Japan) で撮影し、CS Analyzer software で解析した。その後、メンブレンの抗体をはがし 0.002 mg/ml の anti-GAPDH (clone 9. B. 88, United States

Biological, Swampscott, MA, USA) と、16 ng/ml の HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) で反応させた。

SiRNA transfection

0.4nmol/ml の siRNA(タカラバイオ)を lipofectoamine2000(Invitrogen)を用いて導入した。導入方法は、manufacture's instruction に従った。使用した siRNA は MCSFR1 および、対象として非特異的な配列を持つ RNA を用いた。

4. 研究成果

論文掲載内容の抜粋：

- 1) **Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 単独で F4/80陽性腫瘍内マクロファージ(TIM) を処理しても、マクロファージの培養時の形態は一部変化したが、M1マーカーや M2マーカーの発現に変化は認められなかった。** (図 1 A, B)

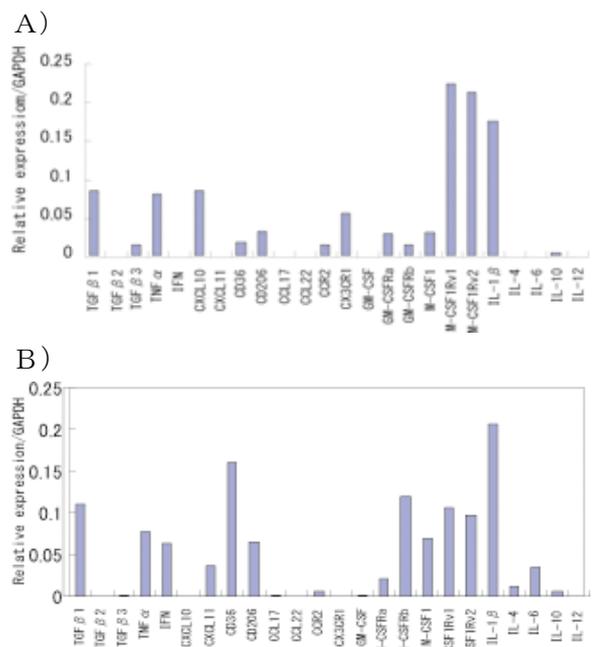


図 1 : A) 未処理時, B) GM-C S F 処理時

- 2) 他方, **macrophage colony stimulating factor (M-CSF) をM-CSF受容体(M-SCF-R)に対する siRNAで抑制しながらGM-CSFでF/480陽性腫瘍内マクロファージを処理すると細胞内のシグナルタンパクの一部の変化がみられ, STAT1, STAT5 やSTAT6などの樹状細胞で通常発現してくる蛋白質が増加し通常腫瘍内マクロファージでは発現していないp65が発現する一方で, p50 やp105などのTIMで発現する分子については変化が認められなかった。** (図 2)

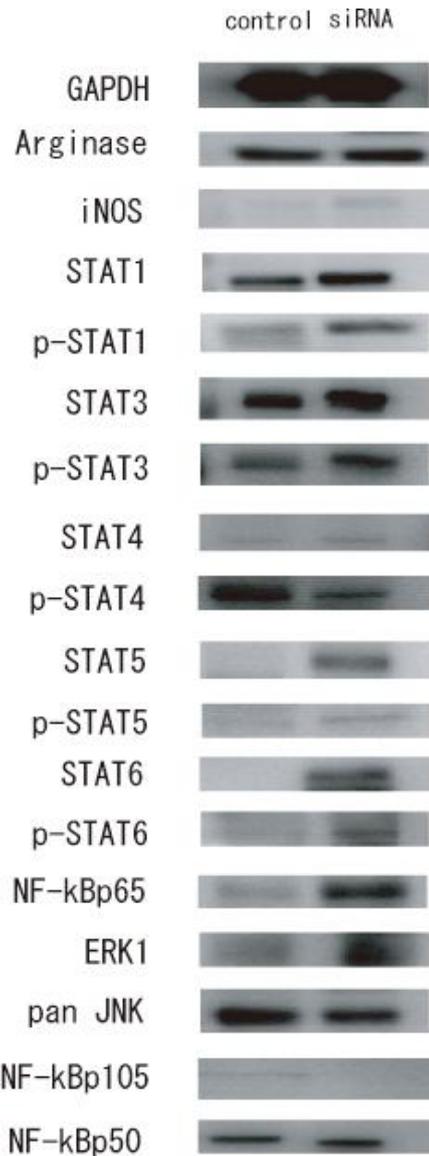


図2 : control: GM-CSF単独で培養した腫瘍内マクロファージ, siRNA: GM-CSF処理と同時にM-CSF受容体に対するsiRNA処理を行って培養した腫瘍内マクロファージ

以上の事から、腫瘍内浸潤マクロファージを単球由来樹状細胞様の形質に再教育できることが示され、マクロファージの可塑性という当初の目的の一つは達成できた。

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 1 件)

- ① **Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic cell-like**

signaling in vitro, Kitoh Y., Saio M., Gotoh N., Umemura N., Nonaka K., Bai J., Vizkeleti L., Torocsik D., Balazs M., Adany R. and Takami T.(2011), Int J Oncol38:1409-19 (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[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

斉尾 征直 (SAIO MASANAO)

国立大学法人琉球大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 40242721

(2) 研究分担者

高見 剛 (TAKAMI TSUYOSHI)

国立大学法人岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 70136943

(H21, H22)

吉見 直己 (YOSHIMI NAOKI)

国立大学法人琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 30166996

(H23; 連携研究者)

富田 真理子 (TOMITA MARIKO)

国立大学法人琉球大学・大学院医学研究
科・准教授

研究者番号：80381250

(H22)

(3)連携研究者