

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 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591698

研究課題名（和文）食道癌化学療法耐性における骨髄由来細胞の機能解明とそれを標的とした治療開発

研究課題名（英文）The role of bone marrow-derived cells in chemoresistance of esophageal cancer

研究代表者

宮田 博志 (HIROSHI MIYATA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80362713

研究成果の概要（和文）：食道癌化学療法後の切除サンプルを用いた免疫組織学的検討やマウスモデルの実験から、シスプラチンを用いた化学療法後に骨髄由来細胞（特にマクロファージ）が腫瘍間質に動員されることが確認された。また骨髄由来細胞の中の CD11b 陽性細胞、c-kit 陽性細胞、M2 マクロファージの腫瘍間質における細胞数が化学療法の感受性と逆相関を示すことから、これらの骨髄由来細胞の腫瘍への動員が食道癌化学療法の耐性メカニズムに関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Immunohistochemical analysis using surgical specimens of esophageal cancer after chemotherapy and mouse model analysis showed that bone-marrow derived cells, especially macrophages, migrated to tumor stroma after cisplatin-based chemotherapy. Infiltration of CD11b (+) cells, c-kit (+) cells and M2 macrophage to tumor stroma correlated inversely with response to chemotherapy. Taken together, these results suggest that recruitment of bone-marrow derived cells is associated with chemoresistance in esophageal cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：食道癌、骨髄由来細胞、化学療法、上皮間葉転換、腫瘍間質、微小環境、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

近年の本邦における臨床試験の結果よ

り切除可能食道癌に対して術前化学療法が標準治療となりつつある現在、食道癌治

療戦略において化学療法はより重要な役割を担うようになってきた。しかしながら多剤併用化学療法を行っても約半数は non-responder であり survival benefit は得られず、食道癌治療成績の向上には化学療法耐性の克服が不可欠である。

一方、近年、癌細胞とそれを支持する微小環境の相互作用が癌の進展に重要であることが明らかになってきた。癌の微小環境を構成する細胞は血管形成を担う内皮細胞、筋線維芽細胞、炎症細胞（マクロファージなど）と線維芽細胞であるが、癌細胞自身の異常だけでなくこれら宿主側の間質との相互作用が癌の浸潤・転移に重要な役割を果たしている。さらにこの腫瘍間質の形成・維持に宿主側の骨髄由来細胞 (bone marrow-derived cells) が関与することが近年報告されつつある。マウスモデルの実験では、①腫瘍内の血管新生に骨髄由来の内皮前駆細胞が動員されること、②腫瘍内に骨髄由来の筋線維芽細胞や線維芽細胞が動員されること、に加え③腫瘍先進部に immature な骨髄細胞が動員され癌の浸潤に寄与すること、④転移巣の腫瘍間質における骨髄由来細胞が転移巣増大に関与すること、などが報告されている。これらより腫瘍原発巣と転移巣のいずれにおいても骨髄由来細胞が腫瘍間質に動員され、癌細胞と相互作用を示すことで腫瘍の浸潤・転移に関与する可能性が示唆される。一方、我々はこれまで食道癌化学療法耐性のメカニズムを研究するなかで、化学療法に耐性を示す食道癌の腫瘍先進部において腫瘍が脱分化し間質との相互作用を示すかのごとく間質に向かって浸潤していく像を認め、それを tumor scattering と呼んだ。そして tumor scattering が化学療法感受性や患者予後と逆相関すること

を見出した（論文投稿中）。このことから我々は化学療法耐性のメカニズムとして、化学療法中に癌細胞からの何らかのシグナルによって骨髄由来細胞が腫瘍先進部に動員され腫瘍間質を形成し、そこで癌細胞と相互作用を示すことで化学療法に耐性を示すようになるのではないかと着想するに到った。以前より正常組織における慢性炎症や創傷治癒の過程において骨髄由来細胞が動員されて組織修復に寄与することが言われてきているが、腫瘍組織ではこのシステムを逆手にとって化学療法耐性（＝癌組織の修復）に骨髄由来細胞を利用しているのではないかと考えた。以上のように本研究では、[食道癌の化学療法耐性メカニズムに骨髄由来細胞の腫瘍間質への動員が関与することを明らかにするとともに、そこに関わる分子機構を解明することでそれを標的とした治療開発につなげたい]と考えている。

2. 研究の目的

- (1) まず化学療法によって bone marrow から腫瘍原発巣と転移巣の間質に骨髄由来細胞が動員されることを証明する。また骨髄由来細胞の動員が原発腫瘍からのどのようなシグナルによって惹起されるのかを解明したい。化学療法中に腫瘍から分泌され plasma 中に遊離するさまざまな増殖因子やサイトカインのスクリーニングを行ってそのシグナル因子を同定したい。我々は特にオステオポンチン、IL-6、VEGF/VEGFR-1、CXCR4/SDF-1、などが関与する可能性があると考えている。
- (2) 原発巣や転移巣の間質に動員された骨髄由来細胞と癌細胞でどのような相互作用が起きて化学療法耐性を引き起こしているのか、それを明らかにしたい。一つの可能性として腫瘍先進部において骨髄由

来細胞を介した上皮－間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) を起こすことで化学療法耐性を獲得することが考えられる。すでに述べたように我々が捉えた、化学療法耐性食道癌の腫瘍先進部でみられる脱分化した癌細胞の間質への微小浸潤像はそれを裏付けるものと考えられる。あるいは癌幹細胞の理論から考えると、骨髄由来細胞が腫瘍先進部で幹細胞ニッチを形成し、癌幹細胞の未分化能・自己複製能の維持に関与することで化学療法耐性を獲得することも可能性として挙げられる。

- (3) 以上のメカニズム解明を基に、化学療法中の骨髄由来細胞の動員を抑制することで化学療法の耐性が克服されるか、また化学療法の効果を増強する併用療法が可能かどうか、検討したい。

3. 研究の方法

- (1) 食道癌組織における骨髄由来細胞の解析：

当科で外科切除を施行された食道癌切除標本を用いて、骨髄由来細胞マーカー (CD11b, c-kit, VEGFR1, CD45) の発現を免疫組織学的に評価する。

- (2) 骨髄由来細胞と癌細胞の相互作用の解析：

上記(1)の標本を用いて、上皮間葉転換 (EMT) マーカーである E-cadherin, Vimentin, snail, β -カテニン, ZEB1 の発現を免疫組織学的に検討し、化学療法効果や、骨髄由来細胞マーカー発現との関係を調べる。

- (3) 食道癌組織における M1 マクロファージと M2 マクロファージの免疫染色：

骨髄由来細胞の一つとして、マクロファージに着目し、化学療法施行後のマクロファージ分画 (M1, M2) を免疫組織学的に評価する。

- (4) マウスモデルでの化学療法施行時のマク

ロファージの動員の検討：

ヌードマウスの xenograft モデルで、シスプラチンを投与した時に、骨髄由来細胞としてのマクロファージが腫瘍間質に動員されているかどうかを検討する。

4. 研究成果

- (1) 食道癌組織における骨髄由来細胞の解析

当科で外科切除を施行された食道癌切除標本 (術前化学療法 93 例、術前無治療例 92 例) を用いて、骨髄由来細胞の表面マーカー (CD11b, c-kit, VEGFR1, CD45) の発現を免疫染色にて評価した。術化学療法後遺残する腫瘍では術前無治療例に比べて、腫瘍間質における CD11b と c-kit の発現が有意に増加した。また術前化学療法症例では CD11b と c-kit の発現は、化学療法の臨床効果、組織学的効果と逆相関を示した。VEGFR1 と CD45 の発現は化学療法の効果と相関しなかった。以上より、ヒト食道癌において CD11b と c-kit をマーカーとする骨髄由来細胞が化学療法の耐性に関与する可能性が示唆された。

- (2) 骨髄由来細胞と癌細胞の相互作用の解析

上記 1 のサンプルを用いて EMT (上皮間葉転換) マーカーである E-cadherin, Vimentin, snail, β -catenin, ZEB1 の発現を免疫組織学的に検討し、EMT マーカー発現と化学療法効果、骨髄由来細胞マーカー発現との関係を調べた。まず化学療法後遺残腫瘍では術前無治療例に比べて、E-cadherin が減弱し、snail と ZEB1 の発現が増強した。また E-cadherin 発現の減弱と snail 発現の増強は化学療法非奏効例に有意に多くみられた。ZEB1 と化学療法の効果に相関は見られなかった。さらに腫瘍間質に CD11b と c-kit を強発現する症例では、E-cadherin 発現が減弱し、snail 発現が

増強していた。以上より、CD11b と c-kit をマーカーとする骨髄由来細胞が、化学療法後遺残腫瘍において EMT を惹起する可能性が示唆された。

(3) 食道癌組織におけるM1マクロファージとM2マクロファージの免疫染色

食道癌切除標本（術前治療なし114例、術前化学療法施行108例）を用いて、CD68（M1+M2マクロファージ）、とCD163（M2マクロファージ）の免疫染色を施行した。術前治療なし症例と化学療法施行症を比較すると、腫瘍間質のM1マクロファージの発現には差がなかったが、腫瘍間質のM2マクロファージ発現は化学療法施行例で有意に増加していた。また腫瘍間質のM2マクロファージの高発現例では化学療法の臨床効果・組織学的効果がM2マクロファージ低発現例に比べていずれも低かった。一方、M1マクロファージの発現と化学療法効果との間に関連は見られなかった。術前化学療法施行例の予後は腫瘍間質M2マクロファージの高発現例で有意に予後不良であった。以上の結果より、食道癌化学療法において、腫瘍間質に浸潤するM2マクロファージが化学療法耐性に関与する可能性が示唆された。

(4) マウスモデルでの化学療法施行例における腫瘍間質マクロファージの解析

ヌードマウスに食道癌細胞株（TE3、TE8）を皮下移植したxenograftモデルを作成した後、マウスの腹腔内にシスプラチンを投与し、皮下腫瘍の間質に誘導されるマクロファージを免疫組織学的に検討した。CD11bとF4/80の抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、シスプラチン投与したマウスではコントロールマウス（生食投与）に比べて、皮下腫瘍周囲に浸潤するCD11b陽性細胞とF4/80陽性細胞が多かった。このことから、マウスモデルでシスプラチン投与により、腫瘍間質に

マクロファージが動員されることが確認できた。

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）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 博志 (HIROSHI MIYATA)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80362713

(2) 研究分担者

土岐祐一郎 (DOKI YUICHIRO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20291445

瀧口 修司 (TAKIGUCHI SHUJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00301268

山崎 誠 (YAMASAKI MAKOTO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50444518

藤原 義之 (FUJIWARA YOSHIYUKI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：40314330
(H22 まで分担者として参画)