

## 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 31 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592371

研究課題名（和文） 抗炎症性マクロファージにおける遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of gene expression in anti-inflammatory M2 macrophages

研究代表者 大森 喜弘（Ohmori Yoshihiro）

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50194311

研究成果の概要（和文）：

Th1 由来 IFN- $\gamma$ により活性化した M1 マクロファージ (M $\phi$ ) は抗細菌活性、抗腫瘍活性を持つことが知られている。一方、Th2 由来 IL-4/IL-13 により刺激された M2 M $\phi$  は組織修復や血管新生に関与している。本研究課題ではまず始めに免疫組織学的検索により口腔扁平上皮癌組織に浸潤している M $\phi$  の表現型を検討し、その結果 M2 M $\phi$  であることを明らかにした。次に M2 M $\phi$  への分化誘導機構を検討するため M2 M $\phi$  のマーカー遺伝子 *Arg-1* の発現制御機構を解析した。その結果、IL-4/IL-13 により誘導された *Arg-1* の発現は、低酸素により増強した。IL-4/IL-13 による *Arg-1* の発現には STAT6 が重要であるが、低酸素による増強には STAT6 転写活性の増強ではなく、他の転写因子との協調的相互作用介した制御機構による可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Macrophages (M $\phi$ ) polarized with Th1 cytokines are called M1 M $\phi$ , and are important for the clearance of pathogens and tumor cells. M $\phi$  activated by Th2 cytokines IL4/IL-13 are classified as M2 M $\phi$ , and are important in tissue repair and angiogenesis. We initially evaluated infiltrated M $\phi$  about their phenotype by immunostaining in oral cancer tissue. We found that the infiltrated M $\phi$  have an M2 phenotype. To further elucidate the mechanisms responsible for the M2-polarization of M $\phi$  in cancer, we examined the mechanisms of expression of the *Arg-1* gene. Hypoxia further enhanced the IL-4/IL-13 induced *Arg-1* mRNA expression. Although IL-4/IL-13-induced the *Arg-1* expression has been shown to be dependent on STAT6 activation, hypoxia has no stimulatory effect on the STAT6-mediated transcriptional activation. These results suggest that hypoxia-mediated upregulation of the *Arg-1* gene expression may result from cooperative interaction with different type of transcription factors and coactivators.

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
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：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：シグナル伝達、M2 マクロファージ、腫瘍、IL-4

## 1. 研究開始当初の背景

Th1 細胞由来 IFN $\gamma$  やグラム陰性細菌由来 (lipopolysaccharide: LPS) はマクロファージの活性化を誘導することが知られており、近年、このような古典的なマクロファージ活性化因子である IFN $\gamma$ 、LPS により活性化したマクロファージ (classically activated macrophage) を M1 マクロファージとして分類している。一方、抗炎症性サイトカインである IL-4/IL-13 により刺激されたマクロファージは alternatively activated macrophages として M2 マクロファージとは異なる機能的役割を持つことから M2 マクロファージとして分類している。この M2 マクロファージは免疫抑制的機能を持ち、腫瘍組織に浸潤している腫瘍関連マクロファージとして腫瘍の増殖、進展に関与していることが示唆されている。しかしながら、腫瘍局所の微小環境がどのようなメカニズムにより抗炎症性 M2 マクロファージを誘導するかについては十分明らかにされていない。そこで、本研究課題では腫瘍の微小環境が IL-4/IL-13 により誘導される M2 マクロファージの細胞内情報伝達経路や遺伝子発現にどのような影響を与えるのかを検討する。

## 2. 研究の目的

### 1. 口腔扁平上皮癌における腫瘍関連 M2 マクロファージの検索

口腔扁平上皮癌組織には腫瘍関連マクロファージの浸潤が認められている。しかしながらその表現型や腫瘍の増殖、進展におけるマクロファージの役割については十分には明らかにされていない。そこで口腔癌組織に浸潤しているマクロファージが M1 あるいは M2 マクロファージであるか同定するため口腔扁平上皮癌 1 次症例における免疫組織学的検索を行った。

### 2. M2 マクロファージにおける遺伝発現制御機構

腫瘍細胞が増大すると、その増大スピードに見合った血管新生がなされないために、腫瘍組織は低酸素状態に陥ることが報告されている。そこで腫瘍局所に認められる低酸素状態が IL-4/IL-13 により誘導される M2 マクロファージの遺伝子発現に及ぼす影響およびその遺伝子発現における分子機構について検討した。特に、M2 マクロファージの機能発現に必須の転写因子 STAT6 を介した情報伝達経路および遺伝子発現に対する影響を M2 マクロファージのマーカー遺伝子である *Arg-1* をモデル遺伝子として解析を行った。

## 3. 研究の方法

### 1. 口腔扁平上皮癌における腫瘍関連 M2 マ

## クロファージの検索

### (1) 検索対象

明海大学病院口腔外科にて加療した口腔扁平上皮癌 1 次症例における生検および手術切除病変 55 例を実験に供試した。

### (2) 使用抗体

M1 マクロファージのマーカーとして抗ヒト CD80 モノクローナル抗体、また M2 マクロファージのマーカーとして抗ヒト CD163 モノクローナル抗体を使用した。総マクロファージのマーカーとして抗 CD68 抗体を用いた。さらに浸潤リンパ球の解析のために抗 CD4 並びに抗 CD8 抗体も用いた。

### (3) 免疫組織学的検索

切除病変は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定したパラフィン包埋材料から、薄切切片を作成後、HE 染色を施し組織学的検索を行なった。標本はすべて 4 $\mu$ m 間隔で連続切片を作製し、病理組織学的分化度 (grade) は WHO の診断基準に従い、高分化 (grade I)、中分化 (grade II)、低分化 (grade III) に分類した。なお本研究にあたっては、明海大学歯学部倫理委員会の承諾を得ている (承認番号 A0290 号)

免疫組織学的検索は通法に従い、脱パラフィン後、内因性のペルオキシダーゼ活性阻止のために過酸化水素加メタノール中にて処理を行った。非特異的反応を阻止するために BSA 溶液に浸漬後、一次抗体を反応させた。標本を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識された二次抗体を反応させ、AEC 発色試薬を添加し発色させた。流水で洗浄後、Mayer のヘマトキシリンで染色を行った後、封入し光学顕微鏡下で観察した。

## 2. M2 マクロファージにおける遺伝発現制御機構

### (1) 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株 Raw264.7 細胞は 10%FBS および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地にて培養した。細胞は、低酸素(1%O<sub>2</sub>)および IFN $\gamma$  (10 ng/ml)にて所定時間刺激し実験に供試した。

### (2) *Arg-1* 遺伝子発現の解析

Raw264.7 細胞を所定時間刺激後、RNA を抽出し、*Arg-1* の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。

### (3) STAT6 の発現局在の解析

Raw264.7 細胞を所定時間刺激後、total cell lysate を調製し、抗 STAT6 抗体および抗 STAT6 チロシンリン酸化抗体を用いてウ

ウェスタンブロット法にて検討した。また、細胞の細胞質および核タンパクを抽出し、抗STAT6抗体を用いてウェスタンブロット法にてSTAT6の核内移行について検討した。

#### (4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

Raw264.7細胞に*Arg-1*プロモーター/エンハンサー領域を含むルシフェラーゼコンストラクトを遺伝子導入し、24時間後にIL-4/IL-13にて刺激した。8時間後に細胞抽出液を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行なった。

## 4. 研究成果

### 1. 口腔扁平上皮癌における腫瘍関連M2マクロファージの検索

(1) 口腔扁平上皮癌 1次症例における生検および手術切除病変 55例について、浸潤マクロファージの表現型を明らかにするため免疫組織学的検索を行った。その結果、総マクロファージのマーカーであるCD68陽性細胞は、すべてのgradeの腫瘍に認められたが、陽性細胞数と病理組織学的分化度との間には相関関係は認められなかった。M1マクロファージのマーカーであるCD80陽性細胞は、高分化度の腫瘍にわずかに認められ、低分化度腫瘍では減少傾向が認められたが統計学的有意差は得られなかった。一方、M2マクロファージのマーカーであるCD163は、高分化度腫瘍 (grade I, I~II)では陽性細胞数は低く、低分化度 (grade II, II~III)ではCD163陽性細胞数の増加が認められ、腫瘍の分化度とCD163陽性細胞の間に統計学的有意差が認められた ( $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test)。

(2) 腫瘍組織におけるM2マクロファージの分化誘導と浸潤リンパ球との関連性を検討するため、CD4ならびにCD8陽性細胞について免疫組織学的検索を行った。その結果、腫瘍の分化度と浸潤リンパ球との間には関連性は認められなかった。

(3) 以上の結果から、口腔扁平上皮癌組織に浸潤している腫瘍関連マクロファージはM2マクロファージの表現型を有し、低分化度の腫瘍組織により多く存在していることが明らかとなった。

### 2. M2マクロファージにおける遺伝発現制御機構

腫瘍関連マクロファージがどのようなメカニズムによりM2マクロファージへ分化するのか検討する目的で、腫瘍組織に認められる低酸素がM2マクロファージのマーカー遺伝子である*Arg-1*の発現に及ぼす影響について検討を行い、以下の結果を得た。

(1) IL-4/IL-13により誘導される*Arg-1*の発現

動態をリアルタイムPCR法にて検討した。その結果、IL-4/IL-13刺激により誘導された*Arg-1*の発現は、低酸素によりその発現は増強した。また、*Arg-1*の発現は48時間まで時間依存的に増強した。

(2) IL-4/IL-13により誘導される転写因子STAT6のリン酸化をウェスタンブロット法にて検討した。その結果、IL-4/IL-13刺激により誘導されたSTAT6のリン酸化は、低酸素により抑制された。また、STAT6の核内移行を細胞質および核タンパクを抽出しウェスタンブロット法にて検討した結果、STAT6の核内移行はIL-4/IL-13により認められ、低酸素によりSTAT6の核内移行は抑制された。*Arg-1*のプロモーター/エンハンサー領域のどの領域がIL-4/IL-13、低酸素刺激による発現に重要であるかを検討するためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行なった。その結果IL-4/IL-13刺激に対して*Arg-1*(-31~-3810)の転写活性は増加したが、低酸素による増強は認められなかった。また5'-上流1.5 kbを除去したレポーターコンストラクト(-31/-2365)ではほぼ完全にIL-4/IL-13による転写活性が失われた。この結果はIL-4/IL-13刺激による*Arg-1*の発現には-3810~-2365の領域が必要であり、この領域に含まれるSTAT6結合配列が重要であることが明らかとなった。しかしながら*Arg-1*(-31~-3810)における低酸素での発現増強が認められなかったことから、この領域以外(上流あるいは下流)の制御領域が*Arg-1*の低酸素による発現に必要な可能性が示唆された。現在この可能性についてさらなる検討を行っている。

### 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 K. Mori, M. Hiroi, J. Shimada and Y. Ohmori: Infiltration of M2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. (2011) *Cancers* 3, 3726-3739. doi:10.3390/cancers3043726  
査読有り

[学会発表] (計1件)

- ① 廣井美紀、大森喜弘：抗炎症性M2マクロファージにおける*Arg-1*遺伝子発現制御機構、歯科基礎医学会、2011年10月2日、岐阜

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

大森 喜弘 (Ohmori Yoshihiro)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50194311

(2)研究分担者

廣井 美紀 (Hiroi Miki)  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号：30419717

(3)連携研究者

関根 圭輔 (Sekine Keisuke)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：00323569