

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790388

研究課題名 (和文) マクロファージを介した腫瘍内微小環境形成の分子基盤解明と癌治療への応用

研究課題名 (英文) The significance of macrophage in tumor microenvironment

研究代表者

菰原 義弘 (KOMOHARA YOSHIHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40449921

研究成果の概要 (和文)：ヒトがん組織検体とマウス腫瘍モデルを用いて、腫瘍内微小環境形成においてマクロファージが重要な役割を果たしていることを明らかにした。グリオーマや肝内胆管癌、卵巣癌、腎癌、悪性リンパ腫では、CD204 や CD163 を発現した M2 マクロファージが多い症例ほど、腫瘍の進行が早く予後が悪いことを明らかにした。動物実験で、マクロファージにおける CD204 が、マクロファージの活性化を制御していることを突き止め、腫瘍内微小環境におけるマクロファージの具体的な役割について新しい知見を得ることが出来た。また、CD204 と同様マクロファージに特異的に発現している分子である CD163 が腫瘍内微小環境形成に深くかかわっているということを示唆する興味深いデータが得られた。CD163 の役割に関しては今後の検討課題である。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we demonstrated the significance of macrophage in development of tumor microenvironment. We found that high infiltration of CD163- and CD204-positive M2 macrophages correlate to poor clinical prognosis in patients with glioma, cholangiocellular carcinoma, ovarian cancer, malignant lymphoma, and kidney cancer. By means of using murine cancer model, we showed that CD204 regulates the macrophage activation, differentiation to M2 phenotype, and promotes the tumor development. By analysis using human pathological specimens, we interestingly suggested the significant role of CD163 in development of tumor microenvironment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、体内に侵入した異物や病原菌を貪食するだけでなく、様々なサイトカインやケモカインを産生することで多様

な病態に深く関わっている。腫瘍組織内にも多数のマクロファージの浸潤が見られ、腫瘍の発育・浸潤と密接に関わっている。このようなマクロファージは正常組織に分布して

いるものとは全く異なる性質を有しており、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) と呼称されている。

マクロファージの活性化には LPS や Interferon- γ による古典的活性化 (M1) と IL-10 などの抗炎症性サイトカインによるオルタナティブ活性化 (M2) の二種類が知られており、それぞれが相反する機能を有している (図 1)。これまで、ヒトにおいて免疫組織化学に有用な M1/M2 のマーカーが存在せずヒトでの解析が進んでいなかったが、近年、我々が M2 のマーカーとして CD163 と CD204 を報告したことで、ヒトにおける M1/M2 の局在・役割の組織学的検討が可能となった (Komohara et al. *J Histochem Cytochem* 2006)。

これまで、私どもは、膠芽腫・卵巣癌・前立腺癌等のガン組織を中心に検討を行い、CD163/CD204 陽性の M2 マクロファージが腫瘍の組織学的悪性度に深く関わっていることを明らかにした。特に膠芽腫では、腫瘍組織内に、CD163/CD204 を強く発現している M2 マクロファージ(ミクログリア)の浸潤が多い症例では有意に予後が悪いことが明らかとなった (Komohara et al. *J Pathol* 2008、図 2)。

2. 研究の目的

我々はガンの微小環境形成の主役である腫瘍関連マクロファージにスカベンジャー受容体である CD204 (Class A scavenger receptor) が高発現しており、更に腫瘍内微小環境形成と腫瘍の発育に深く関わっていることを見出した。CD204 はマクロファージに特異的に発現する主要な受容体の一つであり、粥状動脈硬化におけるマクロファージによる修飾 LDL の取り込みを始めとして様々な異物の取り込みや細胞接着に深く関与している。しかしながら、腫瘍内浸潤マクロファージに発現される CD204 の役割については殆ど解析されていない。本研究では、腫瘍内微小環境におけるマクロファージの活性化に CD204 がどのようなメカニズムで関わっているのかを詳細に解析し、CD204 関連分子を標的とする新しい癌治療の開発に寄与したい。また、実際にヒトの悪性腫瘍組織において CD204 陽性細胞の分布や役割、がんの悪性度などとの関連性を検討し、CD204 が腫瘍内微小環境形成に重要な役割を果たしているのかどうかを検討したい。

3. 研究の方法

腫瘍関連マクロファージにおける CD204 の役割を解明するため、当教室で所有している CD204 欠損マウス (C57BL/6 back ground、

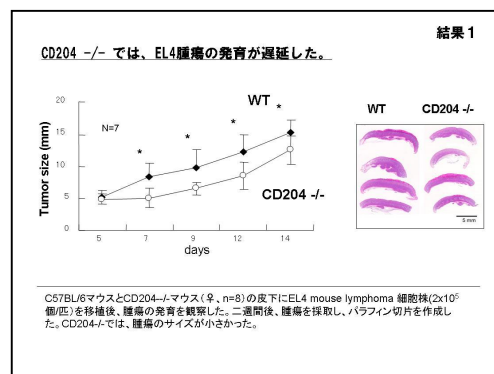
Balb/c back ground) にマウスのリンパ腫細胞である EL4 細胞と大腸癌細胞である C26 を移植する。予備実験では野生型に比べ CD204 欠損マウスでは腫瘍の大きさが有意に小さいことが分かった。そこで、CD204 欠損マウスでの腫瘍内微小環境が野生型と比べてどのように異なるのかを検討し、サイトカイン産生の違いについても網羅的解析を行う。また、サイトカイン産生の違いを引き起こすメカニズムについて、培養細胞を使った実験により、特にリン酸化シグナル伝達経路について詳細な解析を行う。

様々なヒト悪性腫瘍組織における腫瘍関連マクロファージと悪性度、臨床予後についての関連性を検討する。検索する分子としては、汎マクロファージ分子である CD68、M2 マクロファージのマーカーである CD163、CD204 を使用する。

4. 研究成果

(1)

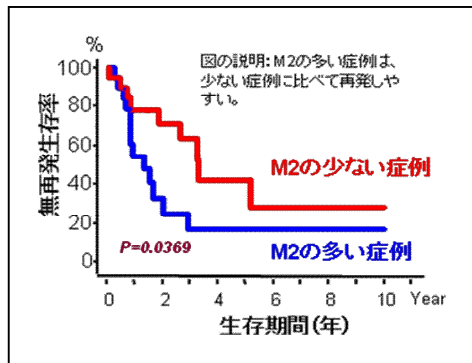
以前、脳腫瘍中のマクロファージの数 (とくに M2 マクロファージ) が多い症例ほど予後が悪いことを明らかにした。その研究のなかで、M2 マクロファージには CD163 と CD204 という 2 つの受容体が強く発現していることを見出した。M2 マクロファージにこれらの受容体が発現している意義はよく分かっていなかったが、遺伝子変異マウスを使った研究を行うことで、これらの意義を検討した。私たちの研究室では以前から、CD204 欠損マウスを所有していたので、CD204 についての研究を行った。その結果、CD204 は、マクロファージからの活性酸素 (がんを傷害する物質) 産生やインターフェロン (免疫を活性化) の産生を抑制することでがんの増殖に関わっていることが明らかになった。人為的に CD204 を抑制することが出来れば、新しいがん治療の開発につながるかもしれない。



(2)

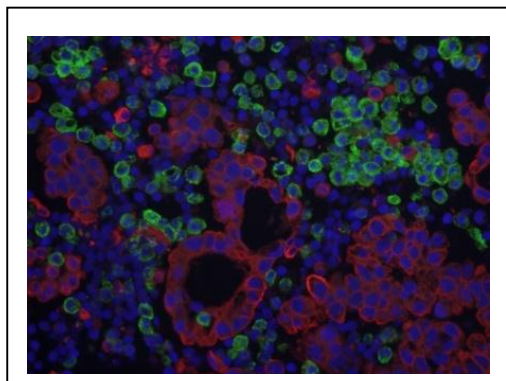
この研究は消化器外科学教室との共同研究です。この研究では肝内胆管癌に注目した。免疫染色による解析の結果、M2 マクロファ-

ジの多い症例と少ない症例があり、M2の多い症例では血管新生が多く認められたり、多数の制御性T細胞が浸潤していることが分かった。制御性T細胞は、がん患者での免疫抑制状態に関わる重要な細胞で、この細胞が多いほどヒトが元々持っているがんに対する免疫力が下がるのは周知の事実である。免疫力の低下が原因かどうかは断定できないが、M2の多い患者さんは少ない患者さんに比べて再発しやすいという結果が得られた。



(3)

この研究は産婦人科学教室との共同研究です。卵巣癌が進行するとがん細胞が腹腔に播種して徐々に腹水が貯まっていく。この研究で分かったことは腹水の中には多数のM2マクロファージが含まれており、これらのM2マクロファージはがん細胞を活性化させるサイトカインを産生することで、がん細胞に増殖シグナルを送っていた。つまり、がん細胞が腹腔内に播種して増殖していく過程には、このがん細胞とマクロファージの細胞間相互作用が深く関わっていると考えられた。自分たちの研究ではないが、マウスを使った動物実験でも卵巣癌の進行にマクロファージが関わっていることが示されている。



(4)

この研究ではリンゴ由来のCA (Corosolic acid) という天然化合物がNF-κBとStat3というM2への分化に関わるシグナル伝達因子を阻害することを明らかにした。これ以上の

詳しいメカニズムの解析は難しく手が出せなかったが、この化合物にはがん細胞を殺す効果もあった。抗癌剤の効果も高める作用もあり、いま、動物実験を行っている。この研究は天然薬物学教室との共同研究です。

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7件)

すべて、熊本大学細胞病理学教室からの論文です。

1. Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M. Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3 and NF-κB in tumor cells and tumor-associated macrophages. **Cancer Sci** 2011;102:206-211. 査読有

2. Takaishi K, Komohara Y, Tashiro H, Ohtake H, Nakagawa T, Katabuchi H, Takeya M. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. **Cancer Sci** 2010;101:2128-36. 査読有

3. Hasita H (*), Komohara Y (*), Okabe H, Masuda T, Ohnishi K, Lei XF, Beppu T, Baba H, Takeya M. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Sci** 2010;101:1913-1919 *: Equal contributor. 査読有

4. Niino D, Komohara Y, Murayama T, Aoki R, Kimura Y, Hashikawa K, Kiyasu J, Takeuchi M, Seufuji N, Sugita Y, Takeya M, Ohshima K. Ratio of M2 macrophage expression in closely associated with poor prognosis for Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). **Pathol Int** 2010;60:278-283. 査読有

5. Ohnishi K, Komohara Y, Sakashita N, Iyama K, Murayama T, Takeya M. Macrophages in Langerhans cell histiocytosis are differentiated toward M2 phenotype - their possible involvement in pathological process. **Pathol Int** 2010;60:27-34. 査読有

6. Komohara Y, Takemura K, Lei XF, Sakashita N, Harada M, Suzuki H, Kodama T, Takeya M. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to up-regulation of nitric oxide and

IFN-gamma production by tumor-associated macrophages. **Cancer Sci**

2009;100:2160-2165. 査読有

7. Kawamura K(*), Komohara Y(*), Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. **Pathol Int** 2009;59:300-305. *: Equal contributor. 査読有

[学会発表] (計6件)

1. Yoshihiro Komohara, Horlad Hasita, Koji Ohnishi, Yasuo Fujiwara, Motohiro Takeya

The significance of anti-inflammatory (M2) macrophages and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. (国際ポスターセッション)

第56回日本病理学会秋期特別総会 2010年11月25日~26日 (小倉、西日本総合展示場)

2. 菺原義弘、Horlad Hasita、大西紘二、藤原章雄、竹屋元裕

腎淡明細胞癌における M2 マクロファージの役割と臨床予後との関連性

第7回日本病理学会カンファレンス 2010年8月6日~7日 (岡山、岡山コンベンションセンター)

3. 菺原義弘、大西紘二、竹屋元裕

脳原発悪性リンパ腫におけるマクロファージ浸潤と臨床予後に関する解析

第50回 日本リンパ網内系学会 2010年6月18-19日 (新潟、朱鷺メッセ)

4. 菺原義弘、藤原章雄、大西紘二、Hasita Horlad、竹屋元裕

Stat3 を介したグリオーマ細胞とマクロファージの細胞間相互作用

第99回 日本病理学会総会 2010年4月27-29日 (東京、京王ホテル)

5. Yoshihiro Komohara, Yukio Fujiwara, Motohiro Takeya

Stat3 mediates the cell-cell interaction of macrophages and tumor cells in human glioblastoma.

17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. July 3-4, 2009 (Kanazawa, Japan, KKR 金沢ホテル)

6. 菺原義弘、竹村健一、坂下直実、竹屋元裕

腫瘍内浸潤マクロファージにおける CD204(class A scavenger receptor)発現の意義

第98回日本病理学会総会 2009年5月1日~3日 (京都:国際会議場)

[その他]

ホームページ等

<http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/patho2/pages/komohara.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菺原 義弘 (KOMOHARA YOSHIHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 40449921