

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590397

研究課題名(和文) 食道扁平上皮癌の発生・増殖・進展におけるM2マクロファージ/癌細胞相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of M2 macrophage/cancer interaction in carcinogenesis, growth and progression of human esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

横崎 宏 (Yokozaki, Hiroshi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10200891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト食道癌組織には早期よりM2型マクロファージが浸潤し、癌の悪性度や不良な予後に関与することを明らかにした。食道扁平上皮癌培養上清によりM2様に分化させた単球性白血病細胞株や正常成人末梢血単球由来マクロファージで特異的に発現変化する遺伝子をマイクロアレイにより解析し、前者からCyr61を後者からGDF15を抽出した。Cyr61はMEK/Erk系を介してマクロファージの運動能とCD204発現を誘導し、GDF15はAktおよびErk系を介して食道癌細胞の増殖能を亢進した。活性化マクロファージは共培養により不死化正常ヒト食道扁平上皮細胞の増殖を促進した。

研究成果の概要(英文)：Infiltration of M2 type macrophage in human esophageal squamous cell carcinomas (ESCCs) was associated with grade of malignancy and patients prognosis. Cyr61, extracted as one of the up-regulated genes during M2 differentiation of THP-1 human monocytic leukemia cell line by conditioned media of ESCC cell lines, induced expression of CD204 and migration of macrophages through activation of MEK/Erk signal pathways. GDF15, from activated human peripheral blood monocyte derived macrophage, promoted growth of ESCC cells by activating Akt and Erk. Activated macrophages promoted the growth of immortalized normal human esophageal squamous epithelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学 癌 食道 マクロファージ 癌・間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌を顕微鏡観察すると、多くの部分は癌細胞以外の間質細胞(血管内皮、線維芽細胞、白血球など)と細胞外基質で占められ、これらの空間的相互作用により癌組織が成立していることが伺える。マクロファージは癌組織中に最も多く認められる白血球であるが、その役割の全貌はいまだ明らかとはなっていない。近年、乳癌、子宮頸癌、膀胱癌など様々な癌においてマクロファージを多く含む腫瘍を持つ症例の予後が不良であることが報告され、古典的な炎症反応や免疫監視とは趣を異にする機能を癌組織内でマクロファージが獲得し、その進展をむしろ促進する可能性が示された。

(2) マクロファージには免疫を活性化する M1 型と抑制する M2 型の少なくとも二方向の分化が知られており、癌組織でその進展を促すマクロファージは M2 型の特性を多く持つことを支持する知見が蓄積されつつある。M2 マクロファージは癌組織の中で増殖因子や、血管新生因子を分泌して癌-間質相互作用における間質側の主役として注目される。これまで組織内で M2 マクロファージを特定することは困難であったが、その特異的表面マーカーである CD204 や CD163 に対する抗体が開発され、グリオーマ、胆管癌、肺癌における免疫組織化学的解析結果が報告されている。しかし、初期腫瘍発生における M2 マクロファージの役割を詳細に解析した研究はなかった。

(3) 食道扁平上皮癌は難治癌の一つであり、予防ならびに早期発見、早期治療が最も重要な臨床的課題である。病理組織学的には、初期病変である上皮内腫瘍の段階から血管新生・誘導を特徴とする間質変化が生じ、臨床的に narrow band imaging 内視鏡により intrapapillary capillary loop の形態異常としてとらえられ、早期診断に役立っている。しかるに、この様な形態変化を癌-間質相互作用の観点から解析し、分子病理発生を明らかにした研究はなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では食道扁平上皮癌の発生・増殖・進展における M2 マクロファージ/癌細胞相互作用を臨床検体ならびに培養系を用いて解析し、分子病態における意義を明らかにするとともに、早期病変の正確な病理組織診断に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 浸潤性食道扁平上皮癌への M2 マクロファージ浸潤と臨床病理学的要因の相関解析
外科的あるいは内視鏡的に切除された浸潤性食道癌のホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織切片に対し、マクロファージ全般を認識する抗ヒト CD68 抗体、M2 マクロ

ファージを認識する抗ヒト CD204 抗体、抗ヒト CD163 抗体を用いた免疫組織化学を施行する。

腫瘍組織内へのマクロファージの浸潤程度、その中に占める M2 マクロファージの割合を計測し、個々の症例の臨床病理学的要因および予後との相関を統計学的に解析し、食道癌の進展における意義を把握する。

浸潤性食道扁平上皮癌組織における M2 マクロファージ/癌細胞相互作用を空間的に把握するため、浸潤性食道癌腫瘍組織連続切片について、細胞増殖活性、サイトカイン・ケモカインおよび受容体、細胞外基質分解酵素の発現を免疫組織化学的に解析し、M2 マクロファージの浸潤状態を比較し、浸潤性食道扁平上皮癌組織における M2 マクロファージ/癌細胞相互作用の細胞生物学的意義を明らかにする。

(2) 食道扁平上皮癌細胞と M2 マクロファージの細胞生物学的相互作用の解析

教室で維持している食道扁平上皮癌由来株化癌細胞 5 株(TE-8、TE-9、TE-10、TE-11、TE-15)の培養上清を調整する。

健常成人末梢血単核細胞あるいはヒト単球形白血球細胞株 THP-1 より分化誘導したマクロファージに、食道癌細胞培養上清を 24 時間作用させ、洗浄・固定後に M2 マクロファージマーカー CD204 および CD163 の発現を解析する。

誘導が確認された場合、マクロファージで特異的に発現変化する遺伝子を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析する。

(3) 食道上皮内腫瘍の増殖と異型血管形成における M2 マクロファージの役割の解析

内視鏡的に切除された食道上皮内腫瘍組織内への M2 マクロファージの浸潤程度および分布と腫瘍組織の増殖活性、血管の形態・分布を免疫組織化学的に解析する。

(2) のアレイ解析で抽出された癌細胞/マクロファージ相互作用で発現変化する遺伝子産物の食道上皮内腫瘍における発現を免疫組織化学的に解析し、食道上皮内腫瘍の特徴的形態学的構築である上皮細胞増殖と異型血管形成に主たる役割を演ずる因子群を特定する。

特定された因子群の発現を、正常食道粘膜、食道炎、食道上皮内腫瘍の生検標本で免疫組織化学的に検討し、食道上皮内腫瘍に特異的なマーカーを抽出する。

4. 研究成果

(1) 浸潤性食道扁平上皮癌への M2 マクロファージ浸潤と臨床病理学的要因の相関解析

ESD 切除された食道上皮内病変 38 病変について、単位粘膜長あたりの上皮内 CD68、CD163、CD204 陽性マクロファージ数を腫瘍部と非腫瘍部で計測して比較したところ、上皮内腫瘍の段階から非腫瘍部重層扁平上

皮に比較して有意にマクロファージが上皮層内に浸潤していた。さらに、外科的切除された食道全割標本について、上皮層における5mm 粘膜長あたりのCD204 陽性マクロファージ数の分布図を作成し上皮形態と比較すると、マクロファージ密度の高い領域は上皮内腫瘍の分布とほぼ一致していた。以上から、マクロファージが上皮内腫瘍の段階から食道癌と深く関与していることが強く示唆された。

手術的に切除された70 例の食道癌組織通常病理切片についてマクロファージ表面マーカーの免疫組織化学を行い、臨床病理学的因子、腫瘍組織内微小血管密度ならびに予後について比較検討した。CD204 陽性マクロファージを腫瘍組織内に多く含む症例は進行した壁深達度、脈管侵襲、所属リンパ節転移ならびにステージを示し、有意に無病生存期間が不良であった。さらに、微小血管密度とマクロファージ密度にも正の相関が見られ、腫瘍組織内マクロファージの内でも、CD204 陽性 M2 形質を示すものが食道扁平上皮癌の悪性度や血管新生に関与する可能性が示唆された。

(2) 食道扁平上皮癌細胞と M2 マクロファージの細胞生物学的相互作用の解析

食道扁平上皮癌細胞とマクロファージの相互作用を検証する目的で、TPA 処理ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 に 50% 食道癌細胞培養上清を作用させたところ、興味深いことに、検討した5 株いずれの上清によっても CD204 発現が誘導され、さらに、VEGFA の発現も誘導された。そこで、TE-8 食道癌細胞培養上清により TAM 様分化を示した THP-1 細胞に特異的に発現変化を来す遺伝子を cDNA マイクロアレイにより解析した。特異的に発現亢進する遺伝子の一つである *Cyr61* は、CCN1 と呼ばれる cystein rich な CCN ファミリー分子の一つをコードし、インテグリンを介して線維芽細胞、単球・マクロファージ、血管内皮細胞などの接着、増殖、運動などに関与することが知られ、乳癌、前立腺癌、グリオーマ、口腔扁平上皮癌などで腫瘍促進的に働くことが報告されていた。食道癌組織での *Cyr61* の発現は、癌細胞、CD204 陽性マクロファージいずれにも認められた。リコンビナント *Cyr61* をマクロファージ様 THP-1 に作用させると CD204 の発現を誘導するとともに MEK/Erk シグナル系を介して遊走能を亢進させた。次に、70 例の食道癌手術切除検体パラフィン包埋切片について *Cyr61* 免疫組織化学を実施し、癌先進部と同一例の正常食道扁平上皮基底部に於ける *Cyr61* 染色強度との比較により高発現群と低発現群に分けると、高発現群では、リンパ節転移と、腫瘍組織内 CD204 陽性マクロファージ数に有意の相関が認められた。以上より、*Cyr61* は食道扁平上皮癌微小環境において MEK/Erk 経路の活性化を介してマクロ

ファージの M2 分化と遊走を促進している可能性が示唆された。

CD14+末梢血単球を MACS により分離し、CSF-1 を作用させることによりマクロファージ様に分化させた後、と同様に食道癌細胞培養上清を作用させると、CD163、CD204 の発現が誘導され、IL-10 high、IL-12 low の M2 サイトカインパターンを呈するとともに、VEGFA、MMP-2、MMP-9 の発現誘導が確認され、末梢血からリクルートされた単球由来マクロファージが、がん微小環境において M2 型の分化を示す可能性が示された。M2 分化の過程で発現誘導される遺伝子をマイクロアレイ解析により抽出した。その内、*GDF15* は BMP 様分子をコードし、低酸素、急性組織傷害で誘導され、炎症においてはマクロファージ活性化のオートクリン調節因子であり、乳癌、大腸癌、膵癌、前立腺癌などでその過剰発現と増殖、生存、浸潤との相関が報告されていた。末梢血単球由来マクロファージを食道癌細胞培養上清で刺激すると *GDF15* が誘導され、食道癌細胞では、TE-9 で *GDF15* が発現しているが、TE-8、TE-15 は陰性であった。リコンビナント *GDF15* は食道癌細胞の増殖を Akt および Erk シグナル系を介して促進した。

(3) 食道上皮内腫瘍の増殖と異型血管形成における M2 マクロファージの役割の解析 SV40 large T にて不死化したヒト食道上皮細胞 Het-1A の増殖に対する THP-1 由来マクロファージ様細胞の作用を共培養系により解析した。既報に従って M1 および M2 分化させた THP-1 をトランススウェル上層に調整し、Het-1A を播いた 24 穴プレートに挿入することにより共培養を行い、増殖能の変化と p38 MAP kinase および STAT3 の活性化を比較したところ、p38 MAP kinase のリン酸化と STAT3 のリン酸化を介した増殖活性の有意な上昇が認められた。従って、活性化したマクロファージは液性因子を介して不死化食道扁平上皮由来細胞の増殖を促進することが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

横崎 宏, 仙波秀峰, 【がんと間質】消化管がん間質の特徴, 病理と臨床, 査読有, 32 巻, 2014, 50-56

Kanzawa M, Hara S, Semba S, Yokozaki H, Hirokawa M, Itoh T, Sorting nexin 2 (SNX2): A potential marker of active thyrocytes in normal and hyperfunctioning thyroid disorders, Appl Immunohistochem Mol Morphol, 査読有, 22 巻, 2014, 302-307

DOI: 10.1097/PAI.0b013e31828badd3
Shigeoka M, Urakawa N, Nakamura T,

Nishio M, Watajima T, Kuroda D, Komori T, Kakeji Y, Semba S, Yokozaki H, Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Sci*, 査読有, 104 巻, 2013, 1112-1119
DOI: 10.1111/cas.12188

Kanzawa M, Semba S, Hara S, Itoh T, Yokozaki H, WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells, *Pathobiology*, 査読有, 80 巻, 2013, 235-244
DOI: 10.1159/000346843

Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H, Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells, *Pathobiology*, 査読有, 79 巻, 2012, 290-306
DOI: 10.1159/000337296

Yusra, Semba S, Yokozaki H, Biological significance of tumor budding at the invasive front of human colorectal carcinoma cells, *Int J Oncol*, 査読有, 41 巻, 2012, 201-210
DOI: 10.3892/ijo.2012.1459

Tanaka S, Morita Y, Fujita T, Yokozaki H, Obata D, Fujiwara S, Wakahara C, Masuda A, Sugimoto M, Sanuki T, Yoshida M, Toyonaga T, Kutsumi H, Azuma T, Clinicopathological characteristics of abnormal micro-lesions at the oro-hypopharynx detected by a magnifying narrow band imaging system, *Dig Endosc*, 査読有, 24 巻, 2012, 100-109
DOI: 10.1111/j.1443-1661.2011.01177.x

Hashimoto O, Shimizu K, Semba S, Chiba S, Ku Y, Yokozaki H, Hori Y, Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells, *Pathobiology*, 査読有, 78 巻, 2011, 181-192
DOI: 10.1159/000325538

Watanabe T, Semba S, Yokozaki H, Regulation of PTEN expression by the SWI/SNF chromatin-remodelling protein BRG1 in human colorectal carcinoma cells, *Br J Cancer*, 査読有, 104 巻, 2011, 146-154
DOI: 10.1038/sj.bjc.6606018

[学会発表](計 24 件)

Urakawa N, Takase N, Shigeoka N,

Nishio M, Watajima T, Utsunomiya S, Yashiro M, Hirakawa K, Koma Y, Semba S, Yanagihara K, Suzuki S, Kakeji Y, Yokozaki H, Direct cancer-stromal interaction increases fibroblast proliferation and enhances invasive properties of scirrhous-type gastric carcinoma cells, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Gastric Cancer Research, 2013 年 12 月 16 日~18 日, 東京ベイ舞浜ホテル(浦安市)

西尾真理, 裏川直樹, 高瀬信尚, 重岡 学, 綿島健人, 宇都宮壮顕, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, ヒト末梢血単球由来マクロファージは食道癌細胞株培養上清により腫瘍関連マクロファージとしての形質を獲得する, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日, パシフィコ横浜(横浜市)

狛雄一朗, 西尾真理, 重岡 学, 裏川直樹, 高瀬信尚, 綿島健人, 宇都宮壮顕, 仙波秀峰, 横崎 宏, 食道上皮内マクロファージ密度と上皮増殖性病変分布の相関, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(横浜市)

重岡 学, 宇都宮壮顕, 綿島健人, 高瀬信尚, 西尾真理, 裏川直樹, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, *In vitro*においてマクロファージは食道癌細胞により M2 型へと分化し、IL-11 の発現を上昇させる, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(横浜市)

裏川直樹, 宇都宮壮顕, 綿島健人, 高瀬信尚, 西尾真理, 重岡 学, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, 食道癌における CD204 陽性腫瘍関連マクロファージの臨床病理学的検討, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(横浜市)

裏川直樹, 西尾真理, 高瀬信尚, 重岡 学, 綿島健人, 宇都宮壮顕, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, 食道扁平上皮癌の増殖、進展と腫瘍組織内 CD204 陽性マクロファージの関連, 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月 2 日, パシフィコ横浜(横浜市)

重岡 学, 高瀬信尚, 西尾真理, 裏川直樹, 宇都宮壮顕, 綿島健人, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, ヒト単球系細胞株 THP-1 を用いた食道癌の増殖促進における腫瘍組織内マクロファージの *in vitro* 解析, 第 10 回日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山, 2013 年 8 月 2 日, 六甲山ホテル(神戸市)

裏川直樹, 宇都宮壮顕, 綿島健人, 高瀬信尚, 西尾真理, 重岡 学, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, 食道扁平上皮癌の増殖、進展と腫瘍組織内 CD204 陽性マクロファージの関連, 第 10 回日本病理学会カンフ

アレンス 2013 六甲山, 2013 年 8 月 2 日, 六甲山ホテル (神戸市)
重岡 学, 高瀬信尚, 西尾真理, 裏川直樹, 宇都宮壯顕, 綿島健人, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, 食道扁平上皮癌における CD204 陽性マクロファージの役割, 第 32 回分子病理学研究会吉野シンポジウム, 2013 年 7 月 20 日, 竹林院群芳園 (奈良県吉野町)
神澤真紀, 仙波秀峰, 原 重雄, 伊藤智雄, 横崎 宏, WNT5A による胃癌細胞の上皮・間葉移行と癌幹細胞性獲得調節, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 8 日, さっぽろ芸文館 (札幌市)
綿島健人, 仙波秀峰, 重岡 学, 西尾真理, 裏川直樹, 横崎 宏, 大腸癌先進部における tumor budding とがん幹細胞性の関連についての検討, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 8 日, さっぽろ芸文館 (札幌市)
西尾真理, 裏川直樹, 綿島健人, 重岡 学, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 横崎 宏, ヒト末梢血単球由来マクロファージは食道癌細胞株培養上清により腫瘍関連マクロファージの形質を獲得する, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 7 日, ロイトン札幌 (札幌市)
重岡 学, 西尾真理, 裏川直樹, 綿島健人, 仙波秀峰, 古森孝英, 横崎 宏, ヒト単球系細胞株 THP-1 を用いた食道癌の増殖進展における腫瘍組織内マクロファージの *in vitro* 解析, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 7 日, ロイトン札幌 (札幌市)
横崎 宏, 森田康枝, 藤原もも, 中鉢亜弥, 深澤圭似子, 重岡 学, 西尾真理, 裏川直樹, 綿島健人, 狛雄一朗, 仙波秀峰, 食道上皮内マクロファージ密度と上皮増殖性病変分布の相関, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 7 日, ロイトン札幌 (札幌市)
裏川直樹, 重岡 学, 中村 哲, 西尾真理, 綿島健人, 仙波秀峰, 掛地吉弘, 横崎 宏, 食道扁平上皮癌の増殖・進展と腫瘍組織内 CD204 陽性マクロファージの関連, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 7 日, ロイトン札幌 (札幌市)
横崎 宏, 仙波秀峰, 消化管癌の組織形成・進展における癌・間質相互作用の意義, 第 102 回日本病理学会総会・ワークショップ (招待講演), 2013 年 6 月 6 日, ロイトン札幌 (札幌市)
食道癌の増殖・進展における腫瘍組織内マクロファージの役割, 重岡 学, 西尾真理, 裏川直樹, 綿島健人, 仙波秀峰, 横崎 宏, 第 23 回日本消化器癌発生学会総会, 2012 年 11 月 15 日, ルネッサンスリゾートナルト (鳴門市)
食道癌の増殖・進展における腫瘍組織内マクロファージの役割, 重岡 学, 西尾真理, 裏川直樹, 綿島健人, 仙波秀峰, 横崎 宏,

第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日, ロイトン札幌 (札幌市)
食道癌の増殖・進展における腫瘍組織内マクロファージの役割, 重岡 学, 裏川直樹, 仙波秀峰, 横崎 宏, 第 9 回日本病理学会カンファレンス, 2012 年 8 月 3 日, ホテルニュータナカ (山口市)
食道癌の増殖・進展における腫瘍組織内マクロファージの役割, 重岡 学, 仙波秀峰, 横崎 宏, 第 21 回日本がん転移学会学術集会, 2012 年 7 月 12 日, オリエンタルホテル広島 (広島市)
②1 食道上皮内マクロファージ密度と上皮内増殖性病変分布の相関, 森田康枝, 仙波秀峰, 横崎 宏, 第 101 回日本病理学会学術総会, 2012 年 4 月 28 日, 京王プラザホテル (東京都)
②2 食道癌の増殖・進展における腫瘍組織内マクロファージの役割, 重岡 学, 仙波秀峰, 中村 哲, 黒田大介, 古森孝英, 横崎 宏, 第 101 回日本病理学会学術総会, 2012 年 4 月 26 日, 京王プラザホテル (東京都)
②3 Yokozaki, H Semba S, Role of cancer-stromal interactions in the growth and progression of human alimentary tract cancers, The 21st Hiroshima Cancer Semnar and the 5th Three Universitie's Consortioum International Symposium "Recent Progress in Carcinogenesis, Progression and Management of Upper GI Cancers (招待講演), 2011 年 11 月 6 日, 広島国際会議場 (広島市)
②4 横崎 宏, 重岡 学, 仙波秀峰, 食道癌の増殖・進展に係る腫瘍組織内 M2 マクロファージの役割, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

横崎 宏, 医歯薬出版 (株), 青笹克之・編 解明 病理学 第 2 版 病気のメカニズムを解く 各論第 2 章 消化管, 2013, 848 頁

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横崎 宏 (YOKOZAKI, Hiroshi)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10200891