

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659204

研究課題名(和文)天然化合物によるマクロファージの活性化制御に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new therapeutic strategies for regulating macrophage activation by natural compounds

研究代表者

竹屋 元裕 (Takeya, Motohiro)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90155052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは病巣局所で様々な活性化を受けており、M1マクロファージは肥満や粥状動脈硬化症に関わり、M2活性化を受けた腫瘍随伴マクロファージは腫瘍増殖に促進的に作用している。新規治療法開発のため、天然化合物ライブラリーのスクリーニングによって、マクロファージのM1/M2活性化を制御する新たな化合物を同定した。なかでも、corosolic acidとonionin Aは、STAT3活性化の抑制を介して、マクロファージのM2活性化を抑制し、腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにした。これらの化合物は担癌マウスにおいても腫瘍本体の縮小効果と肺転移の抑制効果を示し、新たながん治療への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are variously activated in disease environment. For example, M1-activated macrophages are involved in obesity and atherosclerosis, whereas M2-activated tumor-associated macrophages promote tumor progression. To develop new therapeutic strategies we identified several compounds that regulate M1- or M2-activation of macrophages by screening the library of natural compounds. Among them, corosolic acid and onionin A suppressed tumor progression by means of suppressing STAT3 activation. These two compounds significantly suppressed subcutaneous tumor development and lung metastasis in a murine sarcoma model. Through these results, application of corosolic acid and onionin A is considered a potential new anticancer therapy targeting macrophage activation.

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 古典的活性化 オルタナティブ活性化 天然化合物 corosolic acid STAT3

## 1. 研究開始当初の背景

(1)マクロファージは、病巣局所において様々な活性化を受け、病態の消長に大きな影響を与えている。近年、マクロファージの活性化経路は二大別され、IFN- $\gamma$  や TLR リガンドなどで活性化をうけた古典的活性化マクロファージ(M1)は炎症惹起性に機能するのに対し、IL-4, IL-10, IL-13などで刺激されたオルタナティブ活性化マクロファージ(M2)は、抗炎症性に作用し、組織修復や線維化に関わる。M1マクロファージは「肥満や粥状動脈硬化症の病態に深く関与し、一方、腫瘍内に浸潤する腫瘍随伴マクロファージ(TAM)はM2マクロファージの性格を有し、腫瘍増殖に都合の良い微小環境を形成することが知られている。

(2)私どもはマクロファージのM1/M2分化について精力的に検討を行い、ヒトグリオーマや卵巣癌ならびに肝内胆管癌では、M2マーカーであるCD163陽性のM2マクロファージの浸潤密度が腫瘍の悪性度や患者予後と正の相関を示すことを明らかにした。M2マクロファージは抗腫瘍免疫を抑制し、血管新生を促進して、腫瘍増殖を促進するものと考えられる。そこで、腫瘍増殖を抑制することを目的として、マクロファージのM2への活性化を抑制する天然化合物として colosolic acid を同定した。

## 2. 研究の目的

マクロファージの活性化の違いは様々な疾患の病態形成や消長と深く関連するため、マクロファージの活性化を制御することによって、疾病の予防や治療に結びつけることが可能であると考えられる。本研究では、天然化合物のスクリーニングによりM1あるいはM2マクロファージの活性化を抑制する化合物を同定し、さらに動物実験で薬理作用を検証し、マクロファージの活性化制御に基づく新規治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1)マクロファージのM1あるいはM2活性化を抑制する天然化合物のスクリーニング  
ヒト単球由来マクロファージおよびヒトマクロファージ細胞株を用い、M2マクロファージのマーカーであるCD163の発現に影響を及ぼす天然化合物を約400種のライブラリーから一次スクリーニングする。CD163の発現を増強する化合物はM1活性化を抑制し、M2活性化を増強する化合物と捉えることができる。一方、CD163の発現を抑制する化合物はM2活性化を抑制し、M1活性化を増強する化合物と捉えることができる。

(2)一次スクリーニングで選択した化合物について二次スクリーニングを行う。二次スクリーニングでは、これらの化合物がヒト単球

由来マクロファージからのサイトカイン産生に及ぼす影響を解析する。具体的には、M1活性化の指標としてIL-6, IL-12産生、M2活性化の指標としてIL-10の産生について定量的解析を行う。

(3)マウス疾患モデルに対する天然化合物の薬理効果の解析

担癌マウスモデルを用いてスクリーニングで得られたM2活性化を抑制する天然化合物の生体内における薬理効果を検定する。

## 4. 研究成果

### (1)天然化合物のスクリーニング

天然化合物ライブラリーのスクリーニングによって、CD163の発現を増強する化合物として、isoquercetinなどの4種の化合物が同定された。これらの化合物は抗炎症性サイトカインであるIL-10の分泌を促進することが明らかとなり、マクロファージのM2活性化を増強し、M1活性化を抑制することがわかった。一方、CD163の発現を抑制する化合物として、これまでに同定した corosolic acid 以外に onionin A ならびに garlicin A を同定した。これらの化合物は、M1マーカーであるIL-12およびIL-6の分泌を促進し、一方でM2マクロファージから産生されるIL-10の分泌を抑制し、M2活性化を抑制することが明らかとなった。

### (2) corosolic acid および onionin A の腫瘍細胞に対する作用

腫瘍細胞の培養上清はマクロファージのM2活性化を誘導するが、corosolic acid を加えることでグリオーマ細胞培養上清によるマクロファージのM2活性化が抑制された。また、corosolic acid は、IL-10やグリオーマ培養上清によるマクロファージの signal transducer and activator of transcription 3(STAT3)の活性化を顕著に抑制し、STAT3の活性化を抑制することによってマクロファージのM2活性化が抑制されるものと考えられた。Onionin A については、ヒト卵巣癌細胞株を用いた検討から、corosolic acid と同様に STAT3 活性化の抑制を示すことが明らかとなり、STAT3 活性化の抑制を介して腫瘍増殖抑制や、マクロファージのM2活性化が抑制されるものと考えられた。抗がん剤による腫瘍増殖抑制作用は、onionin A を併用することで増強されることも明らかとなり、臨床への応用の可能性が期待される。

### (3)担癌マウスに対する corosolic acid および onionin A の作用

マウス骨肉腫のマウス移植腫瘍の検索では、corosolic acid の投与によって皮下移植腫瘍が有意に縮小するとともに肺転移が抑制されることがわかった。その機序として、STAT3の活性化の抑制を介して、M2マクロファージ

や myeloid-derived suppressor cells の活性化が抑制され、抗腫瘍免疫が活性化されることが要因と考えられた。また、onionin A についても移植腫瘍の縮小や肺転移の抑制が観察され、同様の機序によって腫瘍抑制効果を示すものと考えられた。

#### (4)今後の展望

天然化合物ライブラリーをスクリーニングすることで、マクロファージの M1/M2 活性化を制御可能な化合物を同定することができた。とりわけ、バナバ葉やリンゴ果実に含まれる corosolic acid やタマネギからの新規抽出物である onionin A については、M2 活性化の誘導に重要である転写因子 STAT3 の活性化を抑制することで、M2 活性化が抑制されるものと考えられた。担癌マウスを用いた検討から、corosolic acid および onionin A はいずれも移植腫瘍の縮小効果や肺転移の抑制効果を示し、生体内においても抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。これらの化合物は、抗がん剤と併用することで、ヒトの癌治療にも応用可能なことが示され、新しい治療法の開発に発展することが期待される。

#### 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32件)

Fujiwara Y, Takeya M, Komohara Y. A novel strategy for inducing the antitumor effects of triterpenoid compounds: Blocking the protumoral functions of tumor-associated macrophages via STAT3 inhibition. *Biomed Res Int*. 2014, 2014:348539. 査読有

Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*. 2014, 105(1):1-8. 査読有

Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, Komohara Y, Ohnishi K, Oda H, Takenaka S, Matsuoka M, Kawayama T, Takeya M, Hoshino T. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014, 9:e87400. 査読有

Sugihara H, Ishimoto T, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Komohara Y, Takeya M, Baba H. Identification of miR-30e\* regulation of Bmi1 expression mediated by tumor-associated macrophages in gastrointestinal cancer. *PLoS One*. 2013, 8:e81839. 査読有

Fujiwara Y, Takaishi K, Nakao J, Ikeda T, Katabuchi H, Takeya M, Komohara Y.

Corosolic acid enhances the antitumor effects of chemotherapy on epithelial ovarian cancer by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Oncol Lett*. 2013, 6:1619-1623. 査読有

Bai B, Horlad H, Saito Y, Ohnishi K, Fujiwara Y, Takeya M, Komohara Y. Role of Stat3 activation in cell-cell interaction between B-cell lymphoma and macrophages: The in vitro study. *J Clin Exp Hematop*. 2013, 53:127-133. 査読有

Ohnishi K, Komohara Y, Saito Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Takeya M. CD169-positive macrophages in regional lymph nodes are associated with a favorable prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci*. 2013, 104:1237-1244. 査読有

Eguchi K, Fujiwara Y, Hayashida A, Horlad H, Kato H, Rotinsulu H, Losung F, Mangindaan RE, de Voogd NJ, Takeya M, Tsukamoto S. Manzamine A, a marine-derived alkaloid, inhibits accumulation of cholesterol ester in macrophages and suppresses hyperlipidemia and atherosclerosis in vivo. *Bioorg Med Chem*. 2013, 21:3831-3838. 査読有

Komohara Y, Niino D, Saito Y, Ohnishi K, Horlad H, Ohshima K, Takeya M. Clinical significance of CD163+ tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2013, 104:945-951. 査読有

Horlad H, Fujiwara Y, Takemura K, Ohnishi K, Ikeda T, Tsukamoto H, Mizuta H, Nishimura Y, Takeya M, Komohara Y. Corosolic acid impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Mol Nutr Food Res*. 2013, 57:1046-1054. 査読有

Kinoshita H, Matsumura T, Ishii N, Fukuda K, Senokuchi T, Motoshima H, Kondo T, Taketa K, Kawasaki S, Hanatan S, Takeya M, Nishikawa T, Araki E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, 431: 124-130. 査読有

Komohara Y, Horlad H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Bai B, Nakagawa T, Suzu S, Nakamura H, Kuratsu JI, Takeya M. Importance of direct macrophage-tumor cell interaction on progression of human glioma. *Cancer Sci* 2012, 103: 2165-2172. 査読有

Shiraishi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Mizuta H, Takeya M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 425: 304-308. 査読有

Hayashi H, Eguchi Y, Fukuchi-Nakaishi Y, Takeya M, Nakagata N, Tanaka K, Vance JE, Tanihara H. A Potential Neuroprotective Role of Apolipoprotein E-containing Lipoproteins through Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 in Normal Tension Glaucoma. *J Biol Chem*, 2012, 287: 25395-25406. 査読有

Fang J, Greish K, Qin H, Liao L, Nakamura H, Takeya M, Maeda H. HSP32 (HO-1) inhibitor, copoly(styrene-maleic acid)-zinc protoporphyrin IX, a water-soluble micelle as anticancer agent: In vitro and in vivo anticancer effect. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81: 540-547. 査読有

Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Horlad H, Ikeda T, Nohara T, Takeya M, Nagai R. Tomatidine, a tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *J Agric Food Chem*, 2012, 60,2472-2479. 査読有

Matsubara J, Sugamura K, Nakamura T, Fujiwara Y, Akiyama E, Kurokawa H, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Maeda H, Izumiya Y, Kaikita K, Sumida H, Jinnouchi H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Takeya M, Ogawa H. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein-E deficient mice. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59: 265-276. 査読有

Komohara Y, Horlad H, Ohnishi K, Ohta K, Makino K, Hondo H, Yamanaka R, Kajiwara K, Saito T, Kuratsu J, Takeya M. M2 macrophage/microglial cells induce activation of Stat3 in primary central nervous system lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol*, 2011, 51:93-99. 査読有

El-Aasr M, Fujiwara Y, Takeya M, Ono M, Nakano D, Okawa M, Kinjo J, Ikeda T, Miyashita H, Yoshimitsu H, Nohara T. Garlicnin A from the fraction regulating macrophage activation of *Allium sativum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2011, 59:1340-1343. 査読有

Fujiwara Y, Komohara Y, Kudo R, Tsurushima K, Ohnishi K, Ikeda T, Takeya M.

Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep* 2011, 26:1533-1537. 査読有

②①Ohnishi K, Komohara Y, Fujiwara Y, Takemura K, Lei X, Nakagawa T, Sakashita N, Takeya M. Suppression of TLR4-mediated inflammatory response by macrophage class A scavenger receptor (CD204). *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 411:516-522. 査読有

②②Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, Takeya M. Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2011, 102:1424-1431. 査読有

②③Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, Sakashita N, Takeya M, Tsukamoto S, Ikeda T. Triterpenoids isolated from *Zizyphus jujuba* inhibit foam cell formation in macrophages. *J Agric Food Chem* 2011, 59:4544-4552. 査読有

②④Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Mera K, Sakashita N, Takeya M, Ikeda T, Araki T, Nohara T, Nagai R. Natural compounds containing a catechol group enhance the formation of N-(carboxymethyl)lysine of the Maillard reaction. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50:883-891. 査読有

②⑤Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M. Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3 and NF- $\kappa$ B in tumor cells and tumor-associated macrophages. *Cancer Sci* 2011, 102: 206-211. 査読有

②⑥菰原義弘、新野大介、大島孝一、竹屋元裕 ATLにおけるCD163陽性マクロファージの重要性 血液内科 2014 68巻 36-40. 査読無

②⑦菰原義弘、竹屋元裕 がん間質におけるマクロファージ:腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の役割とそのマーカー 病理と臨床 2014 32巻 17-23. 査読無

②⑧藤原章雄、池田剛、竹屋元裕、菰原義弘 リンゴやバナナ葉に含まれるコロソリン酸 (Corosolic acid) の新規機能性:マクロファージ活性化制御作用による癌予防効果と癌治療への応用の可能性 *New Food Industry* 2014 56巻 13-19. 査読無

②⑨菰原義弘、竹屋元裕 がんマクロファージ: Tumor-associated macrophage (TAM)について 特集「“多才”なマクロファージと疾患との関わり」(監修 竹田 潔)細胞工学 2012 31巻 1242-1247. 査読無

③⑩竹屋元裕 CCL2 サイトカインのすべて(完全改訂版) 臨床免疫・アレルギー科 2012 57 巻 349-357. 査読無

③⑪藤原章雄、菰原義弘、池田 剛、竹屋元裕 マクロファージの活性化制御による生活習慣病治療戦略 日本体質医学会雑誌 2011 73 巻 67-71. 査読無

③⑫竹屋元裕 スカベンジャー受容体と動脈硬化 特集「新しいマクロファージ」The Lipid 2011 22 巻 188-196. 査読無

[学会発表](計22件)

Yoshihiro Komohara et al. Clinical significance of CD163+ tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. The 12th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop 2014, January 24-26, 2014 (Nagoya, Japan)

Yoshihiro Komohara et al. Clinical significance of CD163-positive tumor-associated macrophages in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Feb 19-24, 2013 (Keystone Resort, Keystone, CO, USA)

Yoshihiro Komohara et al. Clinical significance of CD163-positive tumor-associated macrophages in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). 21<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, May20-21, 2013 (Tokyo, Japan, Toshi Center Hotel)

Yoshihiro Komohara et al. Alternatively activated (M2) macrophages induce activation of Stat3 in primary central nervous system lymphoma. The 11th Korean-Japanese lymphoreticular workshop, January 27-29, 2012 (Seoul, Korea, Seoul University)

Yoshihiro Komohara et al. The significance of anti-inflammatory (M2) macrophages in clear cell renal cell carcinoma. 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, May 25-27, 2011 (Osaka, Japan, ANA Gate Tower Hotel)

竹屋元裕 宿題報告2 マクロファージの活性化と病態 第103回日本病理学会総会 平成26年4月24-26日(広島、広島国際会議場)

菰原義弘 他 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるCD163陽性マクロファージの重要性 第103回日本病理学会総会 平成26年4月24-26日(広島、広島国際会議場)

菰原義弘 ヒト悪性腫瘍における腫瘍随伴マクロファージに関する病理学的解析とその役

割について 学術研究賞受賞(A演説)第59回日本病理学会秋期特別総会 平成25年11月21-22日(甲府、甲府富士屋ホテル)

菰原義弘 他 免疫抑制性ミエロイド細胞を制御する化合物の探索とコロソリン酸の抗腫瘍効果. 第72回日本癌学会学術総会 平成25年10月3-5日(横浜、パシフィコ横浜)

菰原義弘 他 免疫抑制性ミエロイド細胞を制御する化合物の探索 第17回日本がん免疫学会総会 平成25年7月3-5日(山口、ANAクラウンプラザホテル宇部)

竹屋元裕 「組織としてのがん-細胞相互作用からがんの発生、進展、転移を考える」レクチャー3「腫瘍関連マクロファージの役割とその制御」第10回日本病理学会カンファレンス2013六甲山 平成25年8月2-3日(神戸、六甲山ホテル)

菰原義弘 他 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるCD163陽性マクロファージの重要性 第10回日本病理学会カンファレンス2013六甲山 平成25年8月2-3日(神戸、六甲山ホテル)

菰原義弘 他 大腸癌における抗腫瘍免疫と所属リンパ節のCD169陽性マクロファージの関連性. 第23回日本樹状細胞研究会 平成25年5月16-18日(京都、国立京都国際会館)

菰原義弘 他 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるCD163陽性マクロファージの重要性. 第53回日本リンパ網内系学会総会 平成25年5月16-18日(京都、国立京都国際会館) 優秀演題賞受賞

竹屋元裕 病理学入門シリーズ2 炎症・免疫病理学 「マクロファージの活性化と病態-マクロファージの免疫染色から見えてきたこと-」第101回日本病理学会総会 平成24年4月26-28日(東京、京王プラザホテル)

竹屋元裕 シンポジウム 「様々な病態レギュレーターとしてのマクロファージ」オルタナティブ活性化マクロファージのマーカ-とその機能 第52回日本リンパ網内系学会総会 平成24年6月14-16日(福島、福島ビューホテル)

菰原義弘 シンポジウム 「様々な病態レギュレーターとしてのマクロファージ」さまざまな悪性腫瘍における腫瘍関連マクロファージの分化・活性化状態と病態への関与 第52回日本リンパ網内系学会総会 平成24年6月14-16日(福島、福島ビューホテル)

菰原義弘 他 子宮内膜症の発生・進展における腹腔マクロファージの役割 第101回日本病理学会総会 平成24年4月26-28日(東京、京王プラザホテル)

竹屋元裕 特別講演 病態形成におけるマクロファージの役割 日本皮膚科学会 第206回熊本地方会(熊本、ホテルニュースカイ) 平成24年2月26日

竹屋元裕 教育講演 単球・マクロファージの増殖・分化 第9回骨髄病理研究会(川崎医科大学、倉敷)平成23年9月4日

②①竹屋元裕 教育講演 単球・マクロファージ系のマーカーと診断への応用 第9回骨髄病理研究会(川崎医科大学、倉敷)平成23年9月4日

②②菰原義弘 他 ヒト腫瘍組織におけるM2マクロファージの役割-Stat3に注目した腫瘍細胞との細胞間相互作用について 第51回日本リンパ網内系学会(福岡、福岡国際会議場)平成23年7月1-2日

[その他]

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/depd/patho2/patho2.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹屋 元裕 (TAKEYA MOTOHIRO)  
熊本大学・生命科学研究部・教授  
研究者番号：90155052

### (2)研究分担者

坂下 直実 (SAKASHITA NAOMI)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：90284752  
菰原義弘 (KOMOYAMA YOSHIHIRO)  
熊本大学・生命科学研究部・講師  
研究者番号：40449921

### (3)連携研究者

藤原 章雄 (FUJIWARA YUKIO)  
熊本大学・生命科学研究部・助教  
研究者番号：70452886