

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 10日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701078

研究課題名（和文）

腫瘍細胞死に伴う、腫瘍随伴マクロファージ集積機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of tumor-associated macrophage accumulation mechanism accompanying tumor cell death

研究代表者

西躰 元 (NISHITAI GEN)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：60509941

研究成果の概要（和文）：

悪性腫瘍は免疫系からの攻撃を免れているが、その免疫抑制状態の維持に、腫瘍に随伴するマクロファージが関与していることが近年報告されている。我々は、腫瘍細胞死誘導に伴い、免疫抑制性マクロファージの腫瘍への集積が見られることを見出した。次に集積するマクロファージが産生する白血球走化性因子である S100A9 を、我々が作製したモノクローナル抗体を用いて阻害することで、マクロファージの腫瘍増殖促進機能を抑えることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Malignant tumors arise even in an immunocompetent host by outmaneuvering immune recognition. Accumulating evidence has suggested that tumor-associated macrophages (TAMs) play a key role in tumor growth. In the previous study, we revealed that TAMs were infiltrated to tumors in response to tumor cell death. To block the protumor function of TAMs, we established anti-S100A9 monoclonal antibody and revealed that tumor growth was suppressed by administrating anti-S100A9 monoclonal antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

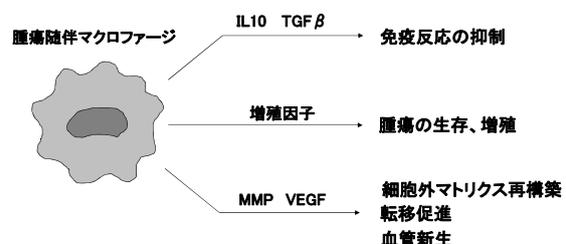
キーワード：細胞免疫、マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

#### （1）悪性腫瘍に対する免疫抑制

癌細胞は正常細胞由来であるが、その悪性化の過程で、癌抗原の異常発現などの正常細胞とは異なる性質を獲得する。そのため多くの場合、「異常な自己」として免疫系に認識され、排除される。その一方で、悪性腫瘍は免疫系からの攻撃を免れており、これが癌化学療法や癌免疫細胞療法の効果を限定している一因であると考えられる。この悪性腫瘍

図1 腫瘍の増殖を助ける腫瘍随伴マクロファージ



に対する免疫抑制メカニズムの一つとして、腫瘍組織に浸潤し、腫瘍組織全体の 5-10%の割合を占めるマクロファージの関与が近年

提唱されている（図1）。しかしながら宿主由来のマクロファージが、なぜ腫瘍に集積し、異物であるはずの腫瘍の増殖を逆に助ける性質を持つに至るのかは全くわかっていない。

(2) マクロファージの死細胞貪食による免疫抑制誘導

研究代表者の所属する免疫制御学研究室は、これまでにマクロファージが死細胞を選択的に認識し貪食する分子機構について研究を行ってきた。詳細な解析の結果、①マクロファージが自己の死細胞貪食を介して、免疫抑制性のサイトカインを産生すること、②マクロファージによる自己死細胞の貪食によって、自己抗原特異的 T 細胞に deletion あるいは anergy が誘導されることを明らかにした。(Science 2004; 304: 1147-50, J. Exp. Med. 2004; 200: 459-67, J. Clin. Invest. 2007; 117: 2268-78, J. Immunol. 2009; 182: 4127-36)。これらの知見は、マクロファージが死細胞を貪食することにより、強力な免疫抑制状態を誘導することを意味している。

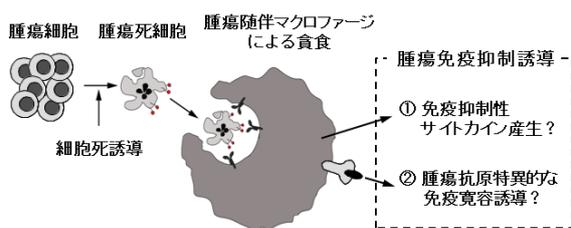
(3) 本研究に至る研究背景

①マクロファージによる死細胞貪食が、免疫抑制状態を誘導すること。

② 腫瘍が無秩序に増殖する過程において、一部の腫瘍細胞が栄養枯渇や酸欠などにより細胞死を起こしていること。

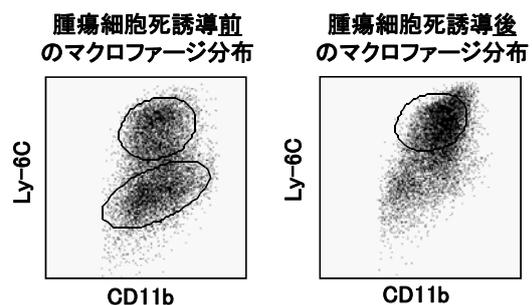
以上の2点を基に、腫瘍のマクロファージが腫瘍死細胞を貪食し、免疫抑制性サイトカインの産生や、腫瘍抗原特異的な免疫寛容誘導

図2 腫瘍細胞死に伴う腫瘍免疫抑制誘導仮説



などを介して、腫瘍に対する免疫抑制状態を誘導する可能性を考えた（図2）。この可能性を検証するため、我々は *in vivo* において腫瘍細胞死に伴う、腫瘍随伴マクロファージの変化を検討した。そのために、*in vivo* において腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系を構築し（詳細は研究方法に記載）、腫瘍細胞死誘導前後の腫瘍随伴マクロファージを単離した。その結果、腫瘍細胞死誘導に伴い Ly-6C 強陽性のマクロファージの著しい集積を認めた（図3）。さらに Ly-6C 強陽性マクロファージの性質を調べたところ、免疫抑制性マクロファージのマーカー遺伝子として知られる Ym1 遺伝子の高発現を認めた。これらの結果から、腫瘍細胞死に伴い、腫瘍へ免疫抑制性マクロファージが集積することが示唆された。次にこのマクロファージ集積のメカニズムを明らかにするため、Ly-6C 強陽性マクロファージをセルソーティングにより単離し、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を調べた。その結果、白血球走化性因子として知られる S100A8、S100A9 遺伝子の高発現を認めた。

図3 腫瘍細胞死に伴う腫瘍随伴マクロファージの変化



2. 研究の目的

以上の結果を基に、本研究においてまず (1) 腫瘍細胞死に伴う、腫瘍への免疫抑制性マクロファージ集積の分子メカニズムを解明する。(2) 次に集積した免疫抑制性マ

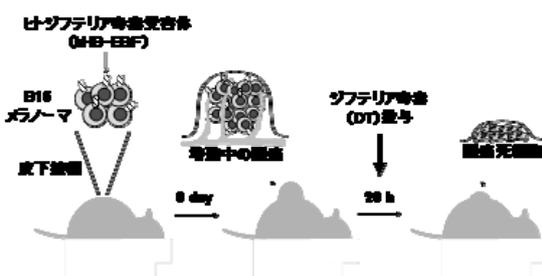
クロファージを単離し、免疫抑制機能を詳細に解析する。(3)最後に免疫抑制性マクロファージの集積を抑えることで、腫瘍増殖を抑えることが可能かどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

*In vivo*において腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系の確立

ジフテリア毒素 (DT) はヒトの HB-EGF (hHB-EGF)に特異的に結合して細胞死を誘導する一方で、マウス HB-EGF には結合しない。この性質を利用して、まず hHB-EGF を恒常的に発現させたマウス腫瘍細胞株 B16 メラノーマを作製した。次にこの細胞株をマウスに接種して腫瘍を作らせた後、DT を投与することで、マウスの免疫細胞に傷害を与えることな

図1 *In Vivo*で腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系



く、腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系を確立した(図1)。この実験系より得られた知見を基に、以下の項目を検討した。

(1) S100A8、S100A9 機能阻害モノクローナル抗体の作製

ハイブリドーマ培養上清を用い、ELISA 法により、S100A8、S100A9 タンパクに対し高親和性の抗体を産生するハイブリドーマを選別した。次にハイブリドーマを大量培養し、上清より抗体を精製し、リコンビナント S100A8 あるいは S100A9 タンパクとの免疫沈降を行うことで、精製抗体の各タンパクへの結合を確認した。

(2) *In vivo*における S100A8、S100A9 機能阻害による、マクロファージ集積抑制の検討

*In vivo*における腫瘍細胞死誘導時、抗 S100A8、S100A9 抗体を投与することで Ly-6C 強陽性マクロファージの集積が阻害されるかを検討した。

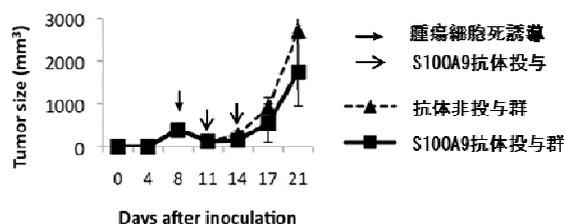
(3) マクロファージ集積と腫瘍増殖との関係の解明

得られた S100A8、S100A9 抗体を腫瘍接種時から投与し続けることにより、腫瘍増殖が抑制されるか否かを検討した。

### 4. 研究成果

*In vivo*において S100A8、S100A9 の機能を阻害し、腫瘍へのマクロファージの集積を阻害することを目的として、S100A8、S100A9 に対するモノクローナル抗体の作製を行った。培養上清を用いた ELISA スクリーニングにより高活性が認められた S100A8 抗体産生ハイブリドーマ 7 クローン、S100A9 抗体産生ハイブリドーマ 2 クローンについて、大量培養、抗体精製および精製後の抗体の各タンパクへの結合活性を検討した。その結果、精製後も活性を保持し、かつ大量精製可能な抗体を産生するハイブリドーマが S100A8、S100A9 各 2 クローン得られた。次に得られた抗体を担癌マウスに投与することで、マクロファージの腫瘍への集積が阻害され、腫瘍の増殖や腫瘍細胞死誘導後の再増殖が抑制されるかどうかを検討した。その結果 S100A9 の 2 クローン中 1 クローン由来の抗体が、腫瘍細胞死誘導後の再増殖を抑制することを見出した(図1)。以上のことから腫瘍増殖時 S100A9

図1 S100A9抗体による腫瘍増殖抑制効果



によって腫瘍随伴マクロファージが誘引され、マクロファージが腫瘍増殖を助けている可能性が示唆された。S100A9 抗体によるマクロファージの集積阻害、および腫瘍増殖抑制効果を利用することにより、S100A9 抗体のがん治療薬への応用が期待できる。

#### 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)

該当無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西躰 元 (NISHITAI GEN)

東京薬科大学・生命科学部・免疫制御学研究室・助教

研究者番号：60509941