

## 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5月31日現在

機関番号：17401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790407  
 研究課題名（和文） がん細胞とマクロファージの細胞間相互作用に注目した新規予後予測因子の探索  
 研究課題名（英文） The significance of cell-cell interaction between macrophages and cancer cells in tumor development  
 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・講師  
 研究者番号：40449921

## 研究成果の概要（和文）：

腫瘍組織に浸潤するマクロファージは Tumor-associated macrophage (TAM) と呼称される。一般的に TAM は M2 マクロファージに偏倚し、血管新生を誘導するとともに腫瘍免疫を抑制することによって、腫瘍増殖をサポートしていると考えられる。本研究では、グリオーマ組織と成人 T 細胞白血病組織における TAM を解析し、双方の腫瘍組織内には多数の TAM が存在していることを明らかにした。特に CD163 陽性の M2TAM が多い症例ほど予後が悪いという観察結果が得られた。培養実験から、マクロファージ由来の C5a、TNF- $\alpha$ 、GRO- $\alpha$ 、IL-6、I-309 などが腫瘍細胞の活性化を誘導することが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the significance of tumor-associated macrophages (TAM) in human malignant tumors including glioma and adult T cell lymphoma/leukemia (ATLL). As the result of immunostaining, many TAMs were detected in tumor tissues and high number of CD163-positive TAMs was well associated to worse clinical prognosis in glioma and ATLL. By means of in vitro coculture study, we found glioma cells and ATLL cells were significantly activated by coculture with M2 macrophages. Direct cell-cell contact was important in tumor cell activation. Direct contact with tumor cells induced significant macrophage activation and which in turn soluble factors from macrophages stimulated tumor cells. Soluble factors such as C5a, TNF- $\alpha$ , GRO- $\alpha$ , IL-6, I-309 were secreted from activated macrophages. In glioma, membrane type M-CSF on tumor cell surface could stimulate macrophage activation strongly. In ATLL, detail mechanisms have never been uncovered but CD163 is considered to be involved in cell-cell interaction.

## 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：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：分子病理

## 1. 研究開始当初の背景

日本では毎年がんで死亡する人は約 32 万人に上り、がんの病態解明は医学研究の重要

なテーマである。がんの組織中にはがん細胞だけでなく線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球、マクロファージなどの正常細胞が多数

浸潤していることは以前から知られていた。10 年程前からがん組織中のマクロファージ（腫瘍関連マクロファージ）にも注目が集まり、多くの研究がなされている。前立腺癌、乳癌、腎癌、濾胞性リンパ腫等では、マクロファージの浸潤が高度な症例ほど患者の生存率が低いことが以前から明らかになっている。近年の遺伝子改変マウスを使った研究から、がん浸潤したマクロファージががんの微小環境における免疫抑制や血管新生を誘導し、がんの発達を促していることが示され、この過程に関わるサイトカインやシグナル伝達分子も徐々に明らかになってきた。

近年、マクロファージの分子生物学に関する研究も著しく発展し、マクロファージが有する様々な役割・機能が明らかになっている。また、マクロファージの活性化・分化状態には大きく 2 種類に分類されることも分かってきた。炎症を促進させる炎症性マクロファージと、炎症を抑制し免疫抑制や血管新生に深く関与する抗炎症性マクロファージであり、それぞれ M1 と M2 と呼称されている。マクロファージの M2 への分化には転写因子である NF- $\kappa$ B が重要な役割をしていることが 2008 年に初めて明らかとなり、また、我々の最近の研究で Stat3 も M2 への分化に関わっていることが明らかとなった。このように、マクロファージの分化を制御するメカニズムが徐々に解明されつつあり、がんの病態解明や新しい治療など今後の発展が期待できる分野として多くの研究者が腫瘍関連マクロファージに注目している。

## 2. 研究の目的

我々の教室では、ヒトのマクロファージを認識する抗体を多数有しており、中でも CD163 に対する抗体がマクロファージの中でも特に免疫抑制性サイトカインを多量に産生する免疫抑制性(M2)マクロファージを特異的に認識することをヒトの病理標本を使用して明らかにした。その後、ヒトがん組織内に浸潤した M2 マクロファージを解析したところ、M2 マクロファージが多い症例では、がん（特にグリオーマ、卵巣癌、悪性リンパ腫、肝内胆管癌、腎癌）の悪性度が高く、特にグリオーマ、悪性リンパ腫（AITL）、腎癌では生存率も有意に低いことが明らかとなった。膵癌、悪性黒色腫、濾胞性リンパ腫、平滑筋肉腫でも同様の観察結果が国内外の研究者から報告された。

次に我々は、腫瘍内微小環境におけるマクロファージの役割を明らかにするために、がん細胞（本研究では腎癌細胞、グリオーマ細

胞、卵巣癌細胞を使用）とマクロファージの共培養実験を行い、マクロファージの存在下でがん細胞における Stat3 が強く活性化するという現象を見いだした。Stat3 はがんの増殖や免疫抑制や血管新生に深く関わる因子であり、興味深いことにこの現象はがん細胞とマクロファージが直接接着したときに特に強く認められた。共培養の培養上清中には IL-10 や TGF- $\beta$ などのマクロファージ由来のサイトカインが多量に含まれていた。がん細胞表面に露出している何らかの抗原がマクロファージの何らかの受容体に結合し、マクロファージを活性化させサイトカイン産生を誘導することで、最終的にがん細胞の活性化に至ると考えている。

本研究の目的は、この細胞間相互作用に関わるリガンド-受容体を明らかにすることである。また、病理組織検体（腎細胞癌、グリオーマ、卵巣癌等）を用いて、リガンド/受容体の発現を解析し、組織学的悪性度や臨床予後との相関性を検討する。同定されたリガンド/受容体は、新規の予後予測因子・バイオマーカーや分子標的療法の標的分子として今後の発展が期待される。

## 3. 研究の方法

がん細胞とマクロファージの細胞間相互作用に関わる因子は未だに未解明であるが、これまでの文献的考察や preliminary な実験結果を踏まえるといくつかの候補があげられる。まずは、その候補分子についての解析を行う。具体的には、共培養実験を行う際に阻害抗体や siRNA を用いることでリガンド-受容体反応を阻害し、共培養におけるがん細胞の活性化が抑制されるかどうかを検討する。受容体型チロシンキナーゼに関してもアレイキットを用いて網羅的な解析を行う。このようにして同定されたリガンドや受容体のがん組織における発現を主に免疫組織化学的手法を用いて解析し、がんの悪性度や臨床病理学的因子、臨床予後（全生存期間、無再発生存期間）との相関性を検討する。がん細胞や病理検体は、腎癌、脳腫瘍（グリオーマ）、卵巣癌を使用する予定であるが、余裕があればその他の癌腫でも検討を行う。血清学的診断に応用できる可能性がある場合は、実際の患者さんの血清を用いて研究を遂行する。

## 4. 研究成果

研究 1：以前、グリオーマ（脳腫瘍、悪性度の高いがん）で悪性度が高い症例では組織中に CD163 陽性（M2）タイプのマクロファージ

が増加していることを発表していたが、その続編である。なぜ、M2 マクロファージが多いと悪性度が高いのか、培養実験での解析を行った。その結果、がん細胞は M2 マクロファージと一緒に培養することで、増殖活性が上がり、Stat3 という治療抵抗性や免疫抑制に関わるシグナル分子が強く活性化した。がん細胞表面の膜型 M-CSF によってマクロファージが強く活性化し、活性化マクロファージから産生された増殖因子によってがん細胞が活性化するというメカニズムである。しかし、この分子を介したメカニズムだけでは、この現象をすべて解決できず、他の分子を介した複雑なメカニズムがあるのかもしれない。

研究 2：以前、マクロファージの M2 タイプへの分化を抑える薬として Corosoloc acid (CA, コロソリン酸) を同定したが、その続編。CA を使用して悪玉 (M2) マクロファージを抑制すれば、通常のがん治療の効果を増強させることができるのでは？との仮説で、動物実験を行った。マウスの皮下に、同じ種類の別のマウス由来のがん細胞を注射すると、皮下でがんが少しずつ大きくなり、4 週間後には肺転移で死に至る。このモデルで、CA 投与でがんへの効果を検討した。すると CA 投与群ではコントロール群に比べて、3 週間後の皮下腫瘍の大きさが小さく、さらに肺転移がかなり抑制されていた。面白いことに、CA のマクロファージに対する作用は弱く、むしろ CA は抑制性ミエロイド細胞 (MDSC) を制御することで抗腫瘍免疫を活性化させ、間接的に抗がん作用を発揮していた。ある種のがんでは CA が直接がん細胞の増殖を抑制するので、がんに対しては直接的効果と間接的な効果が期待できると思われる。

研究 3：

グリオーマ組織と成人 T 細胞白血病組織における TAM を解析し、双方の腫瘍組織内には多数の TAM が存在していることを明らかにした。特に CD163 陽性の M2TAM が多い症例ほど予後が悪いという観察結果が得られた。更に、培養実験では、グリオーマ細胞とリンパ腫細胞はマクロファージと共培養することで強い活性化が誘導された。特に腫瘍細胞の活性化には腫瘍細胞がマクロファージと直接接着することが重要であった。グリオーマの場合は腫瘍細胞に発現する膜型 M-CSF がマクロファージの CD115 (M-CSFR) を強く刺激することで、マクロファージが活性化させ、活性化マクロファージから誘導されるサイトカインが腫瘍細胞を活性化させるというメカニ

ズムであった。リンパ腫細胞を用いた検討では、マクロファージ由来の C5a、TNF- $\alpha$ 、GRO- $\alpha$ 、IL-6、I-309 などが腫瘍細胞の活性化を誘導することが明らかとなった。

#### 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 3 件)

- ① Komohara Y, Horlad H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Bai B, Nakagawa T, Suzu S, Nakamura H, Kuratsu J, Takeya M. Importance of direct macrophage-tumor cell interaction on progression of human glioma. **Cancer Sci** 2012;103:2165-2172. 査読有り
- ② 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** (In press) \*\*: corresponding author. 査読有り
- ③ Itoh F, Komohara Y(\*,\*\*), Takaishi K, Honda R, Tashiro H, Kyo S, Katabuchi H, Takeya M. Possible involvement of Stat3 in cell-cell interaction between peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis. **Fertil Steril** (in press) \* : Equal contributor. \*\*: corresponding author. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 菰原義弘、伊藤史子、大西紘二、藤原章雄、竹屋元裕  
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)
- ② Yoshihiro Komohara, Koji Ohnishi, Motohiro Takeya  
Alternatively activated (M2) macrophages induce activation of Stat3 in primary central nervous system lymphoma  
The 11<sup>th</sup> Korean-Japanese lymphoreticular workshop 2012/1/27-29 (Seoul, Korea)
- ③ 菰原義弘、Horlad Hasita、大西紘二、藤原章雄、竹屋元裕  
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 平成 23 年  
7 月 1-2 日 (福岡、福岡国際会議場)

[その他]

ホームページ

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/patho2/pages/komohara.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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・講師  
研究者番号：40449921

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：