

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790353

研究課題名(和文)大腸癌におけるCD169陽性マクロファージの病理学的意義の解明

研究課題名(英文)Pathological significans of CD169-positive macrophages in colorectal cancer patients

研究代表者

大西 紘二(Ohnishi, Koji)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：40613378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マクロファージマーカーの一つであるCD169について、ヒトでの抗腫瘍免疫に着目して解析を行った。83例の大腸癌を対象として、所属リンパ節のCD169陽性マクロファージと臨床病理学的因子との相関について免疫組織学的に解析した。その結果、CD169陽性マクロファージが多い症例では少ない症例と比較して、有意に生存率が高いことを明らかにした。また、リンパ節のCD169陽性細胞数とCD8陽性Tリンパ球の腫瘍組織内浸潤数は正の相関を示していた。即ち、リンパ節のCD169陽性マクロファージは抗腫瘍免疫を活性化している可能性が示唆され、大腸癌の予後マーカーとして有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previous CD169 studies were mainly performed with rodents; only a few studies described CD169 expression in humans. In this study, to examine the role of CD169 in human diseases, we focused on CD169+ sinus macrophages in regional lymph nodes (RLNs) of patients with colorectal carcinoma (CRC). We examined the expression of CD169 in regional lymph nodes (RLNs) and their relations with overall survival in CRC. In a clinicopathological analysis on 83 CRC patients, paraffin-embedded specimens were evaluated for CD169 expression of RLN macrophages by immunohistochemistry. We found a high density of CD169+ macrophages was significantly associated with longer overall survival. We also found that the density of CD169+ macrophages had a positive correlation with the number of CD8+ cytotoxic T cells infiltrating tumor tissues. These data suggest that CD169+ macrophages in RLNs promote CD8+ T-cell-mediated anti-tumor immunity and are associated with a better prognosis for CRC patients.

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：CD169 マクロファージ リンパ節 大腸癌 腫瘍免疫 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 所属リンパ節マクロファージと腫瘍免疫

癌の所属リンパ節には多数のリンパ球や抗原提示細胞が存在し、リンパ管を通じて流入した腫瘍抗原を認識して、抗原特異的な抗腫瘍免疫反応を誘導している。リンパ節の辺縁洞には多数のマクロファージが存在しており、抗原の取り込みとリンパ球への抗原提示を行っていると考えられている。しかし、抗腫瘍免疫能を反映するマクロファージの分子マーカーは不明のままであった。

(2) CD169 陽性マクロファージと腫瘍免疫

CD169(sialoadhesin, Siglec 1)はシアル酸含有分子との結合能をもつ膜タンパクであり、リンパ節マクロファージなどに発現がみられる。近年、ノックアウトマウスを用いた解析により CD169 が炎症促進作用をもち、さらに抗原特異的な腫瘍免疫の成立にも主体的に関わることが明らかにされた。即ち、CD169 はリンパ節マクロファージの抗腫瘍免疫能を反映する分子マーカーになりうる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌の所属リンパ節を対象として、リンパ球活性化作用を有する炎症性マクロファージに特異的な分子マーカーとして CD169 が有用であるかどうか検討を行い、大腸癌の予後マーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

まずは、炎症性マクロファージや抗炎症性マクロファージなどの様々な亜型における CD169 発現を検討し、どのようなマクロファージ亜型に CD169 の発現が増加するのか検討を行う。

次に大腸癌の所属リンパ節を対象として、リンパ節マクロファージにおける CD169 と大腸癌症例の予後ならびに臨床病理学的因子との相関を解析して、リンパ節の CD169 発現が予後を反映する分子マーカーとして有用かどうかを検討する。

研究の背景で述べたとおり、リンパ節のマクロファージは腫瘍抗原をリンパ球に抗原提示し、リンパ球を活性化していると考えられている。特に CD8 陽性 T リンパ球は、直接的に腫瘍細胞を傷害し、抗腫瘍免疫に主体的に関わる細胞であるため、CD169 陽性マクロファージと CD8 陽性 T リンパ球との関係に着目して、腫瘍免疫の解析を行いたい。

3. 研究の方法

(1) ヒトマクロファージにおける CD169 の発現制御機構の解明

ヒト末梢血由来マクロファージを炎症性サイトカインである interferon (IFN)- α 、 β 、 γ や LPS、あるいは抗炎症性サイトカインである interleukin (IL)-4、10 で分化させた時の CD169 発現の変化を検討した。また、炎症性疾患や腫瘍などの様々な病態にお

ける組織マクロファージにおける CD169 発現を免疫組織化学法で検討した。

(2) 所属リンパ節における CD169 発現と大腸癌症例の臨床病理学的因子との相関分析

所属リンパ節のマクロファージを対象として CD169 と汎マクロファージマーカーである CD68 の免疫染色を行い、CD169 陽性細胞数と陽性率の定量的評価を行った。これらのデータと大腸癌症例の術後生存率、臨床進行期や転移・再発の有無、脈管侵襲などの臨床病理学的因子との相関分析を行った。

(3) 所属リンパ節における CD169 発現と CD8 陽性細胞の腫瘍組織内浸潤との相関分析

リンパ節での CD169 陽性マクロファージが多い症例で有意に予後良好である場合、CD169 陽性マクロファージが抗腫瘍免疫を活性化している可能性が考えられる。抗腫瘍免疫に関わる CD8 陽性 T リンパ球の浸潤を定量的に評価し、CD169 陽性細胞数との相関性を解析した。

4. 研究成果

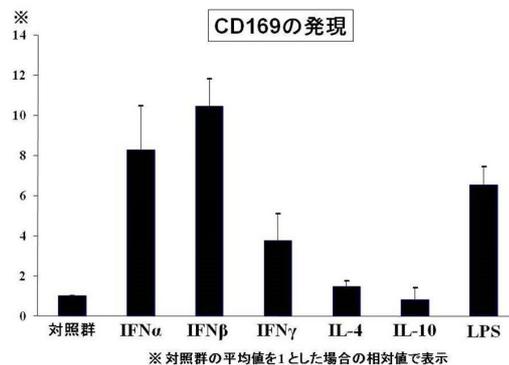
(1) 1 型 IFN で刺激した炎症性マクロファージで CD169 の発現が増加した

ヒト末梢血由来マクロファージを様々なサイトカインで分化させた場合の CD169 発現を cell-ELISA 法、Western blotting 法、細胞免疫組織化学法で解析した。いずれの方法でも 1 型 IFN である IFN- α 、IFN- β で分化させた炎症性マクロファージに特異的に CD169 発現が強く誘導された。対して、IL-4、IL-10 で分化させた抗炎症性マクロファージでは、CD169 発現は誘導されなかった (図 1)。

ヒト組織を対象とした免疫染色では、細菌性肺炎や腸管憩室炎などの炎症病変で出現する滲出性マクロファージは CD169 陽性であったのに対し、抗炎症性(M2)マクロファージとして知られる腫瘍内マクロファージは CD169 が陰性であった。

以上の結果より、CD169 は、特に 1 型 IFN で分化させた炎症性マクロファージを特異的に認識する分子マーカーとして有用であると考えられた。

図1 各種サイトカイン刺激によるCD169発現の誘導



(2) リンパ節のCD169陽性マクロファージが少ない症例ではリンパ節転移が多い傾向にあった

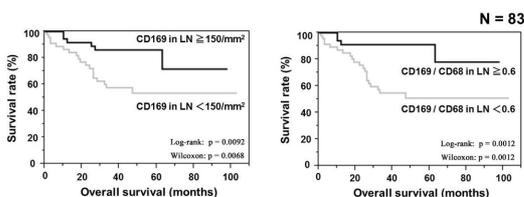
83 症例の大腸癌の所属リンパ節マクロファージを対象として、CD169 と CD68 の免疫染色を施行した。所属リンパ節は全て第 1 群リンパ節（例えば直腸癌であれば、No.251）を対象とした。洞マクロファージの数は症例間の差があまり見られなかったのに対し、洞マクロファージにおける CD169 発現は症例毎に大きく異なっていた。

CD169 陽性細胞数を定量的に評価し、中央値である 150 個/mm² を基準として、CD169 高発現群と CD169 低発現群に分類して、臨床病理学的因子の比較検討を行った。年齢や性別、臨床進行期については CD169 との相関性は認めなかったが、CD169 低発現群では CD169 高発現群と比較して、有意にリンパ節転移が多い傾向を認めた。

(3) リンパ節の CD169 陽性率が高い症例は術後生存率が有意に良好であり、CD169 は大腸癌の独立した予後因子である

次に CD169 高発現群と CD169 低発現群で術後生存率の分析を行った。その結果、CD169 高発現群では術後生存率が有意に高いことが明らかとなった（図 2）。汎マクロファージマーカーである CD68 陽性細胞数を分母として、CD169 陽性率（CD169/CD68）を算出した場合でも同様の結果であった（図 2）。さらに多変量解析を行ったところ、リンパ節マクロファージの CD169 陽性率は、大腸癌の独立した予後因子であることを見出した。

図2 CD169+ sinus macrophage の数が多い症例では、全生存率が有意に良好であった



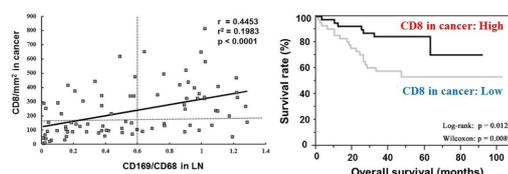
(4) 所属リンパ節の CD169 陽性細胞数と腫瘍組織内の CD8 陽性 T リンパ球の浸潤数は正の相関を示した

次に所属リンパ節での CD169 発現と CD8 陽性 T リンパ球との関連について解析を行った。リンパ節洞を多重免疫染色により詳細に解析すると、CD169 陽性マクロファージは CD8 陽性 T リンパ球と直接的に接触しており、さらにこれらの T リンパ球は CD169 のリガンドである CD43(Sialoprophin)を共発現していることが明らかになった。この事実は、CD169 陽性マクロファージが細胞間相互作用により、CD8 陽性 T リンパ球を直接的に活性化していることを示唆する。

腫瘍組織内への CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が多い症例では予後良好であることが知ら

れている。私達はリンパ節の CD169 陽性マクロファージが多い症例では、腫瘍組織内への CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が増加していると予想し、各々を定量的に評価し、相関分析を行った。その結果、リンパ節の CD169 陽性数と CD8 陽性 T リンパ球が正の相関を示すことが明らかとなった（図 3）。即ち、リンパ節の CD169 陽性マクロファージは CD8 陽性 T リンパ球を介した抗腫瘍免疫を活性化している可能性があり、大腸癌患者における抗腫瘍免疫のモニタリングや生命予後を反映する分子マーカーとして有用であると考えられる。

図3 所属リンパ節のCD169+ macrophage の数は、CD8+ T リンパ球の腫瘍組織内浸潤数と正の相関を示した



現在はヒトマクロファージとヒトリンパ球を用いて培養実験を遂行している。IFN- γ で誘導した CD169 高発現マクロファージが高いリンパ球刺激能を有することを明らかにしているが、CD169 によるリンパ球活性化の分子メカニズムはまだ不明な点が多い。今後、さらに検討を行う予定である。

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 9 件)

1. 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* 53: 127-133, 2013. 「査読あり」
2. 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* 104: 1237-1244, 2013. 「査読あり」
3. Nakagawa T, Sakashita N, Ohnishi K, Komohara Y, Takeya M. Imprint cytological feature of large cell neuroendocrine carcinoma of the gallbladder: A case report. *J Med Invest* 60: 149-153, 2013. 「査読あり」
4. Komohara Y, Niino D, Saito Y, Ohnishi K, Hasita H, Ohshima K, Takeya M. Clinical significance of CD163+ tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell

- leukemia/lymphoma. **Cancer Sci** 104: 945-951, 2013. 「査読あり」
5. 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** 57: 1046-1054, 2013. 「査読あり」
 6. Yeung JT, Hamilton RL, **Ohnishi K** (他 7名). LOH in the HLA Class I region at 6p21 is Associated with Shorter Survival in Newly Diagnosed Adult Glioblastoma. **Clin Cancer Res** 19: 1816-1826, 2013. 「査読あり」
 7. **Ohnishi K**, Tanaka S, Oghiso Y, Takeya M. Immunohistochemical Detection of a Possible Cellular Origin of Hepatic Histiocytic Sarcoma in Mice. **J Clin Exp Hematop** 52: 171-177, 2012. 「査読あり」
 8. Komohara Y, Hasita 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** 103: 2165-2172, 2012. 「査読あり」
 9. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, **Ohnishi K**, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C, Marthan R. Development and Characterization of an Animal Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. **J Vasc Res** 49: 33-42, 2012. 「査読あり」

〔学会発表〕(計 7件)

1. **Koji Ohnishi**, Yoichi Saito, Yoshihiro Komohara, Motohiro Takeya. High expression of CD169 in lymph node sinus macrophages is a new prognostic factor that reflects CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity in human malignant melanoma 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11-13日(千葉、幕張メッセ)
2. **大西紘二**、菰原義弘、西東洋一、竹屋元裕 大腸癌における所属リンパ節のCD169陽性マクロファージはCD8陽性Tリンパ球の腫瘍組織内浸潤に関与し、新しい予後因子となる 第10回日本病理学会カンファレンス2013六甲山 2013年8月2-3日(神戸、六甲山ホテル)
3. **大西紘二**、菰原義弘、西東洋一、竹屋元裕 大腸癌における所属リンパ節のCD169陽性マクロファージはCD8陽性Tリンパ球の腫瘍組織内浸潤に関与し、新しい予後因子となる 第17回日本がん

- 免疫学会総会 2013年7月3-5日(山口、ANAクラウンプラザホテル宇部)
4. **大西紘二**、藤原章雄、菰原義弘、竹屋元裕 CD163は抗炎症性作用を有し、LPS誘導性敗血症マウスにおける死亡率を低下させる 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日(札幌、ロイトン札幌)
 5. **大西紘二**、菰原義弘、西東洋一、林田唯、中川雄伸、竹屋元裕 大腸癌における所属リンパ節のCD169陽性マクロファージはTリンパ球の腫瘍組織内浸潤に関与し、臨床予後と相関する 第53回日本リンパ網内系学会 2013年5月16-18日(京都、国立京都国際会館)
 6. **Koji Ohnishi**, Yoshihiro Komohara, Yoichi Saito, Yui Hayashida, Takenobu Nakagawa, Motohiro Takeya 5th EMBO Workshop 2013年1月14-19日(Marseille, France, Centred' Immunologie Marseille-Luminy)
 7. **大西紘二** 播種性骨髄癌をきたしたHER2陽性胃癌の一部検例 第85回九州病理集談会 2012年7月7日(熊本、国立病院機構熊本医療センター)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 紘二(OHNISHI, Koji)

熊本大学・生命科学部・助教

研究者番号: 40613378

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: