

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：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791702

研究課題名(和文) 卵巣癌腹膜播種を制御する腹水中骨髄由来細胞の同定とその役割の検討

研究課題名(英文) Identification of myeloid derived cells which regulates ovarian cancer dissemination

研究代表者

磯部 晶 (Isobe, Aki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60397619

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)：卵巣癌患者の腹水から採取した骨髄由来細胞のうち、CD11b + CD14+細胞は、CD11b陰性細胞、CD11b + CD14 - 細胞に比して、有意に高いIL-6産生能を示し、卵巣癌細胞株SKOV3ip1の増殖能・浸潤能を有意に促進した。これらの増殖能・浸潤能は抗ヒトIL-6受容体抗体の投与によりほぼ完全に抑制された。FACS解析にて、CD11b + CD14+細胞は約88%がCD68陽性、CD206陽性であり、M2マクロファージであることを確認した。卵巣癌腹水中に存在するM2マクロファージがIL-6産生を通じて卵巣癌の播種進展を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：From ovarian cancer ascites, we found CD11b+CD14+ cells expressed significantly high levels of IL-6 compared with other populations of cells and FACS analyses revealed about 88% of CD11b+CD14+ were mannose receptor, CD206 positive, indicating these populations of cells are predominantly M2-polarized macrophages, TAMs. When CD11b+CD14+ cells were co-cultured with ovarian cancer cells, the invasion as well as the proliferation of cancer cells were so promoted and these promotions were almost completely inhibited by the pretreatment with anti-IL-6R antibody, while anti-IL-6R antibody did not affect ovarian cancer cell invasion and proliferation without CD11b+CD14+ cells, indicating TAMs enhance ovarian cancer proliferation or invasion by secreting a certain amount of IL-6. M2-polarized macrophages present in ovarian cancer ascites play a crucial role in ovarian cancer progression by secreting IL-6. Targeting IL-6/IL-6R signaling has a therapeutic potential for ovarian cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：骨髄由来細胞 M2マクロファージ IL-6

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌患者の予後は、最近の病巣全切除の概念の確立 (Debulking Surgery) とそれを可能にした外科手術の著しい進歩、および最適な術後化学療法 (パクリタキセルとカルボプラチン) の実施にも関わらず、全く改善していない。実際、本邦での卵巣癌死は 1996 年には 4006 人であったのに対して、2009 年が 4603 人とむしろ増加している (がん情報サービス <http://ganjoho.jp/public>)。卵巣癌患者の最大の死因は、卵巣癌細胞が原発巣を離脱し、腹腔内を浮遊の後、諸臓器への直接接着・浸潤する、即ち、腹膜播種であり、そのメカニズムの解析とそれに基づく新しい治療薬の開発は、卵巣癌に対する新しい分子標的治療となりうる。

(2) 腹膜播種を形成する癌微小環境内には癌細胞の他に、マクロファージなどの骨髄由来細胞を多量に含む腹水、血管内皮細胞、線維芽細胞・腹膜中皮細胞・脂肪細胞などが存在している。それぞれが播種病変の形成に貢献しており、新しい分子治療の標的になりうる。我々はこれまでに、卵巣癌患者がしばしば多量の腹水による腹部膨満症状を呈し、その腹水中にはマクロファージなどの骨髄由来細胞が含まれることに着目し、この骨髄由来細胞の腹膜播種における役割の解明を行ってきた。具体的には卵巣癌患者腹水から単球のマーカーである CD11b による Positive Selection にて分離した骨髄由来細胞の初代培養を行い、卵巣癌細胞株との共培養実験を行った。卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 の浸潤能は骨髄由来細胞との共培養で著明に亢進していた。そして、その浸潤能の亢進は抗インターロイキン (IL)-6 受容体抗体 (tocilizumab) により、部分的ではあるが抑制された。骨髄由来細胞が IL-6 を分泌することにより、卵巣癌の浸潤および増殖を促進すると考えられた。

(3) 卵巣癌腹水中には多種類の骨髄由来細胞が含まれている。代表的なものはマクロファージであるが、サイトカインや増殖因子など分化条件の違いにより免疫を活性化する M1 マクロファージ、免疫を抑制する M2 マクロファージという性質の異なる 2 種類がある。腫瘍浸潤の先端周辺にはマク

ロファージが存在しており、腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophage: 以下 TAM) と呼ばれ、様々な癌種で予後との相関が指摘されている (Nat Rev Cancer, 2004; 4:71-8) が、卵巣癌の播種進展における TAM の性質については知見が少ない。また、卵巣癌腹水中にはマクロファージ以外にも、MDSC (Myeloid Derived Suppressor cells) や TEM (TIE2 Expressing Monocyte)、Neutrophil、NK 細胞などの CD11b 陽性骨髄由来細胞を認める (Nat Rev Cancer 2008; 8:618-31) が、これら個々の骨髄由来細胞の卵巣癌腹膜播種に果たす役割について網羅的検討はなされていない。これらの種々の骨髄由来細胞の中でも、卵巣癌進展に特に寄与する骨髄由来細胞を同定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌腹水中に多量に存在する骨髄由来細胞から腹膜播種を制御する細胞の同定を行い、同定した細胞が癌微小環境に果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌患者より文書による同意を得た上で手術時に腹水を採取し、遠心分離後 FicolI で赤血球・血漿の除去を行った後、MACS Cell Separation Columns (Miltenyi Biotec 社) を用いて単球マーカーである CD11b 陽性細胞を骨髄由来細胞として分離培養した。この細胞をさらに種々の骨髄由来細胞の表面マーカーに対する抗体で標識し、分離回収した。

(2) 背景で述べたように、IL-6 が卵巣癌細胞株の増殖・浸潤を促進することを既に確認しているため、上記方法で分離培養した骨髄由来細胞の IL-6 産生能を ELISA 法で検討した。

(3) 分離培養した骨髄由来細胞を用いて、24 ウェルの培養 Dish 上で Boyden Chamber を利用した卵巣癌細胞株との共培養実験を行い、卵巣癌細胞の増殖能、浸潤能について検討した。

(4) 上記の機能解析の結果、分離培養した骨髄由来細胞のうち卵巣癌進展に大きく寄与するものについて、FACS 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌腹水中骨髄由来細胞の分離

卵巣癌腹水中より分離培養した CD11b 陽性細胞を、同様に MACS Columns を用いて代表的な骨髄由来細胞であるマクロファージのマーカ―として知られる CD14 の発現の有無 (CD11b + CD14-細胞と CD11b + CD14+細胞) で分類した。比較のため同一腹水中の CD11b 陰性細胞も実験に用いた。

(2) 腹水中骨髄由来細胞の IL-6 産生能

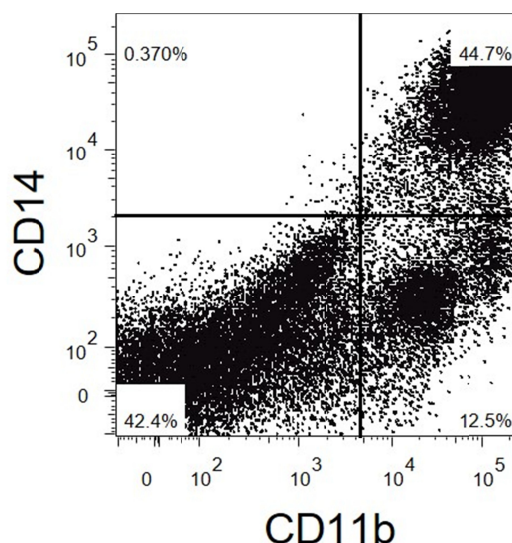
(1) で分類した CD11b + CD14-細胞と CD11b + CD14+細胞、比較のため CD11b 陰性細胞を同条件で培養し、培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法測定したところ、CD11b 陰性細胞に比して CD11b + CD14-細胞は約 15 倍、CD11b + CD14+細胞は約 50 倍の IL-6 を産生していた。

(3) 腹水中骨髄由来細胞と卵巣癌細胞株との共培養

卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 を CD11b + CD14-細胞と CD11b + CD14+細胞、CD11b-細胞のそれぞれとの共培養による MTS assay を行ったところ、SKOV3ip1 の増殖能は、CD11b-細胞に比して CD11b + CD14-細胞との共培養で約 1.3 倍、CD11b + CD14+細胞との共培養で約 1.5 倍亢進した。同様に共培養にて invasion assay を行ったところ、SKOV3ip1 の浸潤能は、CD11b-細胞に比して CD11b + CD14-細胞との共培養で約 2 倍、CD11b + CD14+細胞との共培養で約 4 倍亢進した。この実験系において、抗 IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) を添加したところ、CD11b + CD14+細胞との共培養によって亢進した SKOV3ip1 の増殖能は約 50%、浸潤能は 80%以上が抑制された。

(4) FACS 解析

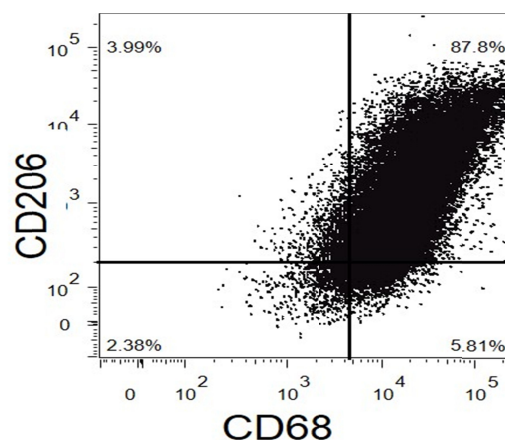
卵巣癌腹水より回収した細胞群についてフローサイトメーターを用いて解析を行ったところ、次に示すように CD11b 陽性骨髄由来細胞のうち約 80%が CD14 陽性を示した。



CD11b + CD14+細胞についてさらに解析したところ、次に示すようにこの細胞の大部分 (80%以上) が CD68 陽性 CD206 陽性であり、M2 マクロファージであることが示唆された。卵巣癌腹水中の骨髄由来細胞の中でも特に M2 マクロファージが、IL-6 を分泌することにより、卵巣癌の進展に大きく寄与することが示唆された。

(5) 腹水中骨髄由来細胞が癌微小環境に果たす役割

当該年度内には完遂できなかったが、上記で同定された M2 マクロファージの癌微小環境に及ぼす影響を、婦人科手術の際に患者より同意を得て採取した大網より分離した腹膜中皮細胞、線維芽細胞の初代培養細胞、また、帝王切開で娩出した胎盤より患者の同意のもと採取した臍帯から分離培養する血管



内皮細胞 (HUVEC) を用いて、M2 マクロファージとの共培養により、これらの細胞における遺伝子変動の解析を DNA マイクロアレイ法にて行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

磯部 晶 卵巣癌進展を制御する腹水骨髄由来細胞の同定とその役割の解析。第66回日本産科婦人科学会学術講演会、2013年5月12日、さっぽろ芸文館

磯部 晶 卵巣癌組織におけるインターロイキン6 (IL-6) とその受容体の発現が予後に与える影響の解析。第65回日本産科婦人科学会学術講演会、2013年4月18日、東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯部 晶 (ISOBE Aki)
大阪大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60397619

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし