

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293089

研究課題名(和文)マクロファージの活性化と機能的多様性の解析-M1/M2パラダイムを超えて

研究課題名(英文)Analysis of activation pathways and functional heterogeneity of macrophages - beyond M1/M2 paradigm

研究代表者

竹屋 元裕 (TAKEYA, MOTOHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90155052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：明細胞腎癌においてM2型腫瘍随伴マクロファージ(M2-TAM)が腫瘍細胞の幹細胞性の維持に重要な役割を果たす事を示した。成人T細胞白血病/リンパ腫ではCD163陽性M2-TAMのみが患者予後と関係し、CD163陽性M2-TAMとCD204陽性M2-TAMの機能に違いがあることを示した。大腸癌や悪性黒色腫の所属リンパ節のCD169陽性洞マクロファージ数と腫瘍中のCD8陽性T細胞数に正の相関がみられ、CD169陽性マクロファージが抗腫瘍免疫に関与する事を示した。マクロファージのM2活性化を抑制し腫瘍増殖を抑制するコロソリン酸は、細胞間相互作用におけるStat3の活性化抑制によって作用を発揮する。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated macrophages of M2-type (M2-TAM) were considered to play an important role in the maintenance of stemness in a human clear cell renal cell carcinoma. In adult T cell leukemia/lymphoma, density of CD163-positive M2-TAM was associated with poor prognosis of patients, whereas CD204-positive M2-TAM was not, indicating the functional difference of CD163-positive TAMs and CD204-positive TAMs. Increased number of CD169-positive sinus macrophages in the regional lymph nodes of colon cancer and malignant melanoma was associated with favorable prognosis of the patients. Since it is positively correlated with the number of CD8-positive T cells in tumor tissues, CD169-positive sinus macrophages were considered to be involved in the establishment of anti-tumor immunity. It was found that corosolic acid, a natural compound that suppresses M2-macrophage differentiation, inhibits tumor cell growth via suppressing the Stat3 activation of both tumor cells and macrophages.

研究分野：病理学

キーワード：M1/M2マクロファージ 腫瘍随伴マクロファージ ヒト悪性腫瘍 がん幹細胞 CD163 CD204 Stat3 corosolic acid

## 1. 研究開始当初の背景

1990年初頭になって、従来から知られていたマクロファージの古典的活性化(M1)に対して、これとは異なる活性化経路であるオルタナティブ活性化経路(M2)の存在が明らかとなってきた。古典的活性化では、IFN- $\gamma$ によって活性化を受けたM1マクロファージがToll様受容体(TLR)等を介して、生体防御や炎症惹起性のエフェクター細胞として働くのに対し、オルタナティブ活性化では、Th2サイトカインであるIL-4やIL-13によって活性化を受けたM2マクロファージが、IL-10等の産生を介して抗炎症性に作用し、生体の恒常性維持や炎症後の組織修復に関与する。さらに、M2マクロファージは、腫瘍増殖に促進的に作用する。この様な多彩な性質を示すマクロファージをM1、M2に分類する試みは卓見であったが、一方で、様々な機能や形質を示すマクロファージを画一的に二大別し、極端に単純化することへの不都合も指摘されており、とりわけM2マクロファージに関しては、血管新生を誘導する血管新生マクロファージやIL-10を分泌することで強い免疫抑制作用を有する免疫抑制マクロファージなどの様々な亜群の存在が指摘されている。この様な背景から、マクロファージが関与する様々な疾患において、M1/M2パラダイムを超えた新しいマクロファージ亜群の解析と疾患との関わりの解明が待たれている。

## 2. 研究の目的

マクロファージと病態との関わりを解析する上で、マクロファージをM1とM2に分けて論ずることによって多くの新しい知見が提供されてきた。一方でマクロファージの活性化過程については、単純にM1活性化とM2活性化に二大別することへの不都合も指摘されている。本研究では、ヒト悪性腫瘍組織における腫瘍随伴マクロファージ(Tumor-associated macrophage: TAM)の解析を主体として、M1マクロファージとM2マクロファージの腫瘍への関与を解明するとともに、M1/M2パラダイムを超えたマクロファージの活性化過程の解析の必要性を明らかにしたい。また、非腫瘍性疾患として子宮内膜症と慢性閉塞性肺疾患を取り上げ、マクロファージ亜群の関与を明らかにする。これらの解析において、特にM2マクロファージの活性化亜群に注目し、M2マクロファージマーカーとされているCD163(ヘモグロピンスカベンジャー受容体)とCD204(クラスAスカベンジャー受容体)の発現の違いを解析するとともに、CD163およびCD204の分子自体がマクロファージの機能に及ぼす作用について解析し、M1/M2パラダイムの再評価を行う。

具体的には、種々のヒト悪性腫瘍組織におけるTAMに関して、汎マクロファージマ-

ーカーとしてCD68(マクロシアリン)を利用し、M2マーカーとしてCD163およびCD204を用いて解析を行い、CD68/CD163/CD204陽性TAMの出現の程度と腫瘍の発生部位や組織型との関連、腫瘍細胞の増殖や患者予後との相関等を解析する。また、CD163とCD204の発現の違いを比較検討し、M2マクロファージの多様性を明らかにする。さらに、CD163およびCD204に関して、それぞれの分子自体がM2マクロファージの機能に及ぼす影響を解析する。この際、CD163およびCD204の遺伝子欠損マウスを用い、各分子の欠損マクロファージを用いた培養系での解析や、担癌モデルマウスの解析を通して、CD163とCD204のM2マクロファージにおける機能を明らかにする。

一方、M1マクロファージについては病理組織に応用可能なマーカーに乏しいが、CD169(シアロアドヘシン)はM1マクロファージの亜群を認識するマーカーとして利用可能と考えられる。そこで、担癌患者のリンパ節マクロファージにおけるCD169の発現の意義を検討する。

さらにマクロファージの活性化制御をターゲットした治療戦略を開発するために、マクロファージの活性化に影響を及ぼす天然化合物をライブラリーからスクリーニングし、各種疾患モデルにおける化合物の作用を検証し、治療効果と作用機序について検討を加える。

## 3. 研究の方法

### (1)ヒト悪性腫瘍におけるTAMの役割解明

種々のヒト悪性腫瘍の病理組織標本を用いて、CD68、CD163およびCD204の免疫染色を施行し、各マーカーに陽性となるTAMの分布や密度を解析し、腫瘍細胞の増殖活性や患者予後をはじめとする種々の臨床情報との相関を解析した。また、健康人ボランティアから採取した単球由来マクロファージと腫瘍細胞を共培養し、細胞間相互作用について解析を加えた。

### (2)非腫瘍性疾患におけるマクロファージ亜群の役割の解析

ヒト子宮内膜症および慢性閉塞性肺疾患の病理検体を用いて、CD68、CD163、CD204の免疫染色によってマクロファージ亜群の関与を解析した。さらに培養系において、不死化内臓間質細胞とマクロファージの相互作用を検討した。

### (3)担癌患者の所属リンパ節におけるCD169陽性マクロファージの解析

担癌患者の所属リンパ節のリンパ洞マクロファージにおけるCD169の発現と腫瘍内のCD8陽性T細胞との関連を解析し、腫瘍抗原提示におけるリンパ節CD169陽性マクロファージの役割を解析した。

### (4)マクロファージの活性化制御に基づく

#### 新しい疾患治療法の開発と作用機序の解明

マクロファージの M2 活性化を制御する天然化合物をスクリーニングし、担癌動物モデルを用いて腫瘍増殖抑制効果を検証するとともに作用機序について解析を加えた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト悪性腫瘍における TAM の役割解明

私どもは、これまでにヒト明細胞腎癌では腫瘍組織内への M2-TAM の浸潤が多いほど予後不良であることを明らかにしたが、今回の検討で、CD163 および CD204 陽性の M2-TAM の浸潤密度が高い領域に幹細胞マーカーである CD44 陽性腫瘍細胞が多く観察された。さらに培養実験から、マクロファージ由来の TNF- $\alpha$  が腫瘍細胞による CD44 発現を誘導することが明らかとなり、M2-TAM が腫瘍細胞の幹細胞性 (stemness) の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された [論文番号 2]。成人 T 細胞白血病/リンパ腫の解析では、腫瘍組織への CD163 陽性 M2-TAM の浸潤密度が高いほど予後不良であることを明らかにしたが [14]、CD204 陽性 M2-TAM と予後には相関がなく [7]、CD163 と CD204 によって認識される M2-TAM は必ずしも同一ではなく、異なる亜群が含まれている可能性が示唆された。

##### (2) 非腫瘍性疾患におけるマクロファージ亜群の役割の解析

子宮内膜症では腹水中のマクロファージの増加があることから、内膜症の進展にマクロファージの関与が示唆された。さらに CD163 陽性 M2 マクロファージと不死化内膜間質細胞を共培養すると内膜間質細胞の増殖が促進され、この作用に signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) の活性化が関与することを明らかにした [15]。慢性閉塞性肺疾患の解析では、重症度に比例して病巣中の CD163、CD204、CD206 の陽性率が上昇し、本疾患の病態に M2 マクロファージが関与する可能性が示唆された [9]。

##### (3) 担癌患者の所属リンパ節における CD169 陽性マクロファージの解析

大腸癌の所属リンパ節における CD169 の発現を検索すると、CD169 陽性洞マクロファージの数が多いほど予後が良好であることが明らかになった。さらに、CD169 陽性洞マクロファージ数と腫瘍組織中の CD8 陽性 T 細胞数に正の相関がみられ、CD169 マクロファージが CD8 陽性 T 細胞による抗腫瘍免疫を増強している可能性が示唆された [13]。次に、悪性黒色腫の所属リンパ節における CD169 の発現を検討すると、大腸癌と同様に CD169 陽性洞マクロファージの数が多いほど予後が良好で CD169 陽性洞マクロファージ数と腫瘍組織中の CD8 陽性 T 細胞数に正の相関がみられた [4]。

#### (4) マクロファージの活性化制御に基づく新しい疾患治療法の開発と作用機序の解明

これまでに、マクロファージの M2 活性化を抑制する天然化合物として corosolic acid を同定しているが、担癌モデルマウスに corosolic acid を投与することで腫瘍増殖が抑制されるとともに肺転移が抑制されることを明らかにした [16]。さらに、その作用機序の一つとして、corosolic acid は腫瘍細胞とマクロファージの細胞間相互作用における Stat3 の活性化を抑制することを明らかにした [8, 11]。

#### 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 44 件: 英文 30 件、邦文 14 件)

(1) Ohnishi K, Yamaguchi M, Erdenebaatar C, Saito F, Tashiro H, Katabuchi H, Takeya M, Komohara Y. Prognostic significance of CD169-positive lymph node sinus macrophages in patients with endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* 2016, 107:846-852. doi: 10.1111/cas.12929. 査読有

(2) Ma C, Komohara Y, Ohnishi K, Shimoji T, Kuwahara N, Sakumura Y, Matsuishi K, Fujiwara Y, Motoshima T, Takahashi W, Yamada S, Kitada S, Fujimoto N, Nakayama T, Eto M, Takeya M. Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in CD44 expression in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2016, 107(5):700-707. doi: 10.1111/cas.12917. 査読有

(3) Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016, 99:180-185. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.009. 査読有

(4) Saito Y, Ohnishi K, Miyashita A, Nakahara S, Fujiwara Y, Horlad H, Motoshima T, Fukushima S, Jinnin M, Ihn H, Takeya M, Komohara Y. Prognostic significance of CD169+ lymph node sinus macrophages in patients with malignant melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2015, 3:1356-63. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0180. 査読有

(5) Komohara Y, Morita T, Annan DA, Horlad H, Ohnishi K, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Suzu S, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Akashi K, Takeya M, Jinushi M. The coordinated actions of TIM-3 on cancer and myeloid cells in the eegulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear Cell renal cell carcinomas.

Cancer Immunol Res. 2015, 3:999-1007.  
doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0156. 査読有

(6) Komohara Y, Niino D, Ohnishi K, Ohshima K, Takeya M. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies. *Pathol Int*. 2015, 65:170-176. doi: 10.1111/pin.12259. 査読有

(7) Saito Y, Komohara Y, Niino D, Horlad H, Ohnishi K, Takeya H, Kawaguchi H, Shimizu H, Ohshima K, Takeya M. Role of CD204-positive tumor-associated macrophages in adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2014;54(1):59-65.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942947>. 査読有

(8) 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. doi: 10.1155/2014/348539. 査読有

(9) 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. doi: 10.1371/journal.pone.0087400. 査読有

(10) Baghdadi M, Yoneda A, Yamashina T, Nagao H, Komohara Y, Nagai S, Akiba H, Foretz M, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Takeya M, Viollet B, Yagita H, Jinushi M. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. *Immunity*. 2013, 39:1070-1081. doi: 10.1016/j.immuni.2013.09.014. 査読有

(11) 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.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fujiwara+Y%2C+Takaishi+K> 査読有

(12) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors.

*Cancer Sci*. 2014, 105:1-8. doi: 10.1111/cas.12314. 査読有

(13) 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. doi: 10.1111/cas.12212. 査読有

(14) Komohara Y, Niino D, Saito Y, Ohnishi K, Horlad H, Ohshima K, Takeya M. Clinical significance of CD163<sup>+</sup> tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2013, 104:945-951. doi: 10.1111/cas.12167. 査読有

(15) Itoh F, Komohara Y, Takaishi K, Honda R, Tashiro H, Kyo S, Katabuchi H, Takeya M. Possible involvement of signal transducer and activator of transcription-3 in cell-cell interactions of peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis. *Fertil Steril*. 2013, 99:1705-1713. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.133. 査読有

(16) 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. doi: 10.1002/mnfr.201200610. 査読有

(17) 竹屋元裕. 慢性炎症とがん：がんと慢性炎症の密接な関係. 別冊Bio Clinica: 慢性炎症と疾患 5:10-11 2016年2月 査読無

(18) 菰原義弘, 竹屋元裕. 血液系腫瘍におけるマクロファージの役割. 血液内科 Hematology 72:85-89 2016年1月 査読無

(19) 大西紘二, 菰原義弘, 竹屋元裕. 慢性炎症とがん：がん微小環境とがんの増殖・浸潤・転移 リンパ節洞マクロファージとがん免疫. 別冊Bio Clinica: 慢性炎症と疾患 5:94-99 2016年2月 査読無

(20) 藤原章雄, 菰原義弘, 大西紘二, 竹屋元裕. 慢性炎症とがん：がん微小環境を標的とした治療法 マクロファージの活性化制御によるがん治療. 別冊Bio Clinica: 慢性炎症と疾患 5:112-117 2016年2月 査読無

(21) 菰原義弘, 竹屋元裕. がん病態におけるマクロファージの重要性—標的細胞としての可能性—. 月刊細胞 47:294-297 2015年6月 査読無

(22) 菰原義弘, 竹屋元裕. リンパ腫学-最新の研究動向-：リンパ組織の生物学とリンパ腫の発症機序 リンパ腫におけるマクロファージ

の役割. 日本臨床 73(134-139 2015年10月 査読無

(23) 菰原義弘, 竹屋元裕. 分子細胞生物学講座 がん病態におけるマクロファージの重要性: 標的細胞としての可能性. 細胞

47:294-297 2015年6月 査読無

(24) 菰原義弘, 竹屋元裕. 【単球・マクロファージの多様性と病態】 癌病巣におけるマクロファージの多様性と役割. 血管医学

15:141-147 2014年7月 査読無

(25) 菰原義弘, 新野大介, 大島孝一, 竹屋元裕. ATL/HTLV 1研究の最近の進展 ATLにおけるCD163陽性マクロファージの重要性. 月刊血液内科 68:36-40 2014年1月 査読無

(26) 菰原義弘, 竹屋元裕. がんと間質 がん間質マクロファージ:腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の役割. 病理と臨床 32:17-23 2014年1月 査読無

(27) 菰原義弘, 竹屋元裕. 単球・マクロファージの多様性と病態 6)癌病巣におけるマクロファージの多様性と役割. 血管医学

15:141-147 2014年7月 査読無

(28) 竹屋元裕, 上川将史, 菰原義弘. 電子顕微鏡から読み解く病理学 第7回 様々な病態におけるマクロファージの役割を電子顕微鏡から読み解く. 病理と臨床 31:1135-1139 2013年10月 査読無

(29) 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 Ind 56:13-19 2014年2月 査読無

〔学会発表〕(計 90 件)

(1) 菰原義弘 シンポジウム: 婦人科疾患における腹腔マクロファージの役割. 第30回日本生殖免疫学会総会(招待講演)2015年11月21日-22日 くまもと県民交流館パレア(熊本県・熊本市)

(2) 菰原義弘 招待講演: マクロファージの分化・活性化に関する最近の話題と疾患への関与. 第16回Atherosclerosis and Biolipid Conference(招待講演)2015年8月1日 ホテル日航東京(東京都)

(3) 菰原義弘, 竹屋元裕 シンポジウム: ヒト悪性腫瘍におけるマクロファージの役割と標的細胞としての可能性. 第25回日本樹状細胞研究会(招待講演)2015年7月10日 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

(4) 菰原義弘, 藤原章雄, 大西紘二, 竹屋元裕 シンポジウム: がんにおけるマクロファージの役割 (The significance of tumor-associated macrophages [TAMs] in human malignant tumors) 第104回日本病理学会総会(招待講

演)2015年4月30日-5月2日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

(5) 大西紘二 悪性腫瘍におけるCD169陽性リンパ節マクロファージの臨床病理学的意義の解明(日本病理学会学術奨励賞受賞講演)第104回日本病理学会総会(招待講演)2015年4月30日-5月2日(名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市))

(6) 藤原章雄 ミエロイド細胞の制御を介したOnionin Aの抗腫瘍薬としての可能性(生薬天然物部会症例研究賞受賞講演)第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム(招待講演)2014年11月5日-6日 東京大学弥生キャンパス(東京)

(7) 菰原義弘 シンポジウム: ヒト固形癌におけるマクロファージの役割と標的細胞としての可能性 第24回日本樹状細胞研究会(招待講演)2014年6月20日(山形国際ホテル,山形)

(8) Motohiro Takeya Significance of Macrophage Infiltration in Human Malignancies. The 22<sup>nd</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (招待講演) 2014年6月2日-3日(Kobe Chamber of Commerce and Industry, Kobe)

(9) 竹屋元裕 宿題報告: マクロファージの活性化と病態(日本病理学賞受賞講演)第103回日本病理学会総会(招待講演)2014年4月24日-26日 広島国際会議場(広島県・広島市)

(10) 菰原義弘 A演説: 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(日本病理学会学術研究賞受賞講演)第59回日本病理学会秋期特別総会(招待講演)2013年11月21日-22日 甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)

(11) 竹屋元裕 レクチャー: 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(招待講演)2103年8月2日~3日 六甲山ホテル(兵庫県・神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学・大学院生命科学研究部・細胞病理学分野

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹屋 元裕 (TAKEYA MOTOHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 90155052

(2)研究分担者

菰原 義弘 (KOMOHARA YOSHIHIRO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号: 40449921

大西 紘二 ( OHNISHI KOJI )  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：40613378  
藤原 章雄 ( FUJIWARA YUKIO )  
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：70452886