

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460460

研究課題名(和文) 所属リンパ節における免疫バランスはがんの予後予測因子となるか

研究課題名(英文) Does the balance in lymphoma of immunity become the prognostic factor of cancer?

研究代表者

Horlad Hasita (horlad, hasita)

熊本大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：00644840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫と膵臓癌の臨床検体を用いて所属リンパ節におけるマクロファージの活性化状態を解析してきた。所属リンパ節におけるCD169陽性マクロファージが多い症例ほど予後が良いことが明らかとなった。悪性黒色腫ではCD169陽性マクロファージの数はTステージと転移、腫瘍組織内のリンパ球浸潤と有意な相関が認められた。更に、腎臓癌におけるマクロファージの解析も行った。腎臓組織内におけるTIM3陽性マクロファージが多いほど予後が悪いことを明らかにした。また、悪性リンパ腫(ATL)での解析では一部のリンパ腫細胞でTIM3が発現しており、腫瘍細胞にTIM3が発現する症例では化学療法の効果不良が明らかとなった

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that macrophage activation status in regional lymph node was significantly associated with anti-tumor immune responses and clinical course. In this study project we tried to investigate if similar results were seen in malignant melanoma and pancreatic cancer, and we found that cases which CD169-positive macrophages are increased in regional lymph node showed better clinical prognosis in melanoma and pancreatic cancer. In addition to this research project, we tried to do research of TIM-3 in malignant lymphoma and renal cell carcinoma. The density of TIM-3-positive-macrophages are well correlated with worse clinical prognosis in clear cell renal cell carcinoma. TIM-3 expression in lymphoma cells were well correlated to the chemo-resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma.

研究分野：実験病理

キーワード：マクロファージ CD169

1. 研究開始当初の背景

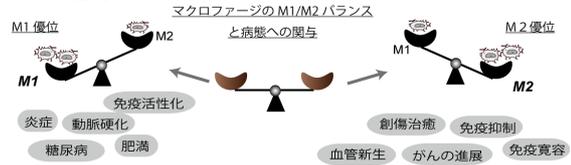
マクロファージは全身臓器に存在している免疫細胞であり、様々な炎症病態に関与している。がんの組織中にも多数のマクロファージが浸潤していることはかなり以前から注目されており、様々な研究がなされている。当初、マクロファージに抗がん作用があるのではないかと考えられていたが、ヒトのがん組織を用いた検討から多くのがんではマクロファージの浸潤が多い症例ほど予後が悪く、マクロファージはいわゆる「好腫瘍性」の性格を有しているようである。

私たちは、以前からマクロファージに注目し、ヒトの病理検体を用いてがんの悪性度とマクロファージの浸潤・分化との関連性についての研究を行っている。これまでの研究で、グリオーマ、肝内胆管癌、腎癌、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫では、悪性度の高い症例の腫瘍組織中に多数のマクロファージ、特に抗炎症性の機能を有する亜群 (CD163 陽性M2マクロファージ) が浸潤していることを見出した (Horlad & Komohara et al. Cancer Sci 2011, Cancer Sci 2012, J Clin Exp Hematopath 2011)。更に培養実験を行いがん細胞とマクロファージの細胞間相互作用を検討したところ、がん細胞がマクロファージのM2亜群への分化を誘導し、がん細胞へさまざまな成長因子を供給していることが明らかとなった。このようなマクロファージの活性化は正常の状態では見られず、がんに特異的な現象であることも分かってきた。

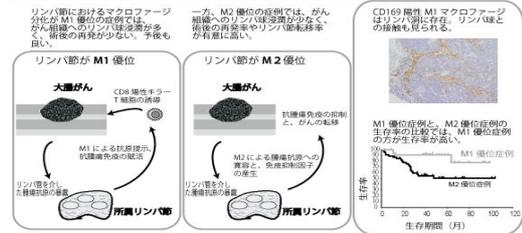
リンパ節の機能的な役割は、免疫監視である。がん組織に浸潤しているCD8陽性リンパ球の数は抗腫瘍免疫を反映する良い指標で、多くのがんでは、がん組織に浸潤しているCD8陽性リンパ球が多い症例ほど予後が良く、生存率が高い。また、このような症例ほど抗がん剤に対する反応性もよいとの報告もある。抗腫瘍免疫の有無はがんの病態を左右する重要な因子であり、リンパ節の免疫状態が抗腫瘍免疫の維持にどの様に関わっているのかは大変興味深い。

以前、大腸癌の病理検体を用いて、大腸癌組織でのCD8陽性細胞の数、リンパ節におけるマクロファージ分化を免疫組織学的手法を用いて解析し、生存率や臨床病理学的因子との関連性を検討した (Ohnishi K, et al. Cancer Sci 2013)。マクロファージの分化に関しては、M1のマーカースとしてCD169、M2のマーカースとしてCD163/CD204/CD206を使用している。その結果、興味深いことに、リンパ節でCD169陽性M1マクロファージが多い症例では、腫瘍組織におけるCD8リンパ球の数も多く、生存率も有意に高いことが明らかとなった。リンパ節転移のない症例ではM1が多い傾向があった。リンパ節転移のないグル

ープで解析してもM1と臨床予後には有意な相関性があった。



がんとリンパ節の関連性—大腸がんでの研究 (未発表データ)



2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえて、本研究では大腸癌での研究と同様の研究を悪性黒色腫と膵臓癌の検体を用いて行った。また、それに加えて、TIM-3に関する研究も腎細胞癌と成人T細胞白血病ATLLで行った。HAVCR2 (TIM3) hepatitis A virus cellular receptor 2は、免疫チェックポイント分子として近年注目されている分子である。活性化リンパ球のみならずマクロファージにも発現しており、マクロファージの活性化マーカーとしても注目した。

3. 研究の方法

熊本大学皮膚科、熊本日赤病院外科・病理診断科との共同研究として研究を進めた。熊本大学皮膚科より悪性黒色腫の組織検体を約90症例分使用させてもらった。膵臓癌は熊本日赤病院の症例を70症例使用した。腫瘍組織のブロックでは、CD8の免疫染色を行いリンパ節のブロックではCD169とCD68の免疫染色を行った。それぞれの数を算出し、予後や臨床病理学的因子との相関性を解析した。リンパ節において、IFN-alphaの局在を免疫染色で解析した。

産業医科大学泌尿器科・病理学講座と熊本大学泌尿器科との共同研究として研究を進めた。淡明型腎細胞癌の症例を70症例使用した。TIM3の他にCD163やCD204の免疫染色を行い予後や臨床病理学的因子との相関性を解析した。

久留米大学病理学講座、京都大学ウイルス学研究所との共同研究として研究を進めた。約70症例のATLL組織を用いてTIM3の免疫染色を行い、予後や治療効果など様々な臨床病理学的因子との相関性を検討した。

4. 研究成果

CD169陽性マクロファージの数や割合が高い症例では再発率が低く、生存期間も有意に

延長していた。更に、CD169 陽性マクロファージが高い症例では、腫瘍組織内に浸潤した CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の数が高い傾向にあった。多変量解析では、CD169 陽性マクロファージの密度は独立した予後因子であった。ヒト単球由来マクロファージを用いた研究から、CD169 は IFN- $\alpha$  によって誘導される。そこで、リンパ節内の IFN- $\alpha$  の局在を免疫染色にて解析した。IFN- $\alpha$  に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったが、染色性は総じて弱かった。しかしながら、IFN- $\alpha$  が強い陽性像を示した一部の症例で二重免疫染色を行ったところ、CD68 陽性マクロファージ (CD169 陽性とはことなる。おそらく単球由来) の一部と、CD303 陽性の Plasmacytoid dendritic cell の一部に陽性であった。

膵臓癌でも、既に免疫染色は終了しており、現在解析中である。CD169 陽性マクロファージの密度が高い症例ほど生存期間が長いことが明らかとなり、やはり大腸癌、悪性黒色腫と類似した結果であった。今後はリンパ球の評価などを継続して行う予定である。

マクロファージの TIM3 を評価しようとする様々な腫瘍での免疫染色を行っていたところ、腎細胞癌の一部で TIM3 が陽性となることを突き止めた。更に、TIM3 発現癌細胞が見られた症例とそうでない症例で臨床予後を見たところ、TIM3 高発現群では有意に予後が悪い傾向にあった。更に、マクロファージでも TIM3 陽性であったが、TIM3 陽性マクロファージが多い症例でも、予後が悪い傾向にあった。TIM3 は新たな免疫チェックポイント阻害剤の標的分子として注目されつつある分子であり、マクロファージに注目した研究にも発展性があるかもしれない。

悪性リンパ腫の 1 亜型である ATLL の一部でも TIM3 が陽性になることを見出した。TIM3 発現癌細胞が見られた症例とそうでない症例で臨床予後を見たところ、有意な相関性は見られなかった。しかしながら、TIM3 高発現群では化学療法に対する感受性が低いことが明らかとなった。培養細胞では全ての ATLL 細胞株で TIM3 は陰性であったが、マクロファージと 2-3 週間共培養することで、ATLL 細胞での TIM3 発現が誘導できた。更に、培養細胞に TIM3 遺伝子を強発現させると ATLL 細胞の抗癌剤 (カルボプラチン) に対する感受性が低下した。TIM3 活性化の詳細なメカニズムは明らかに出来なかったが、ALTT において TIM3 阻害薬が治療の選択肢となることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 ) 全部査読あり

Horlad H, Ohnishi K, Ma C, Fujiwara Y, Niino D, Ohshima K, Jinushi M, Matsuoka M, Takeya M, Komohara Y. TIM-3 expression in lymphoma cells predicts chemoresistance in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). **Oncol Lett** (in press)

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** (in press)

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** 3:1356-1363. 2015

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 regulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear cell renal cell carcinomas. **Cancer Immunol Res** 3:999-1007, 2015

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.

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.

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.

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Yoshihiro Komohara, Koji Ohnishi, Motohiro Takeya. CD169-positive lymph node sinus macrophages are correlated with a favorable prognosis in patients with endometrial carcinoma. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, March 8-13, 2015 (Fairmont The Queen Elizabeth, Montreal, QC, Canada)

Horlad Hasita, Yoshihiro Komohara, Daisuke Niino, Koichi Ohshima, Motohiro Takeya. TIM3 expression in lymphoma cells is involved in chemo-resistance in patients with adult T-cell

leukemia/lymphoma (ATLL). 第104回 日本病理学会総会 平成27年4月30日-5月2日(名古屋、名古屋国際会議場)

Koji Ohnishi, Yoichi Saito, Yoshihiro Komohara, Yuji Miyamoto, Satoshi Fukushima, Munekage Yamaguchi, Hideo Baba, Hironobu Ihn, Hidetaka Katabuchi, Motohiro Takeya. Clinical significance of CD169-positive lymph node macrophages in human malignant tumors. 2014 ASCO Annual Meeting, May 30-June 3, 2014 (McCormick Place Chicago, Illinois, USA)

大西紘二、西東洋一、菰原義弘、竹屋元裕。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的意義。第104回 日本病理学会総会 平成27年4月30日-5月2日(名古屋、名古屋国際会議場)

菰原義弘、Horlad Hasita、地主将久、松岡雅雄、新野大介、大島孝一、竹屋元裕。成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)におけるTim-3発現は化学療法への耐性に関与する。第73回 日本癌学会学術総会 平成26年9月25-27日(横浜、パシフィコ横浜)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

ホラド ハシタ (Horlad, Hasita)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・学術研員  
研究者番号：00644840

### (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・準教授  
研究者番号：40449921

### (3) 連携研究者

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