

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860229

研究課題名(和文)腫瘍内免疫細胞による乳癌のエストロゲンシグナル修飾作用の解明

研究課題名(英文)Modification of estrogen action of breast cancer by tumor-associated immune cells

研究代表者

高木 清司(TAKAGI, Kiyoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80595562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織化学法により乳癌組織中の免疫細胞の局在を検討し、その意義を検討したところ、マクロファージがエストロゲン受容体陽性乳癌の悪性度に関連することがわかった。in vitroにて分化させたM2マクロファージが乳癌細胞の運動能を亢進させる一方、乳癌細胞のエストロゲン受容体の発現やエストロゲン応答遺伝子の発現を現弱させていた。

これらの結果より、M2マクロファージが乳癌の悪性度を高め、その結果としてエストロゲン依存性が低下するものと考えられた。このことは乳癌のホルモン療法耐性にマクロファージが関与する可能性を示唆しており、マクロファージが乳癌の治療標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical analysis revealed that infiltrating macrophages were associated with more aggressive phenotype of estrogen receptor-positive breast carcinomas. Generally, macrophages are divided into M1 and M2 macrophages based on molecular markers, and most of intratumoral macrophages are M2. Coculture of MCF-7 breast cancer cells and M2-polarized THP-1 and U937 leukemic cells demonstrated that M2 macrophages enhanced migration property of breast cancer cells, while expression of estrogen receptor and estrogen-responsive genes was down-regulated in breast cancer cells. These findings may suggest that breast cancer cells acquire more aggressive phenotype by interaction with M2 macrophages, and lose estrogen-dependency. Therefore, it is speculated that M2 macrophages are possibly associated with resistance to endocrine therapy of estrogen-sensitive breast cancer and therefore M2 macrophages are considered a potential therapeutic target of breast carcinomas.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：乳癌 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

乳癌は代表的な性ホルモン依存性腫瘍であり、女性ホルモンであるエストロゲンが乳癌の進展に深く関与している。内分泌療法（抗エストロゲン療法）はエストロゲン依存性乳癌に対する術後補助療法としてその地位を築いているが、一方で不応症例や治療後の晩期再発といった問題点を抱えていることもまた事実であり、この問題の克服に向けた乳癌の生物学的特性の理解が喫緊の課題である。

我々の研究グループはこれまで乳癌におけるエストロゲンの作用について継続的に研究を行ってきており、乳癌組織におけるエストロゲン受容体（ER）の発現意義をはじめ、エストロゲン応答遺伝子の機能やエストロゲンの局所合成メカニズムを明らかにしてきた。そして現在、先に述べた問題点および課題に立ち向かうべく、乳癌の内分泌療法抵抗性に関与するエストロゲンシグナルの修飾作用に着目している。エストロゲンは ER を活性化し、活性化した ER が転写因子として様々なエストロゲン応答遺伝子の発現調節を行うことによって作用を発揮するが、我々はこのエストロゲンシグナルが何らかの機序で修飾を受けることによって乳癌が内分泌療法抵抗性の形質を獲得すると推測している。そこで我々が今回焦点を当てたのが腫瘍内免疫細胞である。乳癌組織には癌細胞だけでなく多くの種類の免疫細胞の浸潤が見られる。そして近年、腫瘍内免疫細胞が乳癌細胞と相互作用して癌の進展を促進する可能性が相次いで示され、腫瘍内微小環境の研究に新たな局面が訪れている。

2. 研究の目的

腫瘍内免疫細胞がサイトカインを介して乳癌のエストロゲンシグナルにどのような影響を与えるかを分子生物学的手法を用いて検索すると同時に、その意義を病理組織学的に明らかにすることを目的とする。そして得られた知見を総合し、内分泌療法抵抗性のメカニズムの一端を明らかにし、内分泌療法の向上に向けた手がかりを得ることを最終目標とする。

3. 研究の方法

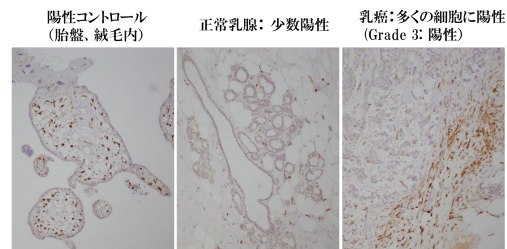
- (1) 乳癌組織に浸潤する免疫細胞を免疫組織化学法により検出し、その意義を臨床病理情報と関連させつつ明らかにする。
- (2) *in vitro* にて、乳癌細胞を免疫細胞と共培養し、エストロゲン受容体の転写活性を評価する。
- (3) *in vitro* にて乳癌細胞を免疫細胞と共培養し、乳癌細胞の悪性度の変化を運動能試験や細胞増殖試験により解析する。

4. 研究成果

結果 1) 乳癌組織内マクロファージの意義

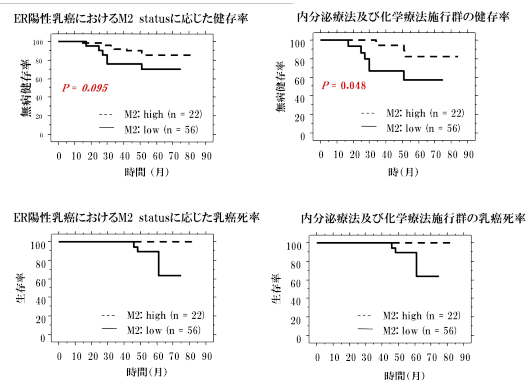
乳癌組織に浸潤するマクロファージを CD163 に対する免疫染色にて評価した。正常領域にはごく少数のマクロファージが認められる程度であったが、一部の乳癌組織には多数のマクロファージの浸潤がみられた (図 1)。

図1. 乳癌組織中のマクロファージ



エストロゲン受容体陽性症例に限定して解析したところ、浸潤するマクロファージが多い症例は高異型で ($P = 0.0004$)、細胞増殖能が高く ($P = 0.0002$)、プロゲステロン受容体の陽性路津が有意に低かった ($P = 0.027$)。また、予後解析を行ったところ、浸潤するマクロファージが多い症例は再発しやすい傾向にあり、特に術後療法（内分泌療法および化学療法）施行症例において顕著であった (図 2)。

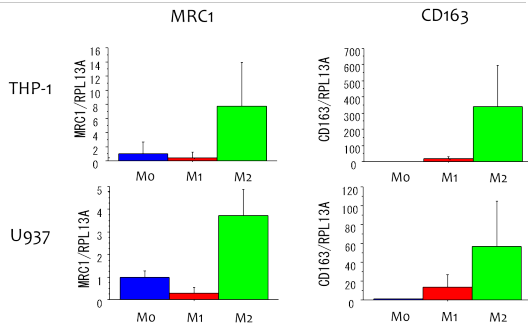
図2. M2マクロファージと予後との関連



結果 2) *in vitro* でのマクロファージの分化誘導

マクロファージは一般に、腫瘍抑制的に働く M1 マクロファージと腫瘍促進的に働く M2 マクロファージに大別されるが、腫瘍組織内に浸潤するマクロファージの多くは M2 マクロファージであるとされる。そこで我々は、単球系白血病細胞である THP-1 細胞および U937 細胞をインターロイキン (interleukin) 4 (IL-4) およびデキサメサゾン (Dex) にて刺激し、M2 マクロファージへと分化させて乳癌細胞と共培養することで実際の乳癌組織の環境を模倣することを試みた。図 3 に示す通り、Dex および IL-4 で分化させた THP-1 細胞において M2 マクロファージのマーカーである MRC1 および CD163 が高発現していた。

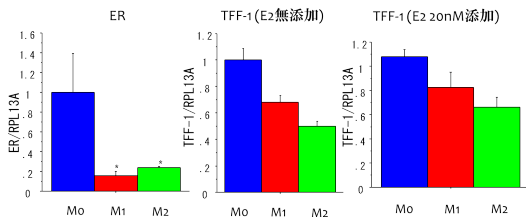
図3. THP-1およびU937細胞におけるM2マクロファージマーカーの発現



結果 3) M2 マクロファージによる乳癌細胞のエストロゲン作用の低下

上記の方法で分化させた M2 マクロファージと乳癌培養細胞 MCF-7 を共培養し、MCF-7 におけるエストロゲン受容体 (ER) およびエストロゲン応答遺伝子である TFF-1 の発現をリアルタイム PCR にて評価した。図 4 に示す通り、M2 マクロファージとの共培養によって MCF-7 における ER および TFF-1 の発現が有意に抑制されていた。

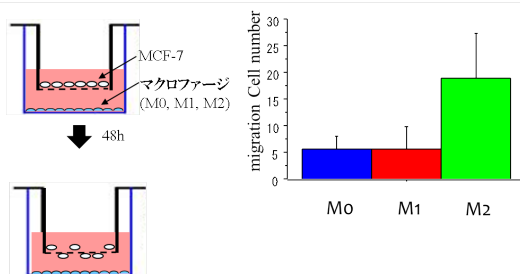
図4. マクロファージとの共培養によるエストロゲン受容体およびエストロゲン応答遺伝子の発現の変化



結果 4) M2 マクロファージによる乳癌細胞の運動能の亢進

細孔を有する培養チャンバーに MCF-7 を播種し、下層で M2 マクロファージ培養した。48 時間後に M2 マクロファージ側 (培養した面の反対側) に移動した細胞の数を計測し、運動能の評価を行った。その結果、M2 マクロファージへと分化させた THP-1 および U937 細胞との共培養により MCF-7 細胞の運動能が有意に亢進することが分かった (図 5)。

図5. M2マクロファージによる乳癌細胞の運動能の亢進



考察

乳癌組織内に浸潤する免疫細胞を免疫組織化学法により同定してその意義を解析下ところ、マクロファージが ER 陽性乳癌の悪性度と関連し、高異型タイプの乳癌にマクロファージの浸潤が多くみられ、そのような症

例は再発しやすく補助療法耐性にも関与していることが示唆された。

マクロファージは一般に M1 マクロファージと M2 マクロファージの 2 種類に大別されるが、腫瘍組織に見られるマクロファージの多くは M2 マクロファージと言われる。そこで我々は今回、単球系白血病培養細胞 2 株を用いて M2 マクロファージに分化させて乳癌細胞と共培養し、両者の相互作用を解析することを試みた。その結果、M2 マクロファージとの共培養により乳癌細胞の運動能が亢進する一方、エストロゲン依存性が低下することが分かった。一般に乳癌の大部分はエストロゲン依存性の性質を示すが、このような乳癌は比較的悪性度が低く、予後も良好といわれる。今回の結果より、M2 マクロファージとの相互作用によって乳癌細胞はより高い悪性形質、すなわちエストロゲンに依存しない増殖経路を獲得し、その結果としてエストロゲン依存性が低下するものと考えられた。このことは近年問題となっている乳癌の内分泌療法耐性にマクロファージが関与することを示唆しており、乳癌組織に浸潤する M2 マクロファージが新規治療標的となる可能性を示唆するものである。

今後は症例数を増やした病理組織学的解析を行うとともに、マウス等を用いた実験により in vitro で得られた知見を別角度から検証する必要があると考えられた。また、現在臨床で用いられている内分泌療法薬や化学療法薬の奏効性と M2 マクロファージの関連を明らかにすることで、より適切な乳癌治療薬の選択に向けた提案をしていきたいと考えている。

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 4 件)

1. Takagi K, Miki Y, Tanaka S, Hashimoto C, Watanabe M, Sasano H, Ito K, Suzuki T. Nucleobindin 2 (NUCB2) in human endometrial carcinoma: a potent prognostic factor associated with cell proliferation and migration. *Endocr J.* 2016 Mar 31;63(3):287-99. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0490. (査読有)

2. Minemura H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Nakagawa S, Ebata A, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. Abnormal expression of miR-1 in breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 2015 Nov;106(11):1642-50. doi: 10.1111/cas.12808. (査読有)

3. Takagi K, Miki Y, Nakamura Y, Hirakawa H, Kakugawa Y, Amano G, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. Immunolocalization of thymidylate synthase as a favorable prognostic marker in estrogen

receptor-positive breast carcinoma. *Histol Histopathol.* 2015 Oct;30(10):1223-32. doi: 10.14670/HH-11-619. (査読有)

4. Takayama KI, Misawa A, Suzuki T, Takagi K, Hayashizaki Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S, Urano T, Inoue S. TET2 repression by androgen hormone regulates global hydroxymethylation status and prostate cancer progression. *Nat Commun.* 2015 Sep 25;6:8219. doi: 10.1038/ncomms9219. (査読有)

5. Yoda T, Kikuchi K, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Takagi K, Nakamura Y, Hirakawa H, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H, McNamara KM. 11 β -Prostaglandin F₂, a bioactive metabolite catalyzed by AKR1C3, stimulates prostaglandin F receptor and induces slug expression in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Sep 15;413:236-47. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.008. (査読有)

6. Yoda T, McNamara KM, Miki Y, Onodera Y, Takagi K, Nakamura Y, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H. KLF15 in breast cancer: a novel tumor suppressor? *Cell Oncol (Dordr).* 2015 Jun;38(3):227-35. doi: 10.1007/s13402-015-0226-8. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 峯村洋行、高木清司、三木康宏、柴原裕紀子、中川紗紀、江幡明子、渡辺みか、石田孝宣、笹野公伸、鈴木貴 「乳癌における miR-1 の発現意義と、予後因子としての可能性」第 74 回日本癌学会 パシフィコ横浜(横浜)(2015 年 10 月 8-10 日)

2. 高木清司、峯村洋行、高橋光、中村保宏、石田孝宣、笹野公伸、鈴木貴 「乳癌における CITED2 の発現意義」第 73 回日本乳癌学会 パシフィコ横浜(横浜)(2015 年 10 月 8-10 日)

3. 櫻井美奈子、河原由依、三木康宏、高木清司、鈴木 貴、石田孝宣、大内憲明、笹野公伸 「乳癌微小環境における癌と脂肪細胞の相互作用に關与する LCN2 の役割」第 88 回日本内分泌学会 ホテルニューオータニ東京(東京)(2015 年 4 月 23-25 日)

4. 小野寺好明、高木清司、三木康宏、中村保宏、渡辺みか、石田孝宣、笹野公伸、井上聡、鈴木 貴 「乳癌組織における Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2(TACC2)の免疫局在」第 73 回日本癌学会 パシフィコ横浜(横浜)(2014 年 9 月 25-27 日)

5. 依田智美、McNamara Keely M、三木康宏、高木清司、鈴木貴、笹野公伸 「ステロイドホルモン合成酵素 AKR1C3 は 11 β -Prostaglandin F₂ の産生に寄与し、乳癌の悪化に關わる」第 73 回日本癌学会 パシ

フィコ横浜(横浜)(2014 年 9 月 25-27 日)

6. 佐藤章子、鈴木貴、甘利正和、高木清司、三木康宏、玉城研太朗、渡辺みか、石田孝宣、笹野公伸、大内憲明 「浸潤性乳管癌における HIF-1 誘導遺伝子群の再発予測因子の検討」第 22 回日本乳癌学会 大阪国際会議場(大阪)(2014 年 7 月 10-12 日)

7. Kiyoshi Takagi, Yasuhiro Miki, Yoshiaki Onodera, Yasuhiro Nakamura, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Takashi Suzuki. Tumor suppressive roles of ARHGAP15 in human breast cancer. ICE/ENDO2014 Chicago (USA) (2014 年 6 月 21-24 日)

8. Yasuhiro Miki, Kiyoshi Takagi, Zhulanqiqige Doe, Sota Tanaka, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, Kiyoshi Ito. Intratumoral concentration of stress Hormone, cortisol in endometrial carcinoma. ICE/ENDO2014 Chicago (USA) (2014 年 6 月 21-24 日)

9. Tomomi Yoda, Keely M McNamara, Yasuhiro Miki, Kiyoshi Takagi, Takanori Ishida, Takashi Suzuki, Noriaki Ohuchi, Hironobu Sasano. 11 β -prostaglandin F₂ α produced by AKR1C3 stimulates FP-receptor and contributes to breast cancer progression. ICE/ENDO2014 Chicago (USA) (2014 年 6 月 21-24 日)

10. Minako Sakurai, Yasuhiro Miki, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano. Identification of signaling factors involved in an interaction between human breast carcinoma and adipocytes. ICE/ENDO2014 Chicago (USA) (2014 年 6 月 21-24 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 清司 (TAKAGI, Kiyoshi)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：80595562

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：