

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870364

研究課題名(和文) マクロファージとの異種細胞間相互作用を介した食道扁平上皮癌の発癌初期段階の解明

研究課題名(英文) Roles of macrophages in early esophageal carcinogenesis: analysis of cell-to-cell interaction between esophageal epithelial cells and macrophages

研究代表者

狛 雄一郎 (Koma, Yuichiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40714647

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)：食道扁平上皮癌の発癌初期段階にマクロファージが関与する可能性を検討するため、本研究ではヒト食道正常扁平上皮細胞株Het-1Aとヒト単球性白血病細胞株THP-1由来マクロファージとの間接共培養系を確立した。共培養後のHet-1Aでは増殖能・運動能が亢進し、これにはp38 MAP kinase経路の活性化やIL-6の分泌亢進が関与していた。食道扁平上皮癌の前癌病変である食道上皮内腫瘍でリン酸化p38 MAP kinaseとIL-6の免疫組織化学を施行したところ、一部の腫瘍細胞でこれらの分子が陽性となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established coculture assay system using immortalized human esophageal epithelial cells (Het-1A) and human acute monocytic leukemia cells (THP-1)-derived macrophages to study the roles of macrophages in esophageal carcinogenesis. Coculture of Het-1A cells with THP-1-derived macrophages induced Het-1A cell proliferation/migration and phosphorylation of p38 MAP kinase. In addition, IL-6 was significantly increased in coculture supernatants. Finally, positive immunoreactivity for phospho-p38 MAP kinase and IL-6 in neoplastic cells were observed in some cases of esophageal high grade intraepithelial neoplasias.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍関連マクロファージ 食道扁平上皮癌 食道上皮内腫瘍 p38 MAPキナーゼ インターロイキン6

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌組織内に浸潤しているマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) と呼ばれ、癌微小環境を構成する白血球の中で最も多い成分である。TAM は血管新生の誘導、細胞外基質の分解、腫瘍細胞の増殖能・運動能の促進などを介して癌進展に寄与する。マクロファージは免疫促進に働く M1 型と免疫抑制に働く M2 型に大別されるが、TAM は M2 型に類似した性質を示し、M2 型マクロファージマーカーである CD163 や CD204 を発現している。様々なヒト悪性腫瘍で TAM の浸潤数が多いほど予後不良である事が報告されており、当研究室でも食道扁平上皮癌において CD204 陽性の TAM の浸潤数が多い症例ほど生存率が低い事を明らかにしている。癌進展とマクロファージとの関連に言及した研究は多いが、発癌初期段階におけるマクロファージ浸潤に着目した研究は少ない。

2. 研究の目的

(1) 先行研究では、マクロファージ浸潤は生理的な食道粘膜ではほとんど見られないのに対し、食道扁平上皮癌の前癌病変 (食道上皮内腫瘍) の段階で既に観察される病的現象である事を見出していた。つまり、食道正常扁平上皮細胞から食道上皮内腫瘍への腫瘍化の過程にマクロファージが関与している可能性がある。本研究では、食道正常扁平上皮細胞とマクロファージとの異種細胞間相互作用を培養細胞系や臨床検体を用いて解析し、食道扁平上皮癌の発癌初期段階におけるマクロファージ浸潤の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道正常扁平上皮細胞株とマクロファージとの共培養実験系確立

ヒト食道正常扁平上皮細胞株として Het-1A、マクロファージとしてヒト単球性白血球由来細胞株 THP-1 を用いた。THP-1 を transwell (0.4 μm pore) の上層で TPA 処理によってまずマクロファージ様に分化させ、更に IFN-γ と LPS の添加で M1 型に、IL-4 の添加で M2 型に活性化させた。24-well もしくは 6-well プレートの下層で培養した Het-1A と間接共培養し、48 時間後の Het-1A の細胞増殖能を MTS アッセイ、各種シグナル伝達の変化をウェスタンブロッティングと蛍光免疫染色で検討した。また、24-well プレートの下層で THP-1 由来マクロファージを同様に調整し、transwell (8 μm pore) の上層に Het-1A を添加して間接共培養し、48 時間後に transwell 下面に移動した細胞数を計測する transwell migration assay で細胞運動能を検討した。

(2) ヒト食道正常扁平上皮細胞株とマクロファージとの異種細胞間相互作用を媒介す

る分子群の同定

Het-1A と THP-1 由来マクロファージの単独培養あるいは間接共培養の培養上清を回収した。まず、培養上清を western blot-based cytokine array に供し、得られた結果を ELISA と定量的 RT-PCR にて検討した。

(3) ヒト食道上皮内腫瘍の臨床検体を用いて上記で同定した分子群の発現を確認

神戸大学医学部附属病院で内視鏡的粘膜下層剥離術によって切除された 38 例の食道上皮内腫瘍症例のホルマリン固定パラフィン包埋病理組織切片に対し、抗リン酸化 p38 MAP kinase 抗体および抗 IL-6 抗体を用いて免疫組織化学を施行した。

4. 研究成果

(1) ヒト食道正常扁平上皮細胞株とマクロファージとの共培養実験系確立

マクロファージ様 (Mφ-like)、M1 型マクロファージ様 (M1-Mφ-like)、M2 型マクロファージ様 (M2-Mφ-like) に分化させた THP-1 と Het-1A との間接共培養系を確立した。間接共培養後の Het-1A の増殖能を MTS アッセイで検討したところ、THP-1 との間接共培養でも増殖能が亢進したが、Mφ-like、M1-Mφ-like、M2-Mφ-like との間接共培養ではさらなる増殖能亢進が見られた (図 1)。

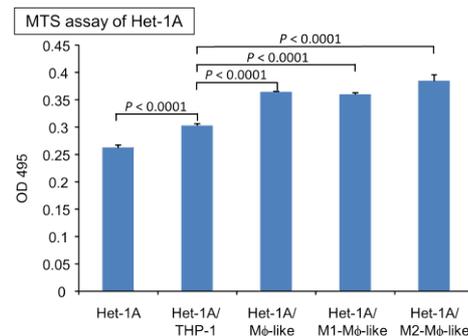


図1. THP-1由来マクロファージとの間接共培養によるHet-1Aの増殖能。

さらに、間接共培養後の Het-1A の運動能を transwell migration assay で検討したところ、Mφ-like との間接共培養では運動能の上昇傾向が見られ、M1-Mφ-like、M2-Mφ-like との間接共培養では有意に運動能が亢進した (図 2)。

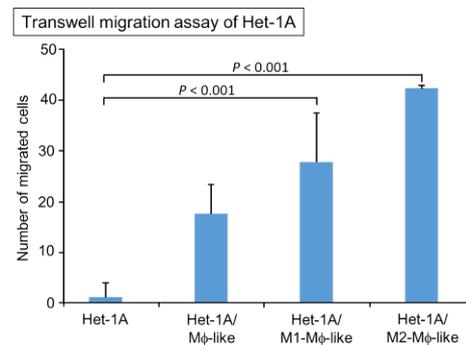


図2. THP-1由来マクロファージとの間接共培養によるHet-1Aの運動能。

次に、間接共培養後の Het-1A において活性化されている細胞内シグナル伝達経路をウェスタンブロッティングで検討したところ、Mφ-like、M1-Mφ-like、M2-Mφ-like との間接共培養では p38 MAP kinase のリン酸化が亢進していた (図3)。

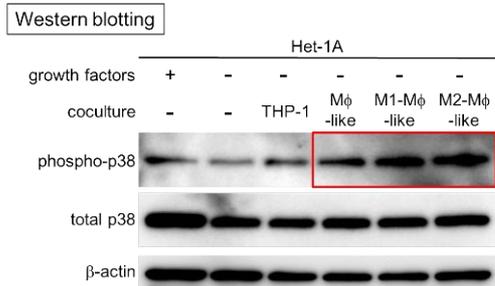


図3. THP-1由来マクロファージとの間接共培養によるHet-1Aの細胞内シグナル伝達。

これ以後、M2-Mφ-like との間接共培養系をモデルとして解析を進めた。蛍光免疫染色ではM2-Mφ-like との間接共培養後の Het-1A においてリン酸化 p38 MAP kinase の発現量亢進および核内移行を確認できた。また、M2-Mφ-like との間接共培養系に p38 MAP kinase 阻害剤を添加すると、Het-1A の増殖能・運動能亢進は濃度依存的に抑制された。

以上から、マクロファージ由来の液性因子によって食道正常扁平上皮細胞の p38 MAP kinase を介した増殖能・運動能亢進が誘導される事を見出した。

(2) ヒト食道正常扁平上皮細胞株とマクロファージとの異種細胞間相互作用を媒介する分子群の同定

「Het-1A の単独培養」、「M2-Mφ-like の単独培養」、「Het-1A と M2-Mφ-like との間接共培養」から回収した培養上清で western blot-based cytokine array を施行したところ、「Het-1A と M2-Mφ-like との間接共培養」の培養上清においてインターロイキン 6 (IL-6) のシグナルを検出した (図4)。

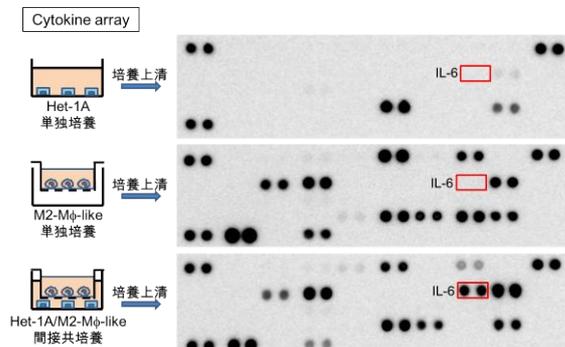


図4. Het-1AとTHP-1由来マクロファージとの間接共培養上清中のサイトカイン。

次に、同じ培養上清を用いて IL-6 の ELISA を行うと、確かに間接共培養上清中には IL-6 の分泌が亢進している事が分かった。IL-6 の主な産生源が Het-1A と M2-Mφ-like のどちらであるのかを、それぞれの単独培養後あるいは間接共培養後に mRNA を抽出し、IL-6 mRNA の定量的 RT-PCR で検討した。その結果、

Het-1A において間接共培養後に IL-6 mRNA の発現が著明に増加しており、間接共培養上清中の IL-6 の主な産生源が Het-1A である事を見出した。

さらには、M2-Mφ-like との間接共培養系に IL-6 に対する中和抗体を添加すると、Het-1A の増殖能亢進は有意に抑制された。

(3) ヒト食道上皮内腫瘍の臨床検体を用いて上記で同定した分子群の発現を確認

最後に、ヒト食道上皮内腫瘍症例を用いてリン酸化 p38 MAP kinase および IL-6 の免疫組織化学を施行したところ、約半数の症例で腫瘍細胞の一部に陽性所見が認められた (図5)。

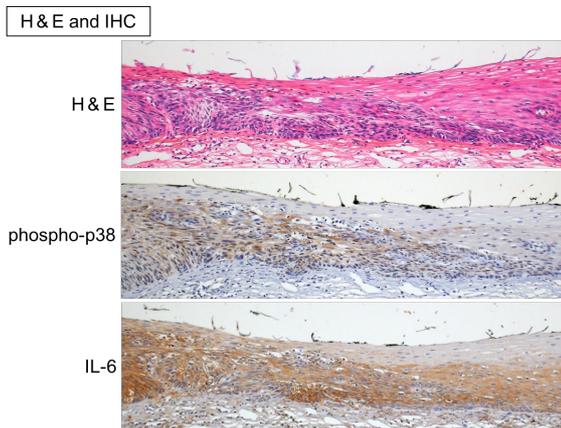


図5. ヒト食道上皮内腫瘍の免疫組織化学。

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5件)

横崎 宏, 粕雄一朗, 重岡 學, 西尾真理, 消化管がんの進展とがん間質, 別冊 Bio Clinica 慢性炎症とがん, 査読有, 5巻, 2016, 77-81

Nishio M, Urakawa N, Shigeoka M, Takase N, Ichihara Y, Arai N, Koma Y, Yokozaki H, Software-assisted morphometric and phenotype analyses of human peripheral blood monocyte-derived macrophages induced by a microenvironment model of human esophageal squamous cell carcinoma, Pathol Int, 査読有, 66巻, 2016, 83-93

DOI: 10.1111/pin.12381

Urakawa N, Utsunomiya S, Nishio M, Shigeoka M, Takase N, Arai N, Kakeji Y, Koma Y, Yokozaki H, GDF15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways, Lab Invest, 査読有, 95巻, 2015, 491-503

DOI: 10.1038/labinvest.2015.36

Yamamoto Y, Nishisaki H, Koma Y, Sawai H, Sakai A, Mimura T, Kushida S, Tsumura H, Sakamoto T, Tobimatsu K, Miki I, Sakuma T, Tsuda M, Mano M, Hirose T, Inokuchi H, Polypoid leiomyosarcoma of the esophagus treated by endoscopic submucosal dissection, *Dig Endosc*, 査読有, 27 巻, 2015, 700-703

DOI: 10.1111/den.12437

Shigeoka M, Urakawa N, Nishio M, Takase N, Utsunomiya S, Akiyama H, Kakeji Y, Komori T, Koma Y, Yokozaki H, Cyr61 promotes CD204 expression and the migration of macrophages *via* MEK/ERK pathway in esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Med*, 査読有, 4 巻, 2015, 437-446

DOI: 10.1002/cam4.401

〔学会発表〕(計 39 件)

Yu-ichiro Koma, Nobuhisa Takase, Noriaki Arai, Himiko Kodaira, Masayoshi Hosono, Yumi Ichihara, Mari Nishio, Manabu Shigeoka, Hiroshi Yokozaki, Infiltrating macrophages may promote early esophageal carcinogenesis *via* p38 MAP kinase and IL-6 signaling, Tenth AACR-JCA Joint Conference, 2016 年 2 月 18 日, Maui(アメリカ合衆国)

狛 雄一郎, 高瀬 信尚, 荒井 慎明, 小平 日実子, 細野 雅義, 市原 有美, 西尾 真理, 重岡 學, 横崎 宏, マクロファージによる p38 MAP キナーゼおよび IL-6 の活性化は食道癌の発癌初期段階を促進する, 第 74 回日本癌学会学術集会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

狛 雄一郎, 高瀬 信尚, 荒井 慎明, 宇都宮 壮顕, 市原 有美, 西尾 真理, 裏川 直樹, 重岡 學, 横崎 宏, マクロファージによる p38 MAP キナーゼの活性化は食道癌の発癌初期段階を促進する, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 5 月 1 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

狛 雄一郎, 高瀬 信尚, 荒井 慎明, 宇都宮 壮健, 市原 有美, 西尾 真理, 裏川 直樹, 重岡 學, 横崎 宏, マクロファージによる p38 MAP kinase カスケードの活性化は食道癌の発癌初期段階を促進する, 第 73 回日本癌学会学術総会,

2014 年 9 月 25 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

狛 雄一郎, 高瀬 信尚, 荒井 慎明, 宇都宮 壮健, 市原 有美, 西尾 真理, 裏川 直樹, 重岡 學, 横崎 宏, マクロファージによる p38 MAP kinase カスケードの活性化は食道癌の発癌初期段階を促進する, 第 34 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2014 年 9 月 24 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

狛 雄一郎, 高瀬 信尚, 宇都宮 壮健, 西尾 真理, 裏川 直樹, 重岡 學, 綿島 健人, 仙波 秀峰, 横崎 宏, ヒト食道扁平上皮癌の発癌初期段階におけるマクロファージの機能解析, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 25 日, 広島国際会議場(広島県広島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狛 雄一郎(KOMA, Yuichiro)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 40714647