

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K10690
 研究課題名(和文) 腫瘍関連マクロファージを介した膵癌の腫瘍微小環境形成機序の解明および臨床的意義

研究課題名(英文) Elucidation and clinical significance of tumor microenvironmental mechanism of pancreatic cancer through tumor-associated macrophages

研究代表者
 高野 可赴 (Takano, Kabuto)
 新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：30606306
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の腫瘍進展に腫瘍関連マクロファージとマクロファージ遊走阻止因子(MIF)が関与していると考え、通常型膵癌67例を対象としMIFについて免疫染色の結果と生存解析について検討した。MIF発現と治療成績について、生存期間中央値はMIF高発現26.2か月、MIF低発現59.6か月($p = 0.035$)と有意にMIF高発現の方が治療成績が不良であった。全生存期間に対する多変量解析では、MIF高発現は独立した予後不良因子であった($p = 0.022$, HR 2.613, 95%信頼区間：1.151-5.928)。以上の結果から、通常型膵癌切除例におけるMIF発現は独立した予後不良因子である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、膵癌の腫瘍微小環境については十分に解明されておらず、膵癌患者の病理標本を使った臨床的なアプローチにより解析することである。
 本研究の社会的意義は、macrophage migration inhibitory factor を膵癌における予後予側因子の新しいバイオマーカーとして確立する契機になることである。また、膵癌腫瘍細胞におけるMIF発現と予後との関連を解析することで、膵癌の腫瘍微小環境形成機序に新たな視点で解釈をすることが可能であり、新たな膵癌治療方法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the prognostic significance of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). A retrospective analysis was conducted of 67 patients who underwent surgical resection for PDAC. Immunohistochemistry using anti-MIF monoclonal antibody was performed. Overall survival (OS) after resection was significantly worse in patients who had tumors with MIF high expression (median survival time, 26.2 months) than in those who had tumors with MIF low expression (median survival time, 59.6 months; $p = 0.035$). MIF high expression was an independent adverse prognostic factor significantly associated with post-resection OS (hazard ratio 2.613; 95% CI 1.151-5.928; $p = 0.022$). MIF high expression indicates a poor prognosis for patients undergoing resection for PDAC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 腫瘍微小環境 マクロファージ遊走阻止因子 腫瘍関連マクロファージ 再発形式 肝再発

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦における悪性腫瘍の死因別で第4位であり、死亡者数は年々増加傾向にある。膵癌は浸潤・転移が早く、集学的治療を行っても未だ予後不良な癌である。申請者らはこれまで膵癌の腫瘍進展に腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage:TAM) が関与していると考え、関連因子の一つであるマクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor :MIF) ¹⁾ を中心に研究をおこなってきた。MIF は、腫瘍微小環境における TAM の集積や、血管内皮増殖細胞因子を介した腫瘍血管新生の促進に関与するほか、癌病巣において浸潤・転移などの癌進展に深く関わっている ^{2,3)}。

マクロファージは活性化する経路により異なる性質をもち M1 分化型と M2 分化型の 2 つに分類される ^{4,5)}。マクロファージはサブタイプにより大きく機能が異なっていると考えられ、ヒトの悪性腫瘍において M2 分化型 TAM は腫瘍の進展や転移を促進し抗腫瘍免疫を抑制していると考えられている ⁴⁾。

申請者らが行った pilot study では M2 分化型 TAM のマーカーである CD163、CD204 陽性細胞の密度は MIF 高発現群で有意に高く認められ、膵癌腫瘍細胞周囲では M2 分化型 TAM が優位であることを解明してきた。こうした背景・結果から「MIF、M2 分化型 TAM を介して膵癌の微小環境を形成し膵癌の悪性進展に関与している」(図1) という仮説を立て本研究を企画した。

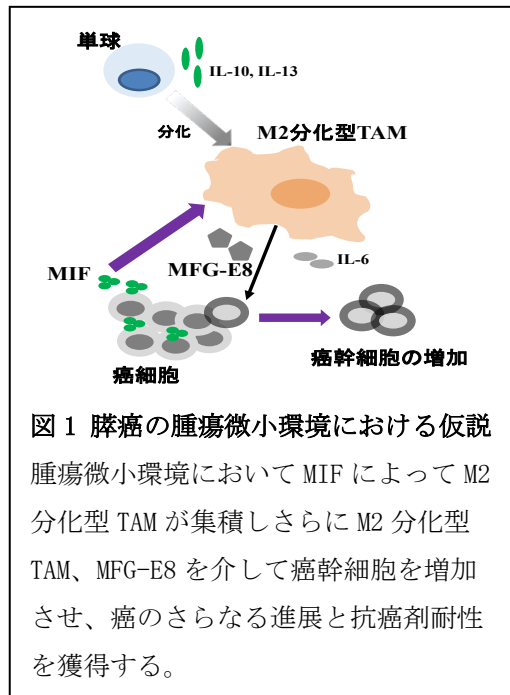


図1 膵癌の腫瘍微小環境における仮説
腫瘍微小環境において MIF によって M2 分化型 TAM が集積しさらに M2 分化型 TAM、MFG-E8 を介して癌幹細胞を増加させ、癌のさらなる進展と抗癌剤耐性を獲得する。

2. 研究の目的

本研究の目的は「MIF、M2 分化型 TAM を介した膵癌の腫瘍微小環境形成機序を解明し、新たな膵癌治療方法の開発への科学的基盤を確立する」ことである。膵癌における MIF の発現やその臨床的意義は明らかではなく、膵癌切除症例における MIF の発現と治療成績について検討した。

3. 研究の方法

2001 年から 2013 年までに術前治療を行わずに治癒切除を企図した通常型膵癌 67 例 (R0 55 例, R1 12 例) を対象とした。臨床病理学的因子は AJCC 第 8 版に準拠した。観察期間中央値は 32 か月、対象症例のリンパ節転移陽性例は 41 例、病期は Stage IA/IB/IIA/IIB/III/IV は 5/12/6/26/7/11 例であった。ホルマリン固定、パラフィン包埋ブロック標本を用い、MIF (1:400; MAB 289, R&D Systems)、M2 分化型 TAM のマーカーである CD163 (1:200; 10D6, Novocastra)、CD204 (1:200; SRA-E5; Transgenic) のモノクローナル抗体を用い免疫組織化学染色にて検討した。MIF 発現は膵組織内のラ氏島細胞を positive control⁶⁾ とし、染色陽性範囲により、<10% を grade0、10% から 50% を grade1、50% を grade2 と分類した。MIF 発現について、grade0、1 を MIF 低発現、grade2 を MIF 高発現と大別し⁷⁾、2 群間で臨床病理学的因子、患者予後との関連について後方視的に統計学的な解析を行った。

MIF 発現を確認後、さらに連続切片標本で CD163、CD204 の免疫組織化学染色を行い、膵癌の腫瘍細胞周囲における M2 分化型 TAM の密度について検討した。低倍率で腫瘍周囲に浸潤したマクロファージの密度が高い部位を 5 視野検索し、400 倍 1 視野あたりのマクロファージ数をカウントし平均値 (個/mm²) を算定し、M2 分化型 TAM の密度と MIF 発現を解析した。

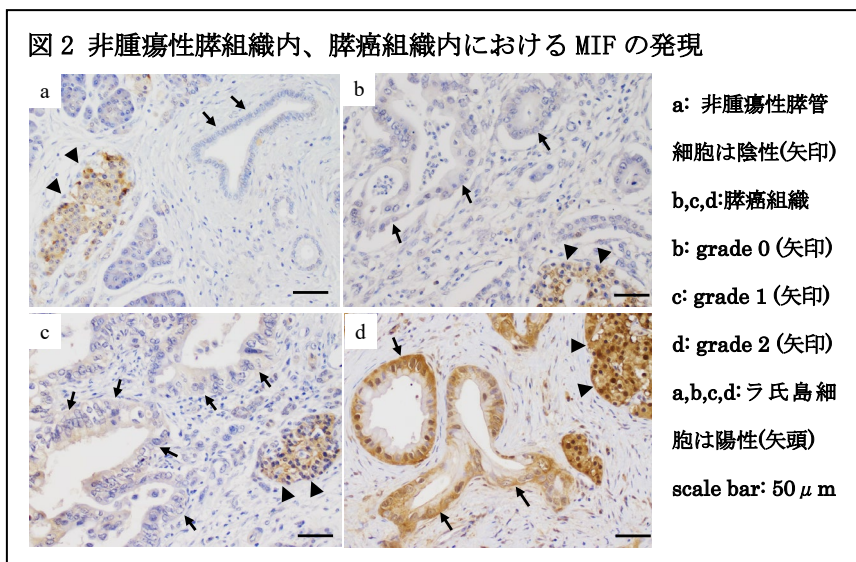


図2 非腫瘍性膵組織内、膵癌組織内における MIF の発現

a: 非腫瘍性膵管
細胞は陰性(矢印)
b,c,d:膵癌組織
b: grade 0 (矢印)
c: grade 1 (矢印)
d: grade 2 (矢印)
a,b,c,d: ラ氏島細胞は陽性(矢頭)
scale bar: 50 μm

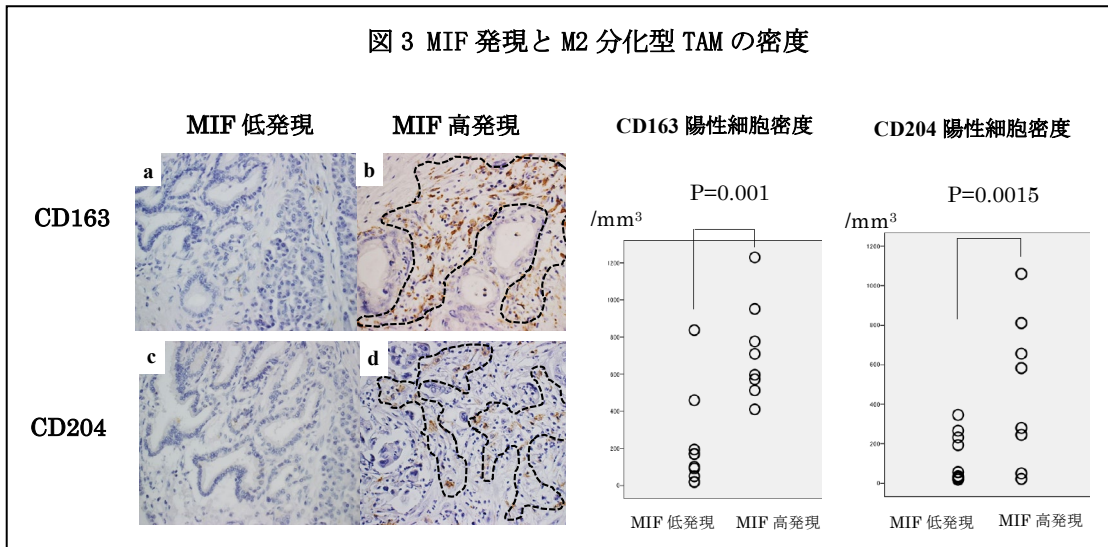
4. 研究成果

(1) 膵癌における MIF 発現と臨床病理学的因子、再発形式との関連

非腫瘍性膵管上皮では MIF の発現を認めず、癌組織では主に腫瘍細胞の細胞質内に発現を認めた(図 2)。免疫組織化学染色による MIF 発現は grade0 が 9 例、grade1 が 7 例、grade2 が 51 例であり、MIF 高発現 51 例(grade2)、MIF 低発現 16 例(grade1 以下)であった。MIF 発現と有意な関連を認める臨床病理学的因子はなかった。しかし、初再発形式の肝再発を認めた症例は MIF 高発現群 18 例、MIF 低発現群 1 例であり、MIF 高発現群で有意に頻度が高かった($p = 0.028$)。

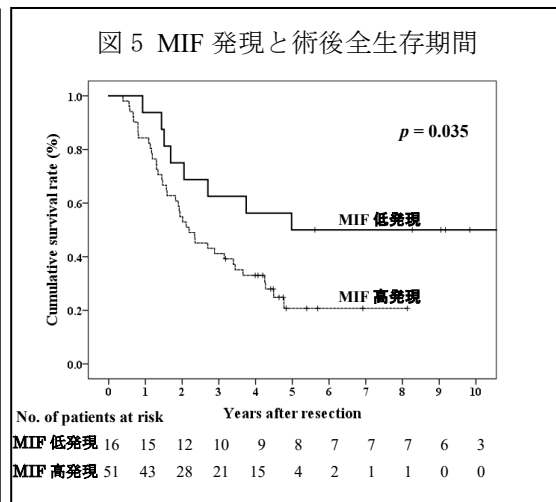
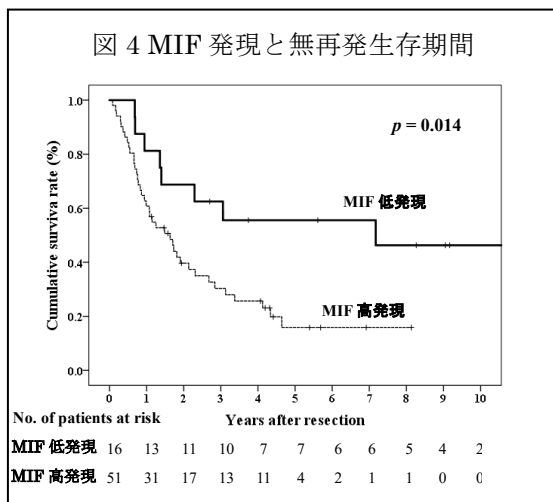
(2) MIF 発現と M2 分化型 TAM の密度

CD163 陽性の M2 分化型 TAM および CD204 陽性の M2 分化型 TAM はいずれも MIF 低発現に比べ MIF 高発現で有意に高密度であった(CD163; $p=0.001$, CD204; $p=0.015$ 、図 3)。



(3) MIF 発現と膵癌切除後の患者予後

単変量解析では、MIF 高発現群と MIF 低発現群の無再発生存期間の中央値は各々19.6 か月、51.9 か月 ($p = 0.014$)、生存期間中央値は各々26.2 か月、59.6 か月 ($p = 0.035$)と有意に MIF 高発現群の方が MIF 低発現群に比べ治療成績が不良であった(図 4, 5)。



(4) 膵癌における MIF 発現、臨床病理学的因子と患者予後

単変量解析では、MIF 発現の他、病理学的 M 因子、T 因子、リンパ管侵襲、癌遺残度、年齢が術後全生存期間に関連する因子であった。これら 5 因子と MIF 発現を共変量とした多変量解析を行った結果、病理学的 M 因子 (HR 2.592; 95% CI 1.247-5.388; $p=0.011$)、MIF 発現 (HR 2.613; 95% CI 1.151-5.928; $p=0.022$)、年齢 ≤ 65 (HR 1.937; 95% CI 1.033-3.631; $p=0.039$)、リンパ管侵襲 (HR 2.766; 95% CI 1.420-5.390; $p=0.030$) が独立した予後不良因子であった。

【結論】以上の結果から、治癒切除を企図した通常型膵癌症例における MIF 発現は術後の肝再発に関連することが示唆され、また、独立した予後不良因子であることが明らかになった。

【引用文献】

- 1) Bloom BR, et al. *Science* 1996;153:80-82.
- 2) Rendon BE, et al. *Exp Mol Pathol* 2009;6:180-185.
- 3) Costa-Silva B, et al. *Nat Cell Biol* 2015;17:816-826.
- 4) Martinetz FO, et al. *J Immunol* 2006;177:7303-7311.
- 5) Kurahara H, et al. *J Surg Res* 2009; 167: 211-219.
- 6) Tan L, et al. *J Transl Med.* 2014;12:92.
- 7) Ren Y, et al. *Ann Surg.* 2005;242:55-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kabuto Takano, Jun Sakata, Yuki Hirose, Kohei Miura, Hiroshi Ichikawa, Masayuki Nagahashi, Yoshifumi Shimada, Hitoshi Kameyama, Takashi Kobayashi, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Macrophage migration inhibitory factor expression predicts clinical outcomes in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 The 7th Biennial Congress of the Asian-Pacific-Hepato-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野可赴、滝沢一泰、坂田純、小林隆、若井俊文、安藤拓也、油座築、峠弘治、石川博補、三浦宏平、大橋拓、市川寛、羽入隆晃、永橋昌幸、石川卓、亀山仁史
2. 発表標題 膵癌切除例における Macrophage migration inhibitory factorの発現と治療成績
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	滝沢 一泰 (Takizawa Kazuyasu) (30706437)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	
研究分担者	小林 隆 (Kobayashi Takashi) (40464010)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi) (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究 分担者	坂田 純 (Sakata Jun) (70447605)	新潟大学・医歯学系・講師 (13101)	
研究 協力者	廣瀬 雄己 (Hirose Yuki)		
研究 協力者	島田 能史 (Shimada Yoshifumi)		
研究 協力者	亀山 仁史 (Kameyama Hitoshi)		
研究 協力者	堅田 朋大 (Katada Tomohiro)		
研究 協力者	安藤 拓也 (Ando Takuya)		