

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07056

研究課題名(和文) Ewing肉腫の癌微小環境におけるマクロファージ制御因子の役割の解明

研究課題名(英文) The elucidation of macrophage regulating factor in tumor microenvironment of Ewing sarcoma

研究代表者

飯田 圭一郎 (Iida, Keiichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70782621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：MCP-1安定過剰発現細胞株を作成し、ヌードマウス皮下に移植したところ、生着した腫瘍には浸潤血管が増加していた。腫瘍に浸潤したマクロファージを回収し、その解析をしたところ基質分解酵素の発現が上昇しており、そのことが血管新生に影響をもたらしている可能性が考えられた。マウスマクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞をMCP-1過剰発現細胞の培養上清にて培養したところ、基質分解酵素の発現が上昇し、この発現はMCP-1 inhibitorにて抑制された。これらのことから、Ewing肉腫細胞から産出されるMCP-1はマクロファージから基質分解酵素の産出を促し、血管新生を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established stable MCP-1 overexpressed EWS cell lines and transplanted to nude mice. The xenografts of MCP-1 overexpressed Ewing sarcoma(EWS) cells had more vascular invasion. The Tumor associated macrophages(TAMs) isolated from the xenograft of MCP-1 overexpressed EWS cells were analyzed and the expression of matrix protease was upregulated in the macrophage. When RAW 264.7, mouse macrophage like cell, was cultured by the culture supernatant of MCP-1 overexpressed EWS cells, the expression of matrix protease was increased and the expression was suppressed by the MCP-1 inhibitor. These findings indicate the secretion of MCP-1 from EWS cells promotes the expression of matrix protease from TAM and induce angiogenesis in tumor microenvironment.

研究分野：整形外科

キーワード：マクロファージ Ewing肉腫 がん微小環境 血管新生

1. 研究開始当初の背景

がん細胞を取り巻くがん微小環境は腫瘍の成長に重要な役割をはたすことがわかっている。マクロファージはがん微小環境を構成する細胞の一種であり、**腫瘍随伴マクロファージ Tumor associated macrophage (TAM)**は血管因子の産出、細胞外基質の改変などを介し腫瘍の成長に関わっているとされる。

Ewing 肉腫は主に小児、若年者に発生する高い炎症反応を特徴とした悪性骨腫瘍であり、骨髄炎との鑑別が問題となることもある。申請者らは Ewing 肉腫において炎症反応と TAM の浸潤は相関関係にあり、両者は予後不良因子の一つであることを証明した (Fujiwara T et al. Am J Pathol. 2011)。このことは腫瘍から産出されるマクロファージ制御因子が Ewing 肉腫の患者の予後に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein-1) は炎症性サイトカインの一種であり、ある種の癌細胞では恒常的に産出が認められており、単球の遊走を引き起こすことが知られている。Ewing 肉腫細胞株においてその発現を調べたところ、その発現は細胞株により異なっており (図 1)、腫瘍の産出する MCP-1 がマクロファージの浸潤と炎症反応の亢進を引き起こし、Ewing 肉腫の予後と関連している可能性が考えられた。

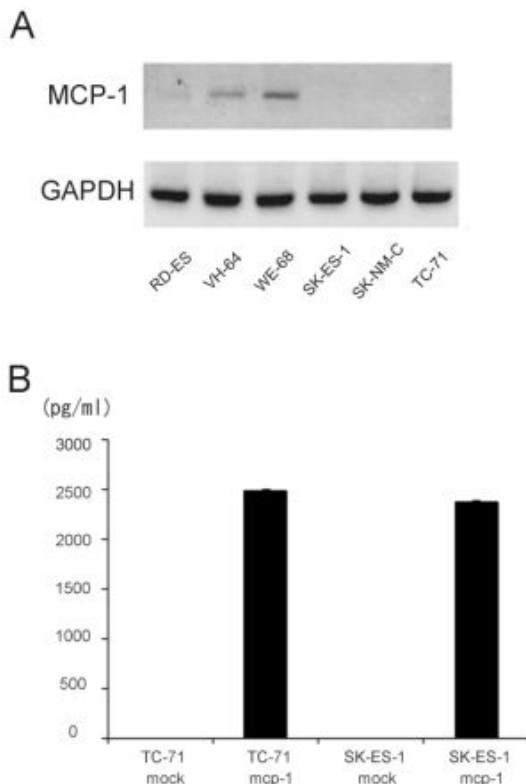


図 1

図 1

A Ewing 肉腫各種細胞株における MCP-1 の発現

上:RT-PCR 下:ELISA

Ewing 肉腫において MCP-1 の発現は細胞株において異なっている

B MCP-1 安定発現細胞株作成

MCP-1 が発現していない TC-71, SK-ES-1 にレンチウイルスを用いて MCP-1 を過剰発現させた。

我々は安定発現細胞株作成の実験系を確立させており (Iida K et al. Cancer Cell Int. 2013)、MCP-1 過剰発現細胞株を作成し、xenograft モデルにてその成長の比較、解析を行うことにより、腫瘍から産出される MCP-1 のがん微小環境におけるマクロファージを介した作用について解明することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は炎症性サイトカインの一種であり、マクロファージ制御因子でもある MCP-1 に着目し、Ewing 肉腫のがん微小環境における MCP-1 の役割をマクロファージとの相互関係から明らかにすることである。本研究により Ewing 肉腫のがん微小環境を標的とした新たな分子標的治療の可能性を開くことが期待される。

3. 研究の方法

・マウスの皮下に移植した Ewing 肉腫細胞株 (MCP-1 過剰発現細胞株、親株) に浸潤したマクロファージを回収し網羅的解析を行い、腫瘍促進因子の産出を調べる。

・In vivo における腫瘍とマクロファージの相互関係が In vitro においても再現されることを証明し、MCP-1 inhibitor にてその相互関係が抑制されることを証明する。

・Ewing 肉腫の臨床サンプル (凍結サンプル) を用いて MCP-1 発現量と炎症反応 (白血球数、C 反応性蛋白)、予後との関連を調査する。

4. 研究成果

MCP-1 を Ewing 肉腫細胞株に安定過剰発現させ、ヌードマウス皮下に移植し、生着した腫瘍を病理切片で確認したところ、腫瘍内浸潤血管の増加が確認された(図 2)。腫瘍からマクロファージを回収し解析したところ、基質分解酵素の発現が上昇しており、腫瘍から産出される MCP-1 ががん微小環境の中でマクロファージの質的変化をおこし、血管新生が誘導されることが示唆された。しかしながら、腫瘍の成長速度、転移能といった表現型においては**有意な差を見出すことができなかった**。マウスマクロファージ様細胞である RAW 細胞を MCP-1 過剰発現細胞の培養上清にて培養したところ、基質分解酵素の発現が上昇し(図 3)、この発現上昇は MCP-1 inhibitor に**抑制された**。これらのことから、腫瘍から産出される MCP-1 は**マクロファージから基質分解酵素の産出を促し、血管新生を誘導する可能性が示唆された**。

臨床サンプルにおける解析はまだ実施ができていない。

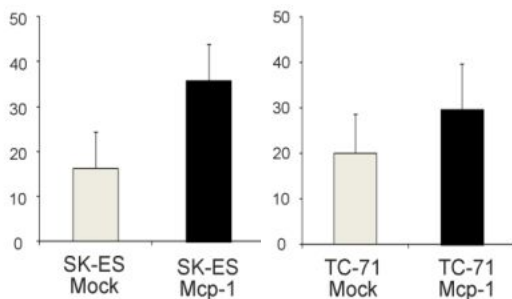
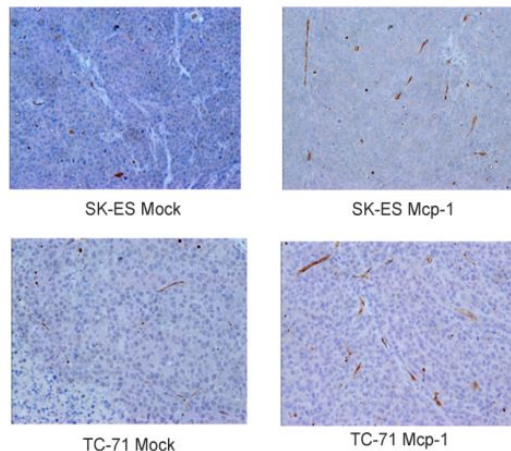


図 2

図 2

上：CD34 免疫染色

下：CD34 陽性細胞数

CD34 免疫染色にて腫瘍に浸潤した血管数を計測。

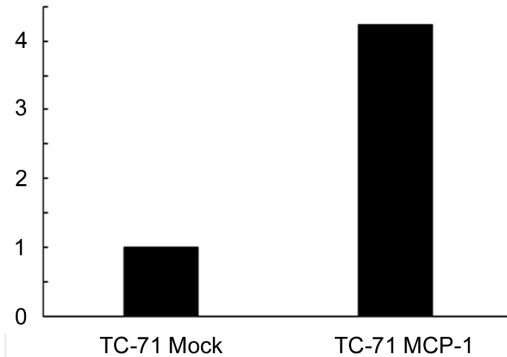


図 3

RT-PCR

RAW 264.7 細胞を MCP-1 過剰発現細胞培養上清にて培養 基質分解酵素の発現を比較

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

八尋健一郎(飯田圭一郎)

Ewing 肉腫において MCP-1 はマクロファージを介し血管新生を誘導する
第 50 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田圭一郎(Iida Keiichiro)
九州大学病院・整形外科・助教
研究者番号：70782621

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし