

令和元年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08645

研究課題名(和文)性ホルモンによる乳癌組織内マクロファージの分化制御を探索

研究課題名(英文)Polarization of breast cancer-associated macrophages by intratumoral sex-steroids

研究代表者

高木 清司 (Takagi, Kiyoshi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80595562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織浸潤マクロファージと乳癌局所で合成されるアンドロゲンとの関連を解析した。免疫染色の結果、マクロファージの浸潤はアンドロゲン合成酵素が高発現する症例において強い予後不良因子となり、アンドロゲンがマクロファージの悪性形質を増強させる可能性が示唆された。一方、単球系白血病細胞THP-1から分化させたマクロファージにアンドロゲンを暴露したところ、ケモカインであるCCL5の発現が亢進した。また、CCL5によって乳癌培養細胞MCF-7の浸潤能が亢進した。

以上より、マクロファージにアンドロゲンが作用してCCL5の発現が誘導され、乳癌細胞の浸潤能が亢進することにより転移・再発をきたすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はアンドロゲン受容体が乳癌組織浸潤マクロファージに発現することを初めて明らかにし、マクロファージの悪性形質においてアンドロゲンが重要であることを示した。これはが間質細胞におけるアンドロゲンの重要性を示唆する重要な知見である。また、その分子メカニズムとしてCCL5の発現誘導による浸潤能の亢進が示唆され、CCL5が乳癌の治療標的となる可能性が示唆された。

一方、マクロファージの浸潤は様々な固形腫瘍においてみられ、腫瘍内アンドロゲン合成は前立腺癌や子宮内膜癌でも報告されている。したがって、本研究の知見はこれらの腫瘍においても応用可能と考えられ、横断的な研究という発展性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that macrophages express androgen receptors. Therefore, we focused on the relationship between cancer-associated macrophages and intratumoral androgen in breast cancer tissues. Immunohistochemistry demonstrated that androgen receptors were expressed in breast cancer-associated macrophages. Macrophage infiltration was correlated with shorter disease-free and breast cancer-specific survival, especially in the cases positive for androgen-producing enzymes. When we treated THP-1-derived macrophages with R1881, synthetic androgens, expression of CC motif chemokine 5 (CCL5) was significantly increased. Furthermore, recombinant CCL5 significantly promoted invasion of MCF-7 breast cancer cell line. We therefore concluded that breast cancer-associated macrophages expressed androgen receptor and androgen-induced CCL5 by macrophages caused invasion, angiogenesis and distant metastasis of breast cancer patients.

研究分野：分子腫瘍学、病理学、内分泌学

キーワード：乳癌 マクロファージ アンドロゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌局所では活性型性ホルモンが合成され、エストロゲンやアンドロゲンが乳癌の進展に関与している。そして、乳癌細胞における性ホルモン作用の分子機序が精力的に研究されてきた。一方で、乳癌を含む固形腫瘍では腫瘍細胞と間質細胞が共存し、腫瘍微小環境を構成する。しかしながら、性ホルモンが間質細胞にどのような影響を与えるのかは十分に明らかにされていない。

腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophages; TAMs) は腫瘍に浸潤するマクロファージであり、液性因子を介して乳癌細胞と相互作用し、乳癌の進展を助けていることが報告されている (Bingle et al. 2002)。近年、マクロファージが性ホルモン受容体を発現することが報告され、マクロファージが性ホルモンの作用を受けている可能性が示唆されている (Lai et al. 2009)。しかしながら、乳癌において TAMs の分化や活性化に与える性ホルモンの影響はほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

そこで今回我々は、TAMs の分化や活性化に性ホルモンが関わるのか否か、そしてどのように関わるのかを明らかにし、乳癌における性ホルモンの作用を腫瘍免疫学の観点から捉えることを目的とした。

3. 研究の方法

乳癌病理標本を用いて性ホルモン受容体や性ホルモン合成酵素、マクロファージの表面マーカー (CD163)、マクロファージから分泌される液性因子に対する免疫組織化学染色を行い、これらの蛋白の局在および発現意義を検討した。また、単球系白血病細胞 THP-1 から分化させたマクロファージおよび乳癌培養細胞 MCF-7 を用いて、マクロファージにおいて性ホルモンによって誘導される液性因子の探索およびその機能について検討を行った。

4. 研究成果

性ホルモン受容体に対する免疫組織化学の結果、乳癌細胞のみならず一部のマクロファージにアンドロゲン受容体が発現することを見出した (図 1)。一方、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体の発現は見られなかった (data not shown)。次に乳癌病理組織標本 116 例に対して

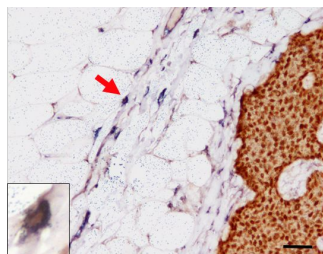


図1. 乳癌組織を用いたCD163 (マクロファージマーカー、青) とアンドロゲン受容体 (茶) の二重免疫染色 CD163/AR共陽性細胞を間質領域に認める

アンドロゲン合成酵素 (5 α -reductase type 1; 5 α Red1) およびマクロファージマーカーCD163 の免疫染色を行い、その意義を検討した。著名なマクロファージの浸潤を呈する症例は有意に再発しやすく予後不良であったが、この傾向は 5 α Red1 陽性症例において特に顕著であった (図 2)。また、5 α Red1 陽性症例においてマクロファージの浸潤とリンパ節転移の間に有意な正相関を認めた (表 1)。これらより、乳癌組織にはアンドロゲン受容体が発現してアンドロゲンの作用を受けていること、そしてアンドロゲンがマクロファージの悪性形質の形成に重要で、リンパ節転移や遠隔臓器転移を引き起こしている可能性が示唆された。

次に、免疫組織化学の結果から得られた上記仮説を検討するため、培養細胞を用いた機能解析を行った。単球系白血病細胞 THP-1 をデキサメサゾンで刺激してマクロファージに分化させ、アンドロゲン受容体の発現をウェスタンブロットにて解析した。その結果、M2 マクロファージ (TAMs にみられる分化形質) においてアンドロゲン受容体が発現することが分かった (図 3)。

次に、M2 型に分化させたマクロファージに合成アンドロゲン R1881 を暴露して蛋白を抽出し、ケモカインおよびサイトカインの発現を抗体アレイ

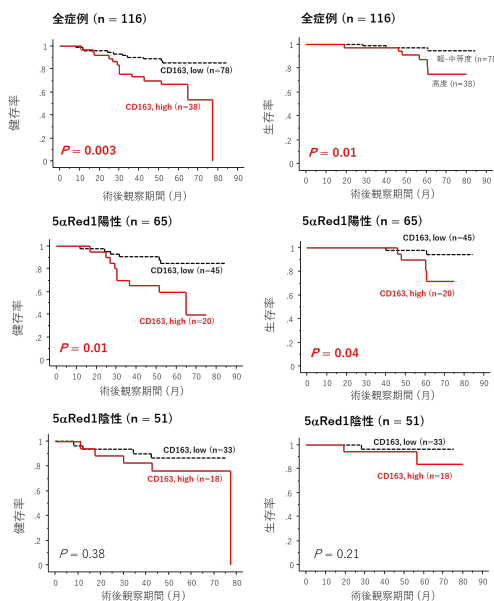


図2. CD163陽性細胞 (マクロファージ) の浸潤と予後との関連 (アンドロゲン合成酵素5 α Red1による層別解析) マクロファージの浸潤が著明な症例 (CD163, high) は有意に予後不良であった。5 α Red1陽性症例でその傾向は顕著だが、5 α Red1陰性例では有意な相関は得られなかった。

表1. マクロファージの浸潤とリンパ節転移の関連 (5 α Red1による層別解析)

	リンパ節転移	CD163, low	CD163, high	P値
全症例 (n = 116)	陰性	19	18	0.004
	陽性	19	60	
5 α Red1陽性 (n = 65)	陰性	12	12	0.01
	陽性	8	33	
5 α Red1陰性 (n = 51)	陰性	7	6	0.11
	陽性	11	27	

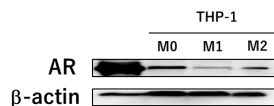


図3. THP-1から分化させたマクロファージにおけるアンドロゲン受容体 (AR) 蛋白の発現 いずれの形質においてもARが発現している。

にて検証した。その結果、アンドロゲン刺激によって CC motif chemokine 5 (CCL5)を含むいくつかの液性因子の発現が亢進した(図4)。

そこで、CCL5のリコンビナント蛋白を用いて浸潤能試験を行ったところ、CCL5によってMCF-7の浸潤能が有意に亢進することが分かった(図5)。さらに乳癌組織におけるCCL5の発現を免疫組織化学にて評価したところ、CCL5がマクロファージに発現し(図6) CCL5陽性症例は有意に異型度が高く、細胞増殖能(Ki67陽性率)が高い傾向にあることが分かった(表2)。

そこでCCL5の受容体のひとつであるC-C chemokine receptor type 5 (CCR5)の免疫組織化学染色を行い、その発現意義を検討したが、予想に反してCCR5陽性症例は有意に予後良好であった(図7)。これより、マクロファージにおいてアンドロゲンによって誘導されるCCL5は乳癌の進展を促進するが、その機序においてCCR5の関与は明確ではなく、その他の受容体の関与が示唆された。

表2. CCL5と組織学的異型度、増殖能 (Ki67陽性率) との関連

	CCL5, negative n = 73	CCL5, positive n = 40	P値
組織学的異型度			
1 (well)	33	11	
2 (intermediate)	31	13	
3 (poor)	9	16	0.003
Ki67陽性率*	9 (1-60)	16.5 (1-49)	0.057

*: 中央値 (最小値-最大値)

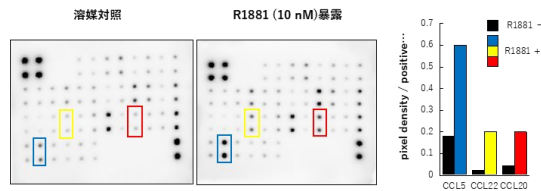


図4. THP-1由来マクロファージにおけるアンドロゲン誘導性液性因子の検索
合成アンドロゲンR1881 (10 nM)を暴露した後に蛋白を抽出し、液性因子の発現をケモカインアレイにて検証した。

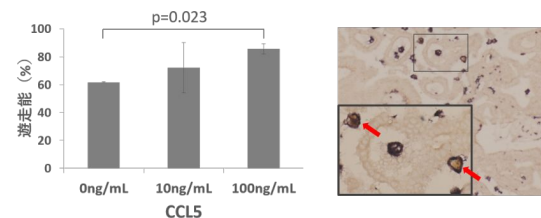


図5. CCL5による乳癌細胞MF-7の遊走能の亢進
リコンビナントCCL5の添加によって濃度依存的にMCF-7細胞の遊走が亢進した。

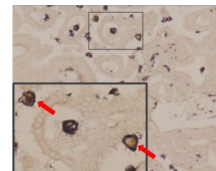


図6. CD163 (マクロファージマーカー、青)とCCL5 (茶)の二重免疫染色
CD163/CCL5共陽性細胞を乾漆領域に認める

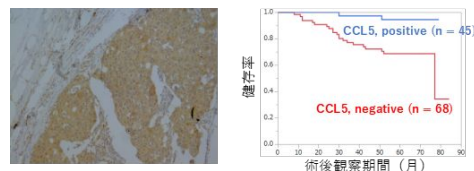


図7. 乳癌組織におけるCCR5の発現と予後との関連

CCR5の発現は乳癌細胞の細胞質に見られ、CCR5陽性症例は有意に予後良好であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

1. Mayama A, Takagi K, Suzuki H, Sato A, Onodera Y, Miki Y, Sakurai M, Watanabe T, Sakamoto K, Yoshida R, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. OLFM4, LY6D and S100A7 as potent markers for distant metastasis in estrogen receptor-positive breast carcinoma. *Cancer Sci.* 2018 Oct;109(10):3350-3359. doi: 10.1111/cas.13770. (査読あり)
2. Fue M, Miki Y, Takagi K, Hashimoto C, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K. Relaxin 2/RXFP1 Signaling Induces Cell Invasion via the β -Catenin Pathway in Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug 18;19(8). pii: E2438. doi: 10.3390/ijms19082438. (査読あり)
3. Takagi K, Miki Y, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. The interplay of endocrine therapy, steroid pathways and therapeutic resistance: Importance of androgen in breast carcinoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 May 5;466:31-37. doi: 10.1016/j.mce.2017.09.011. (査読あり)
4. Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T. ARHGAP15 in Human Breast Carcinoma: A Potent Tumor Suppressor Regulated by Androgens. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 10;19(3). pii: E804. doi: 10.3390/ijms19030804. (査読あり)
5. Hashimoto C, Miki Y, Tanaka S, Takagi K, Fue M, Doe Z, Li B, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K. 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression Is Induced by Androgen Signaling in Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 10;19(4). pii: E1139. doi: 10.3390/ijms19041139. (査読あり)
6. Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, Shimizu K, Kisu K, Suzuki S, Takagi K, Mizumoto S, Yamada S, van Kuppevelt TH, Yokoyama A, Matsusaka T, Sato H, Ito S, Sugawara A. The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion. *Nephrol Dial Transplant.* 2018 Jan 1;33(1):26-33. doi: 10.1093/ndt/gfx218. (査読あり)
7. Chishiki M, Takagi K, Sato A, Miki Y, Yamamoto Y, Ebata A, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. Cytochrome c1 in ductal carcinoma in situ of breast associated with proliferation and comedo necrosis. *Cancer Sci.* 2017 Jul;108(7):1510-1519. doi: 10.1111/cas.13251. (査読あり)
8. Sakurai M, Miki Y, Takagi K, Suzuki T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Interaction with adipocyte stromal cells induces breast cancer malignancy via S100A7 upregulation in breast cancer

microenvironment. Breast Cancer Res. 2017 Jun 19;19(1):70. doi: 10.1186/s13058-017-0863-0. (査読あり)

9. Nakayama S, Karasawa H, Suzuki T, Yabuuchi S, Takagi K, Aizawa T, Onodera Y, Nakamura Y, Watanabe M, Fujishima F, Yoshida H, Morikawa T, Sase T, Naitoh T, Unno M, Sasano H. p62/sequestosome 1 in human colorectal carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. Cancer Med. 2017 Jun;6(6):1264-1274. doi: 10.1002/cam4.1093. (査読あり)
10. Tsuji K, Utsunomiya H, Miki Y, Hanihara M, Fue M, Takagi K, Nishimoto M, Suzuki F, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K. Retinoic Acid Receptor β : A Potential Therapeutic Target in Retinoic Acid Treatment of Endometrial Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2017 May;27(4):643-650. doi: 10.1097/IGC.0000000000000995. (査読あり)
11. Katagiri M, Karasawa H, Takagi K, Nakayama S, Yabuuchi S, Fujishima F, Naitoh T, Watanabe M, Suzuki T, Unno M, Sasano H. Hexokinase 2 in colorectal cancer: a potent prognostic factor associated with glycolysis, proliferation and migration. Histol Histopathol. 2017 Apr;32(4):351-360. doi: 10.14670/HH-11-799. (査読あり)
12. Minemura H, Takagi K, Sato A, Takahashi H, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. CITED2 in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with proliferation, migration and chemoresistance. Cancer Sci. 2016 Dec;107(12):1898-1908. doi: 10.1111/cas.13081. (査読あり)
13. Hasegawa K, Tagawa M, Takagi K, Tsukamoto H, Tomioka Y, Suzuki T, Nishioka Y, Ohnishi T, Numasaki M. Anti-tumor immunity elicited by direct intratumoral administration of a recombinant adenovirus expressing either IL-28A/IFN-lambda2 or IL-29/IFN-lambda1. Cancer Gene Ther. 2016 Aug;23(8):266-77. doi: 10.1038/cgt.2016.29. (査読あり)
14. Onodera Y, Takagi K, Miki Y, Takayama KI, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Inoue S, Sasano H, Suzuki T. TACC2 (transforming acidic coiled-coil protein 2) in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. Cancer Med. 2016 Aug;5(8):1973-82. doi: 10.1002/cam4.736. (査読あり)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 三木 康宏, 吉田 伶奈, 高木 清司, 鈴木 貴, 伊藤 潔. 子宮内膜癌における Dehydroepiandrosterone の組織中濃度とその意義. 日本内分泌学会 2018 年 12 月
2. 岩淵 英里奈, 三木 康宏, 金井 綾子, 高木 清司, 鈴木 貴, 石田 孝宣, 笹野 公伸. 乳癌における Cytokeratin 19 の発現局在の検討. 日本組織細胞化学会総会・学術集会 2018 年 9 月
3. 吉田 伶奈, 三木 康宏, 高木 清司, 鈴木 貴, 伊藤 潔. 子宮内膜癌における Dehydroepiandrosterone (DHEA) の意義. 第 24 回特定非営利活動法人東北内分泌研究会 / 第 36 回日本内分泌学会東北地方会 2018 年 4 月 21 日
4. 山口美桜, 佐藤正康, 高木 清司, 石田孝宣, 笹野公伸, 鈴木貴. 乳癌組織浸潤マクロファージにおけるアンドロゲン作用. 第 24 回特定非営利活動法人東北内分泌研究会 / 第 36 回日本内分泌学会東北地方会 2018 年 4 月 21 日
5. 水戸部 悠一, 堀江 公仁子, 池田 和博, 高木 清司, 鈴木 貴, 井上 聡. 乳がんの増殖と生存に関わるエストロゲン応答性長鎖非コード RNA の役割. 日本内分泌学会 2017 年 12 月
6. 佐藤 正康, 高木 清司, 三木 康宏, 石田 孝宣, 笹野 公伸, 鈴木 貴. 乳癌組織における腫瘍随伴マクロファージに対するアンドロゲンの影響の解析. 日本癌学会総会 2017 年 9 月
7. 吉田 伶奈, 三木 康宏, 笹 未崎, 高木 清司, 鈴木 貴, 伊藤 潔. 子宮内膜癌における Dehydroepiandrosterone(DHEA) の作用. 日本癌学会総会 2017 年 9 月
8. 小野寺 好明, 高木 清司, 真山 晃史, 三木 康宏, 笹野 公伸, 鈴木 貴. 乳癌進行における OLFM4 の役割の検討. 日本癌学会総会 2017 年 9 月
9. 高木 清司, 保田伊織, 三木康宏, 石田孝宣, 笹野公伸, 鈴木貴. 乳癌における CLEC2D の発現意義. 第 22 回特定非営利活動法人東北内分泌研究会 / 第 34 回日本内分泌学会東北地方会 2017 年 4 月 15 日
10. 真山晃史, 鈴木博義, 高木 清司, 小野寺好明, 三木康宏, 渡邊隆紀, 坂元和宏, 吉田龍一, 石田孝宣, 笹野公伸, 鈴木貴. 乳癌組織における OLFM4 (olfactomedin 4) の発現意義. 第 22 回特定非営利活動法人東北内分泌研究会 / 第 34 回日本内分泌学会東北地方会 2017 年 4 月 15 日
11. 岩淵 英里奈, 三木 康宏, 高木 清司, 小野寺 好明, 柴原 裕紀子, 鈴木 貴, 笹野 公伸. 乳癌における carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 および 8 の発現意義の検討. 日本病理学会 2017 年 3 月
12. 笹 未崎, 三木 康宏, 高木 清司, 鈴木 貴, 伊藤 潔. 子宮内膜癌におけるリラキシンの影響. 日本癌学会総会 2016 年 10 月
13. 佐藤 和, 高木 清司, 三木 康宏, 石田 孝宣, 笹野 公伸, 鈴木 貴. 非浸潤性乳管癌に

- おける CYC1 の発現意義. 日本癌学会総会 2016 年 10 月
14. 岩淵 英里奈, 三木 康宏, 高木 清司, 小野寺 好明, 鈴木 貴, 笹野 公伸. 乳癌における carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-6 および-8 の相互作用の検討. 日本癌学会総会 2016 年 10 月
 15. 櫻井美奈子, 石際康平, 三木康宏, 高木清司, 鈴木貴, 笹野公伸. 乳癌微小環境における 27-hydroxycholesterol を介した癌細胞と脂肪細胞の相互作用. 第 17 回ホルモンと癌研究会 2016 年 6 月 24 日
 16. 三木康宏, 高木清司, 笹末崎, 鈴木貴, 笹野公伸, 伊藤潔. 子宮内膜癌組織におけるコルチゾールによる aromatase の誘導. 第 17 回ホルモンと癌研究会 2016 年 6 月 24 日
 17. Yasuhiro Miki, Misaki Fue, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, Kiyoshi Ito. Effect of intratumoral cortisol on aromatase expression in cancer stromal cells of endometrium. アメリカ内分泌学会 2016 年 4 月 1 日
 18. Minako Sakurai, Yasuhiro Miki, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano. A Potential Role of Endogenous SERM, 27-Hydroxy Cholesterol Synthesizing Enzyme, CYP27A1 in Breast Tumor Microenvironment. アメリカ内分泌学会 2016 年 4 月 1 日
 19. Kiyoshi Takagi. Increased Androgen Actions in Breast Carcinoma Following Aromatase Inhibitor Treatment. アメリカ内分泌学会 2016 年 4 月 1 日
 20. 櫻井 美奈子, 三木 康宏, 高木 清司, 鈴木 貴, 石田 孝宜, 大内 憲明, 笹野 公伸. 27-ヒドロキシコレステロール合成酵素である CYP27A1 の乳房腫瘍微小環境における役割 (The roles of 27-hydroxycholesterol synthesizing enzyme, CYP27A1 in breast tumor microenvironment) 日本病理学会 2016 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。