

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10865

研究課題名(和文) 腫瘍内微小環境におけるマクロファージスカベンジャー受容体CD163の機能解明

研究課題名(英文) Studies on the function of CD163, a macrophage scavenger receptor, in tumor microenvironment

研究代表者

白石 大偉輔 (Shiraishi, Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70769512

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)：近年、腫瘍微小環境におけるCD163陽性マクロファージの浸潤が腫瘍の予後や悪性度に関与していることが知られている。しかしながら、腫瘍進展におけるマクロファージCD163の機能に関する知見は得られていなかった。本研究にて、我々はマクロファージのCD163を介したIL-6分泌促進がマウスおよびヒトの悪性腫瘍において腫瘍進展に関与することを明らかにした。ゆえに、マクロファージのCD163がガンに対する新しい標的分子になりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージ(M<sub>2</sub>)CD163(ヘモグロピンスカベンジャー受容体)のヘモグロビン代謝以外の機能についてはほとんど明らかになっていなかった。近年、腫瘍内浸潤M<sub>2</sub>が注目されるようになり、様々な腫瘍では腫瘍組織中のCD163陽性M<sub>2</sub>の浸潤密度が高い症例ほど予後が悪いことからCD163の腫瘍増殖への関与が示唆されていた。本研究にてCD163の腫瘍増殖における役割が明らかになったことから、CD163をターゲットとした腫瘍の悪性度の診断や治療薬開発のための基礎的知見が得られ、将来的にガンに対する新しい治療戦略になる可能性が示唆されたため、学術的・社会的にも意義ある研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent findings have shown the significance of CD163-positive macrophages in tumor progression. However, there have been few studies on the functions of CD163 in macrophages. In the present study, we revealed that macrophage CD163-mediated IL-6 promotes tumor development and progression in murine and human malignant tumors, thus indicating that macrophage CD163 may be potentially new target molecule for tumor therapy.

研究分野：整形外科学

キーワード：マクロファージ CD163 腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージの活性化機構には、古典的活性化経路とオルタナティブ活性化経路が存在することが明らかとなってきた。すなわち Th1 サイトカイン刺激により炎症惹起性に機能する古典活性化マクロファージ (M1 マクロファージ) と、Th2 サイトカイン刺激により抗炎症性、組織修復性に機能するオルタナティブ活性化マクロファージ (M2 マクロファージ) の 2 種類に大別されている。

近年、これら 2 種類のマクロファージと病態との関連についても明らかになりつつあり、腫瘍においては、M2 マクロファージが腫瘍組織における血管新生を誘導し、IL-10 等の免疫抑制分子を産生することで抗腫瘍免疫を抑制し、逆に、M1 マクロファージは抗腫瘍免疫を活性化することで腫瘍の増殖を抑制することが知られている。

(M2 マクロファージマーカーとしての CD163) : M1/M2 マクロファージは、それぞれに表現形質も異なっており、M1 マクロファージでは TLR2 や TLR4 に加え CCR2 の発現が亢進し、M2 マクロファージでは CD163 や CD204 の発現が増強する。しかしながら、これらの表現形質が、それぞれのマクロファージの機能に果たす役割については不明な点が多く、特に、ヘモグロビンスカベンジャー受容体である CD163 の M2 マクロファージにおける機能に関しては、ほとんど明らかにされていない。

ゆえに、M2 マクロファージにおける CD163 の機能の解明がマクロファージ、特に CD163 をターゲットとしたマクロファージ関連疾患の新たな治療戦略の可能性の解明につながるものと考えられている。

## 2. 研究の目的

前述の通り、マクロファージの M1/M2 パラダイムの導入により、様々な病態において、マクロファージの活性化状態が再吟味され、種々の慢性炎症性疾患や粥状動脈硬化症などでは M1 活性化が優位で、炎症後の組織修復や腫瘍内浸潤マクロファージにおいては M2 活性化が優位であることがわかってきた。しかしながら、M1/M2 Mo それぞれから誘導される分子と、その機能との関連性及び、これらの分子が諸疾患に及ぼす影響については未解明の点が多い。そこで、本研究では M2 Mo で誘導される CD163 の腫瘍免疫における役割を調べることで、CD163 の新たな機能ならびにガン病態への関わりを解明し、将来的に臨床応用可能なマクロファージの活性化制御に基づく新規治療戦略の一助にすることを目的として、CD163 のマクロファージを介した腫瘍免疫における機能を明らかにすると共に、CD163 をターゲットとした新たなガン治療戦略の可能性を検証した。 検討項目を以下に示す。

- (1) CD163KO マウスを用いた腫瘍移植モデルでのマクロファージ CD163 の腫瘍進展における機能の解析
- (2) WT および CD163KO マクロファージを用いた in vitro 実験での腫瘍細胞に対する作用の解析

## 3. 研究の方法

(1) 腫瘍移植モデルを用いた腫瘍進展における CD163 の機能評価 : マウス肉腫細胞 (MCA205, LM-8) およびマウス卵巣癌細胞を WT および CD163 欠損マウスに皮下移植し、腫瘍増殖や予後に与える影響を皮下重量ならびに生存期間を測定することで評価した。また、マウス肉腫 LM8 は高肺転移腫瘍モデルとして確立されているため、サンプリングした肺の組織切片を作成し、HE 染色を行うことでガン転移における影響を検討した。

(2) 腫瘍微小環境における CD163 の機能解析：腫瘍の組織切片を用いて、マクロファージマーカー (F4/80)、CD163、リンパ球マーカー (CD3, CD4, CD8)、腫瘍活性化マーカー (Ki-67) の免疫染色を行うことで評価した。

(3) マクロファージとガン細胞の共培養系における CD163 の腫瘍増殖への作用評価：マクロファージ (ヒト単球由来マクロファージもしくはマウス腹腔マクロファージ) と腫瘍細胞 (ヒト肉腫細胞、マウス肉腫細胞) を共培養し、24 時間後の腫瘍細胞の増殖を BrdU ELISA にて測定した。

(4) マクロファージとガン細胞の共培養系での CD163 が関与する腫瘍増殖因子の同定：マクロファージ (ヒト単球由来マクロファージもしくはマウス腹腔マクロファージ) と腫瘍細胞 (ヒト肉腫細胞、マウス肉腫細胞) を共培養し、24 時間後の培養上清中に分泌された腫瘍増殖因子をサイトカインアレイにて測定した。また、同定された因子の直接的な腫瘍細胞に対する作用を WST-8 アッセイにて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 腫瘍移植モデルを用いた腫瘍進展における CD163 の機能評価：マウス肉腫細胞 (MCA205, LM-8) を移植したモデルでは、WT マウスと比較して CD163 欠損マウスでは皮下腫瘍が小さく、また腫瘍の肺転移も抑制され生存期間が延長した。同様の結果はマウス卵巣癌移植モデルでも認められた。ゆえに、CD163 は腫瘍の進展に関与していることが示唆された。

(2) 腫瘍微小環境における CD163 の機能解析：腫瘍移植モデルマウスより摘出した皮下腫瘍の組織切片を用いて、腫瘍内に浸潤する細胞のプロファイルや活性化状態を免疫染色にて評価したところ、WT マウスおよび CD163 欠損マウス間では腫瘍内のマクロファージ数やリンパ球数、血管新生にも変化は認められなかった。しかしながら、WT マウスの皮下腫瘍では腫瘍周囲に CD163 陽性マクロファージが集積していたことから、腫瘍周囲の CD163 陽性マクロファージが腫瘍の進展に関与していることが示唆された。

(3) マクロファージとガン細胞の共培養系における CD163 の腫瘍増殖への作用評価：腫瘍細胞は腫瘍微小環境において、マクロファージが共存することでその増殖が促進することが知られている。WT マウスおよび CD163 欠損マウスの腹腔マクロファージと腫瘍細胞 (MCA205 マウス肉腫細胞) を共培養したところ、WT マウスの腹腔マクロファージとの共培養と比較して、CD163 欠損マウスの腹腔マクロファージとの共培養では腫瘍増殖が顕著に抑制された。また、CD163 を過剰発現させたマクロファージとの共培養を試みたところ、CD163 過剰発現マクロファージでは腫瘍増殖を有意に増加させた。さらに、ヒトマクロファージとヒト肉腫細胞株を用いた共培養実験においても、CD163 を Knock-down させたマクロファージでは腫瘍細胞の増殖能が低下した。ゆえに、マクロファージの CD163 が腫瘍微小環境においてマクロファージが関与する腫瘍増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。

(4) マクロファージとガン細胞の共培養系での CD163 が関与する腫瘍増殖因子の同定：前述した結果を踏まえて、共培養で CD163 シグナルにより誘導される腫瘍増殖に関わる液性因子を同定するために、マウス腹腔マクロファージと腫瘍細胞 (MCA205 マウス肉腫細胞) との共培養上清中に含まれる液性因子をサイトカインアレイにより解析したところ、CD163 欠損マウスの腹腔マクロファージとの共培養と比較して WT マウスの腹腔マクロファージとの共培養では、IL-6 ならびに CXCL2 濃度の顕著な増加が認められた。また、この同定されたサイトカインで腫瘍細胞を刺激すると細胞増殖が亢進し、これらサイトカインの受容体を Knock-down した腫瘍細胞では、その増殖能が低下した。また、ヒト肉腫細胞を用いた実験でも同様の結果が認められ

た。ゆえに、共培養によりマクロファージから分泌される IL-6 や CXCL2 が腫瘍増殖に関与し、マクロファージからのそれらサイトカインの分泌には CD163 が関与していることが示唆された。

つまり、本研究結果から腫瘍促進性の M2 マクロファージの細胞表面マーカーとして知られる CD163 はマーカーとしてだけでなく、腫瘍免疫の抑制にも直接的に関与していることが明らかとなった。ゆえに、マクロファージの CD163 をターゲットとした新たなガン治療戦略の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Shiraishi D, Fujiwara Y (Equal contribution as the first author), Horlad H, Saito Y, Iriki T, Tsuboki J, Cheng P, Nakagata N, Mizuta H, Bekki H, Nakashima Y, Oda Y, Takeya M, Komohara Y. CD163 is required for protumoral activation of macrophages in human and murine sarcoma. *Cancer Res.* 78, 3255-3266 (2018). 査読有り doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2011.
- ② Tsuboki J, Fujiwara Y, Horlad H, Shiraishi D, Nohara T, Tayama S, Motohara T, Saito Y, Ikeda T, Takaishi K, Tashiro H, Yonemoto Y, Katabuchi H, Takeya M, Komohara Y. Onionin A inhibits ovarian cancer progression by suppressing cancer cell proliferation and the protumour function of macrophages. *Sci Rep*, 6, 29588. (2016) 査読有り doi: 10.1038/srep29588.
- ③ Fujiwara Y, Horlad H, Shiraishi D, Tsuboki J, Kudo R, Ikeda T, Nohara T, Takeya M, Komohara Y. Onionin A, a sulfur-containing compound isolated from onions, impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the protumoral and immunosuppressive functions of myeloid cells. *Mol Nutr Food Res.* 60, 2467-2480 (2016) 査読有り doi: 10.1002/mnfr.201500995.

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① 藤原章雄、白石大偉輔、Hasita Horlad、菰原義弘. 肉腫の腫瘍微小環境におけるマクロファージスカベンジャー受容体 CD163 の機能解析. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
- ② 藤原章雄、白石大偉輔、潘 程、中川雄伸、宮川育子、菰原義弘. M2 マクロファージマーカーの腫瘍進展における機能. 第 91 回日本生化学会大会 2018 年
- ③ 藤原章雄、白石大偉輔、西東洋一、潘 程、小田義直、竹屋元裕、菰原義弘. マクロファージ CD163 の肉腫進展における機能解析. 第 58 回日本リンパ網内系学会 2018 年
- ④ 藤原章雄、白石大偉輔、潘 程、中川雄伸、宮川育子、竹屋元裕、菰原義弘. 腫瘍進展におけるマクロファージスカベンジャー受容体 CD163 の機能解析. 日本薬学会 第 138 回年会 2018 年
- ⑤ Yukio Fujiwara, Junko Tsuboki, Hasita Horlad, Daisuke Shiraishi, Toshihiro Nohara, Yoshihiro Komohara, Motohiro Takeya. Onionin A, a sulfur-containing compound isolated from onions, impairs tumor progression by inhibiting the protumoral functions of macrophages. Keystone Symposia, Mononuclear Phagocytes in Health, Immune Defense and Disease (D3), April 30-May 4, 2017 (Hyatt Regency Austin, Austin, Texas, USA)

- ⑥ 白石大偉輔、中村英一、岡元信和、山部聡一郎、舛田哲朗、西佳子、嶋村梨紗、加治哲也、水田博志. 変形性膝関節症に対する Hemicallotasis 術後の MPTA と歩行動態の変化について. 第 6 回日本 Knee Osteotomy 研究会 2017 年
- ⑦ 白石大偉輔、中村英一、岡元信和、山部聡一郎、舛田哲朗、西佳子、嶋村梨紗、加治哲也、水田博志. 変形性膝関節症に対する Hemicallotasis 術後の MPTA と歩行動態の変化について. 第 4 回九州 Knee Osteotomy 研究会 2017 年
- ⑧ 白石大偉輔、中村英一、岡元信和、山部聡一郎、舛田哲朗、水田博志. Hemicallotasis (HCO) における Medial Proximal Tibial Angle の術後変化について. 第 90 回日本整形外科学会学術総会 2017 年
- ⑨ 白石大偉輔、藤原章雄、Hasita Horlad、菰原義弘、大西紘二、竹屋元裕、水田博志. 肉腫移植マウスモデルを用いた腫瘍進展におけるマクロファージスカベンジャー受容体の機能解析. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

- ① 甲斐 裕基、岡元 信和、佐藤 広生、中村 英一、山部 聡一郎、舛田 哲朗、白石 大偉輔、水田 博志. 痛風結節を伴った膝関節内の限局型腱滑膜巨細胞腫の 1 例. 整形外科と災害外科. 66. 529-533. 2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://kumadai-seikei.com/kennkyu/zisseki/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤原章雄

ローマ字氏名：Fujiwara Yukio

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部（医）

職名：講師

研究者番号（8 桁）：70452886

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：菰原義弘

ローマ字氏名：Komohara Yoshihiro