

令和元年6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15248

研究課題名(和文)リンパ節マクロファージに着目した新規バイオマーカーの探索と分子病理診断への応用

研究課題名(英文) Search of the new biomarkers reflecting lymph node macrophage function and its application to molecular pathology

研究代表者

竹屋 元裕 (Takeya, Motohiro)

熊本大学・事務局・理事

研究者番号：90155052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌、膵癌、膀胱癌、および食道癌症例における所属リンパ節の洞マクロファージ(M₁)のCD169陽性率は患者の全生存率または癌特異的生存率と正の相関を示し、多くの癌腫で腫瘍内CD8陽性Tリンパ球の浸潤密度と相関した。ヒトM₁においてCD169と類似の発現動態を示す分子としてindoleamine 2,3-dioxygenase 1を同定したが、リンパ節における両者の発現パターンは異なり、両者の機能に直接的な関連性は見出せなかった。大腸癌では、洞M₁のCD169陽性率が高い症例群でCCL8の血液中濃度が高い傾向がみられたが、有意差は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの癌腫症例において、所属リンパ節洞M₁におけるCD169発現は、癌患者のCD8陽性Tリンパ球を介した抗腫瘍免疫の活性化の程度と相関し、患者予後を予測する分子マーカーとして有用であると考えられた。また、洞M₁におけるCD169の発現増強は抗腫瘍免疫の賦活化に関わる可能性が示唆され、洞M₁の活性化は癌治療のターゲットの一つとなり得ることが示唆された。一方、リンパ節洞M₁におけるCD169分子の機能については未解明の部分が多く、その機能を反映する血清マーカーについても有用な分子を同定することが出来ず、今後の課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the analysis of the patients of endometrial cancer, pancreatic cancer, bladder cancer and esophagus cancer, positive correlation between CD169-positive rate of lymph node sinus macrophages and overall or cancer-specific survival rate was observed. A concomitant correlation with the density of the intratumoral CD8-positive T lymphocytes was also noted in most cancer cases. We identified that indoleamine 2,3-dioxygenase 1 shows similar expression pattern with CD169 in human macrophages, however, their staining pattern in lymph nodes differed indicating functional association between these molecules may not exist. In colon cancer patients, a possible correlation of blood level of CCL8 and CD169-positive rate of sinus macrophages was indicated, however, the significant difference was not proved.

研究分野：人体病理学

キーワード：CD169 リンパ節マクロファージ ヒト癌組織 抗腫瘍免疫 CCL8 膀胱癌 食道癌 子宮内膜癌

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

1. 研究開始当初の背景

リンパ節の辺縁部に存在するリンパ洞には多数のマクロファージが存在しており、リンパ管を通じて流入した腫瘍抗原を認識して抗原特異的なリンパ球活性化を誘導し、抗腫瘍免疫の成立に関わっている。しかし、癌患者におけるリンパ節のマクロファージの重要性はこれまで殆ど注目されておらず、抗腫瘍免疫能を反映するマクロファージの分子マーカーも不明のままであった。CD169(Sialoadhesin, Siglec 1)はシアル酸含有分子との結合能をもつ膜蛋白質であり、リンパ洞マクロファージに強い発現が見られる。私達は、CD169が抗腫瘍免疫能を有する炎症促進性 M1-like マクロファージに強く誘導されることを見出し、さらに大腸癌および悪性黒色腫患者の検索から、所属リンパ節の洞マクロファージにおける CD169 出現率が高い症例では、腫瘍組織内の CD8 陽性 T リンパ球の浸潤密度が高く、術後の生存率が有意に高いことを明らかにした。すなわち、CD169 はリンパ節での抗腫瘍免疫能を反映する有用なマーカーになりうる可能性が示唆された。しかしながら、このような相関は他の癌腫では明らかとなっておらず、ヒト癌腫における CD169 陽性リンパ洞マクロファージの役割解明は不十分である。一方、Asano ら (Nat Commun, 2015) は DSS 誘発性腸炎モデルマウスを用いた解析で、CD169 陽性マクロファージが CCL8 を特異的に分泌していることを明らかにした。したがってヒト癌症例において、所属リンパ節洞マクロファージの CD169 発現の程度を反映する血中分子を同定出来れば、リンパ節での免疫微小環境の解明や、癌免疫能を評価する新規分子マーカーとしての応用が期待できる。

2. 研究の目的

私達はこれまでの検討から、所属リンパ節の洞マクロファージにおける CD169 発現率が高い大腸癌や悪性黒色腫症例では腫瘍組織内における CD8 陽性 T リンパ球の浸潤密度が高く、腫瘍のリンパ節転移が抑制され、術後の生存率が良好であることを報告した。本研究では、大腸癌や悪性黒色腫以外の癌腫においても同様の相関が見られるかどうかを検索し、腫瘍免疫における CD169 陽性リンパ洞マクロファージの役割が多くの癌で共通のものかどうかを検討する。

さらに、近年の癌免疫療法の広まりに伴い、患者個人の免疫能を的確に評価する免疫モニタリングの開発が重要となってきている。マウスを対象とした実験では、CD169 陽性マクロファージが CCL8 等の生理活性分子を特異的に発現していることが明らかにされており、癌患者でも CD169 陽性マクロファージ由来する生理活性分子が存在する可能性が考えられる。本研究では、CD169 陽性マクロファージ由来の生理活性分子を解析するとともに、これらの中から採血で測定可能なものを同定し、採血による癌患者の免疫モニタリングへの応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト癌腫症例における CD169 陽性リンパ洞マクロファージの役割解明

本研究では、子宮内膜癌 79 症例、乳癌 146 症例、膵癌 70 症例、膀胱癌 44 症例、および食道癌 144 症例を対象として、所属リンパ節の洞マクロファージの CD169 陽性率と患者予後等の比較検討を行った。さらに、腫瘍本体に浸潤する CD8 陽性 T リンパ球数との相関についても解析を加えた。

(2) CD169 陽性マクロファージに特異的に発現する分子の解析ならびにリンパ洞マクロファージによる CD169 発現を反映する血清中分子マーカーの網羅的解析

腫瘍免疫における CD169 分子の機能を明らかにするため、CD169 と類似の発現動態を示す分子について網羅的に解析を行い、候補分子について食道癌症例を用いて CD169 機能との関連について検討を加えた。さらに、従来の私達の検討によって CD169 陽性リンパ洞マクロファージと予後との相関が明らかとなっている大腸癌症例について、保存血清を用いて血中の諸分子について網羅的に検討を加え、リンパ洞マクロファージの CD169 陽性率と相関を示すマーカーを検索した。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜癌 79 症例の検討では、CD169 陽性洞マクロファージ数および洞マクロファージにおける CD169/CD68 比が全生存率と相関した。また、CD169 陽性洞マクロファージの密度が腫瘍内の CD8 陽性 T リンパ球および CD57 陽性 NK 細胞の密度と正の相関を示した。さらに CD57 陽性 NK 細胞の浸潤密度が高い症例では、全生存率が良好であった (Ohnishi K. et al., Cancer Sci, 2016)。

(2) 乳癌 146 症例の検討では、洞マクロファージの CD169 陽性率は、早期の臨床ステージとリンパ節への非転移率、小さい腫瘍径、および腫瘍細胞の Ki67 陽性率の低値と相関したが、予後との相関は見られなかった。また、腫瘍内への CD8 陽性 T リンパ球の浸潤密度と予後との相関も見られなかった (Shiota T. et al., PLoS One, 2016)。

(3) 膵癌 70 症例の検討では、CD169 陽性洞マクロファージが多い症例では全生存率が有意に良好で、腫瘍中の CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が多い傾向がみられた (塩田拓也他 第 106 回日本病理学会総会 2017 年)。

(4) 膀胱癌 44 症例の検討では、洞マクロファージの CD169 陽性率と腫瘍組織中の CD8 陽性 T リンパ球の浸潤数に正の相関が得られた。また、CD169 陽性率と癌特異的生存率との間に有意の相関がみられた (Asano T. et al., Cancer Sci, 2018)。

(5) 食道癌 182 症例の解析では、洞マクロファージにおける CD169 高発現群は低発現群に比し、癌特異的生存率が有意に高かった。さらに CD169 発現率は、腫瘍内の CD8 陽性 T リンパ球の浸潤密度と正の相関を示した (Takeya H. et al., *Pathol Int*, 2018)。

(6) 洞マクロファージにおける CD169 分子の機能解明の一環として、マクロファージの IFN および IL-10 刺激によって、CD169 と同様の挙動を示す分子を網羅的に解析し、indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) を同定した。しかし、食道癌症例のリンパ節を用いて免疫染色を実施すると、CD169 と IDO1 の染色パターンは異なっており、両者の機能に関して直接的な関連性は明らかとはならなかった (Takeya H. et al., *Pathol Int*, 2018)。

(7) CD169 陽性マクロファージと関連する血中バイオマーカーの同定のため、CD169 を強く誘導する IFN 刺激によってマクロファージで発現が増強する分子を網羅的に解析すると CCL8 と CXCL10 が候補分子として同定された。そこで、大腸癌 48 例の保存血清を解析すると、洞マクロファージの CD169 陽性率が高い症例群で CCL8 の血液中濃度が高い傾向がみられたが、有意差は得られなかった (大西紘二他 第 106 回日本病理学会総会 2017 年)。

以上の検索結果から、多くの癌腫症例において、所属リンパ節の洞マクロファージにおける CD169 発現は癌患者の T リンパ球を介した抗腫瘍免疫の活性化の程度と予後を予測する分子マーカーとして有用であると考えられた。また、洞マクロファージにおける CD169 の発現増強は抗腫瘍免疫の賦活化に関わる可能性が示唆され、洞マクロファージの活性化は癌治療のターゲットの一つとして注目される。一方、リンパ洞マクロファージにおける CD169 分子の機能については未解明の部分が多く、その機能を反映する血清マーカーについても有用な分子を同定することが出来ず、今後の課題と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 22 件)

(1) Komohara Y, Takeya H, Wakigami N, Kusada N, Bekki H, Ishihara S, Takeya M, Nakashima Y, Oda Y. Positive correlation between the density of macrophages and T-cells in undifferentiated sarcoma. *Med Mol Morphol*,52:44-51,2019. doi:10.1007/s00795-018-0201-3.

(2) Takeya H, Shiota T, Yagi T, Ohnishi K, Baba Y, Miyasato Y, Kiyozumi Y, Yoshida N, Takeya M, Baba H, Komohara Y. High CD169 expression in lymph node macrophages predicts a favorable clinical course in patients with esophageal cancer. *Pathol Int*, 68:685-693,2018. doi:10.1111/pin.12736.

(3) Asano T, Ohnishi K, Shiota T, Motoshima T, Sugiyama Y, Yatsuda J, Kamba T, Ishizaka K, Komohara Y. CD169-positive sinus macrophages in the lymph nodes determine bladder cancer prognosis. *Cancer Sci*,109:1723-1730,2018. doi:10.1111/cas.13565.

(4) Fujiwara Y, Saito Y, Shiota T, Cheng P, Ikeda T, Ohnishi K, Takeya M, Komohara Y. Natural compounds that regulate lymph node sinus macrophages: Inducing an anti-tumor effect by regulating macrophage activation. *J Clin Exp Hematop*,58:17-23,2018. doi:10.3960/jslrt.17032.

(5) Shiraishi D, Fujiwara Y, 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. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2011.

(6) Miyasato Y, Takashima Y, Takeya H, Yano H, Hayano A, Nakagawa T, Makino K, Takeya M, Yamanaka R, Komohara Y. The expression of PD-1 ligands and IDO1 by macrophage/microglia in primary central nervous system lymphoma. *J Clin Exp Hematop*, 58:95-101,2018. doi:10.3960/jslrt.18001.

(7) Komohara Y, Ohnishi K, Takeya M. Possible functions of CD169-positive sinus macrophages in lymph nodes in anti-tumor immune responses. *Cancer Sci*,108:290-295, 2017. doi:10.1111/cas.13137.

(8) Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Horlad H, Saito Y, Takeya M. Recent advances in research regarding to natural compounds that target pro-tumor macrophages. *Macrophage*,4,2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.14800/macrophage.1507>

(9) Iriki T, Ohnishi K, Fujiwara Y, Horlad H, Saito Y, Pan C, Ikeda K, Mori T, Suzuki M, Ichiyasu H, Kohroggi H, Takeya M, Komohara Y. The cell-cell interaction between tumor-associated macrophages and small cell lung cancer cells is involved in tumor progression via STAT3 activation. *Lung Cancer*,106:22-32,2017. doi:10.1016/j.lungcan.2017.01.003

(10) Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. (review) *Adv Drug Deliv Rev* 99:180-185, 2016. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.009.

(11) Ohnishi K, Yamaguchi M, Erdenebaatar C, Saito F, Tashiro H, Katabuchi H, Takeya M, Komohara Y. Prognostic significance of CD169-positive lymph node sinus macrophages in

patients with endometrial carcinoma. *Cancer Sci*,107:846-852,2016.

doi:10.1111/cas.12929.

(12) 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.

doi:10.1002/mnfr.201500995.

(13) 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. doi: 10.1038/srep29588.

(14) Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? *Pathol Int*, 66:491-505,2016. doi:10.1111/pin.12440.

(15) Komohara Y, Takeya M. CAFs and TAMs: Maestros of the tumour microenvironment. *J Pathol* 240:211-223,2016. doi:10.1002/path.4824.

(16) Shiota T, Miyasato Y, Ohnishi K, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H, Takeya M, Komohara Y. The Clinical Significance of CD169-Positive Lymph Node Macrophage in Patients with Breast Cancer. *PLoS One*, 11:e0166680, 2016.

doi:10.1371/journal.pone.0166680.

(17) 菰原義弘、大西紘二、藤原章雄、竹屋元裕. がん免疫(第7回) がん免疫におけるマクロファージの意義とその制御. 炎症と免疫 26:56-61,2018.

(18) 藤原章雄、白石大偉輔、池田剛、竹屋元裕、菰原義弘. 大豆に含まれるトリテルペノイドの新規機能性:マクロファージ活性化制御を介した抗腫瘍作用. *New food industry* 59:17-22, 2017.

(19) 菰原義弘、竹屋元裕. 血液系腫瘍におけるマクロファージの役割 (Role of macrophages in hematological malignancies). *血液内科* 72:85-89,2016.

(20) 竹屋元裕. 総論: がんと慢性炎症の密接な関係. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 5:10-11,2016.

(21) 藤原章雄、菰原義弘、大西紘二、竹屋元裕. マクロファージの活性化制御によるがん治療. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 5:112-117,2016.

(22) 大西紘二、菰原義弘、竹屋元裕. リンパ節洞マクロファージとがん免疫. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 5:94-99,2016.

〔学会発表〕(計 21 件)

(1) 竹屋元裕、菰原義弘、藤原章雄. マクロファージと老化 - 加齢関連疾患におけるマクロファージの役割. シンポジウム 第 18 回日本抗加齢医学会総会(大阪) 2018 年

(2) Yoshihiro Komohara, Yoichi Saito, Takuya Shiota, Hiroto Takeya, Yukio Fujiwara, Koji Ohnishi. The significance of lymph node macrophages in the induction of anti-tumor immune response in human malignant tumors. 第 45 回内藤コンファレンス(札幌) 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(名古屋) 2018 年

(4) 竹屋元裕、菰原義弘、藤原章雄、大西紘二. 腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の機能とその由来の多様性. 第 28 回日本樹状細胞研究会(名古屋) 2018 年

(5) 竹屋元裕、塩田拓也、大西紘二、菰原義弘. 食道癌における CD169 陽性リンパ節洞マクロファージとがん免疫の関連性. 第 22 回日本がん免疫学会総会(岡山)2018 年

(6) 菰原義弘、藤原章雄、大西紘二、西東洋一. がん免疫におけるリンパ節マクロファージの重要性. 第 77 回日本癌学会学術総会(大阪) 2018 年

(7) 大西紘二. がんの PD-L1 発現多様性とリンパ節洞マクロファージの CD169 発現に着目したコンパニオン診断の可能性. *Kyusyu Cancer Immunology Forum* 平成 30 年 2 月 18 日(福岡、ホテルニューオータニ博多)

(8) 大西紘二、菰原義弘、塩田拓也、西東洋一、竹屋元裕. リンパ節マクロファージに注目した、大腸癌に対する抗腫瘍免疫能評価のためのバイオマーカーの探索. 第 106 回日本病理学会総会(東京)2017 年

(9) 塩田拓也、大西紘二、長峯理子、福田精二、西東洋一、竹屋元裕、菰原義弘. 膀胱癌患者における CD169 陽性リンパ節マクロファージの臨床的意義. 第 106 回日本病理学会総会(東京) 2017 年

(10) 藤原章雄、菰原義弘、大西紘二、宮川育子、中川雄伸、竹屋元裕. 炎症性マクロファージの新たなマーカー探索. 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会(つくば市) 2017 年

(11) 西東洋一、藤原章雄、大西紘二、菰原義弘、竹屋元裕. INFs によるがんの PD-L1 発現多様性とリンパ節洞マクロファージの CD169 に着目した抗 PD-(L)1 抗体薬新規コンパニオン診断の可

能性.第21回日本がん免疫学会総会(千葉)2017年

(12) 菰原義弘、藤原章雄、潘 程、大西紘二、Hasita Horlad、竹屋元裕.ヒトマクロファージのM1/M2バランスを調節する化合物スクリーニング.Compound screen targeting M1/M2 balance of human macrophages.第90回日本細菌学会総会(仙台)2017年

(13) 大西紘二、菰原義弘、塩田拓也、西東洋一、竹屋元裕.リンパ節マクロファージに注目した、大腸癌に対する抗腫瘍免疫能評価のためのバイオマーカーの探索.第106回日本病理学会総会(東京)2017年

(14) 塩田拓也、大西紘二、長峯理子、福田精二、西東洋一、竹屋元裕、菰原義弘.膵癌患者におけるCD169陽性リンパ節マクロファージの臨床的意義.第106回日本病理学会総会(東京)2017年

(15) Koji Ohnishi, Yoichi Saito, Takuya Shiota, Hasita Horlad, Yukio Fujiwara, Motohiro Takeya, Yoshihiro Komohara. The Clinical relevance and prognostic significance of CD169+ lymph node macrophages in human malignant tumors. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (Tokyo), 2016

(16) 大西紘二、菰原義弘、西東洋一、藤原章雄、竹屋元裕.がん患者の抗腫瘍免疫におけるCD169陽性リンパ節マクロファージの重要性.第56回日本リンパ網内系学会総会(熊本)2016年

(17) 塩田拓也、宮里祐子、大西紘二、菰原義弘、指宿睦子、岩瀬弘敬、竹屋元裕.乳癌患者におけるリンパ節CD169陽性マクロファージの臨床病理学的研究.(奨励賞受賞)第26回日本樹状細胞研究会(熊本)2016年

(18) 宮里祐子、塩田拓也、大西紘二、山本豊、指宿睦子、岩瀬弘敬、竹屋元裕、菰原義弘.CD204陽性マクロファージは浸潤性乳管癌の予後予測に有用である.第26回日本樹状細胞研究会(熊本)2016年

(19) 菰原義弘、大西紘二、藤原章雄、竹屋元裕.ヒト悪性腫瘍におけるマクロファージの役割ーがん免疫との接点.(招待講演)第44回日本臨床免疫学会総会(東京)2016年

(20) 塩田拓也、宮里祐子、大西紘二、指宿睦子、岩瀬弘敬、竹屋元裕、菰原義弘.乳癌患者におけるリンパ節CD169陽性マクロファージの臨床病理学的研究.第75回日本癌学会学術総会(横浜)2016年

(21) 大西紘二、西東洋一、塩田拓也、ハスタホルラド、藤原章雄、竹屋元裕、菰原義弘.悪性腫瘍患者におけるCD169陽性リンパ節マクロファージの臨床的意義.第62回日本病理学会総会(金沢)2016年

〔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

熊本大学大学院生命科学研究部 細胞病理学講座

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/patho2/patho2.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大西 紘二

ローマ字氏名: OHNISHI, Koji

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 大学院生命科学研究部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40613378

研究分担者氏名: ホラド ハシタ

ローマ字氏名: HORLAD, Hasita

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 大学院生命科学研究部

職名: 研究員

研究者番号(8桁): 00644840

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 藤原 章雄

ローマ字氏名：FUJIWARA, Yukio

研究協力者氏名：菰原 義弘

ローマ字氏名：KOMOHARA, Yoshihiro

研究協力者氏名：浅野 謙一

ローマ字氏名：ASANO, Kenichi

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。