

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08763

研究課題名（和文）リンパ腫細胞とマクロファージの細胞間相互作用に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）cell cell interaction with macrophages and lymphoma

研究代表者

ハ斯塔（horlad, hasita）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・研究員

研究者番号：00644840

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）：悪性リンパ腫をはじめとした様々な悪性腫瘍の微小環境における腫瘍関連マクロファージの重要性をあきらかにした。悪性腫瘍の微小環境において、いくつかの癌細胞由来因子によってマクロファージにおけるPD-L1やCD163の発現が増加し、これらの細胞間相互作用に関わる液性因子が腫瘍発育に寄与することをあきらかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍におけるマクロファージの役割を明らかにすることで、マクロファージを標的にした新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We clarified the importance of macrophages in various malignant tumors such as lymphoma. The expression of PD-L1 and CD163 in macrophages was increased by a cancer cell-derived factor, and it was revealed that these molecules contribute to tumor development.

研究分野：病理学

キーワード：マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは全身臓器に存在している免疫細胞であり、様々な炎症病態に関与している。悪性リンパ腫をはじめ殆どの悪性腫瘍で腫瘍間質に多数のマクロファージが浸潤していることはかなり以前から知られている。当初、マクロファージに抗がん作用があるのではないかと考えられていたが、ヒトのがん組織を用いた検討から多くのがんではマクロファージの浸潤が多い症例ほど予後が悪く、マクロファージはいわゆる「腫瘍促進性」の性格を有しているようである。

私たちは、以前からマクロファージに注目し、ヒトの病理検体を用いて悪性リンパ腫をはじめ、様々な悪性腫瘍の悪性度とマクロファージの浸潤・分化との関連性についての研究を行っている。これまでの研究で、グリオーマ、肝内胆管癌、腎癌、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫では、悪性度の高い症例の腫瘍組織中に多数のマクロファージ、特に抗炎症性の機能を有する亜群 (CD163 陽性M2 マクロファージ) が浸潤していることを見出した (Horlad & Komohara et al. *Cancer Sci* 2011, *Cancer Sci* 2012, *J Clin Exp Hematopath* 2011)。培養実験を行い成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) とマクロファージの細胞間相互作用を検討したところ、ATLL 細胞がマクロファージの M2 亜群への分化を誘導し、活性化した M2 マクロファージからは ATLL 細胞へさまざまな成長因子が分泌されていることが明らかとなった (Horlad & Komohara et al. *Cancer Sci* 2013)。更に興味深いことに、ATLL 細胞と M2 マクロファージを 3 週間長期培養することで、ATLL 細胞が抗癌剤耐性を獲得することも見出した (Horlad & Komohara et al. *Oncol Lett* 2015)。このようなマクロファージとの細胞間相互作用については、EBV 感染不死化 B 細胞など正常細胞では殆ど観察されず、リンパ腫細胞など腫瘍細胞とのみ観察される。以上より、リンパ腫瘍など腫瘍細胞の細胞表面に発現する何らかの分子がマクロファージの活性化や M2 への分化を誘導し、細胞間相互作用を誘導していると考えられる。本研究では、以下の 2 分子に注目して、悪性リンパ腫 (B-cell lymphoma, ATLL) 細胞とマクロファージの細胞間相互作用に関わる分子の解明につなげたい。

2. 研究の目的

リンパ腫細胞 (B 細胞、T 細胞系) に発現する接着分子 ICAM-1, CADM1 がマクロファージとの細胞間相互作用に関与しているのかどうかを明らかにする。また、それぞれの分子に対するマクロファージ側の受容体を同定し、ICAM-1, CADM1、更にはその受容体が予後予測因子や治療標的となり得るかどうかを検討する。

3. 研究の方法

本研究では、リンパ腫とマクロファージの細胞間相互作用を明らかにするために、ICAM-1 と CADM1 という 2 つの接着分子に注目した研究を行う。まず、悪性リンパ腫生検組織検体を用いた免疫組織化学により 2 つの接着分子の発現と臨床病理学的因子の相関性について解析を行い、マクロファージの浸潤密度や活性化状態との相関性を検討する。次に、リンパ腫細胞とマクロファージの細胞間相互作用に関して、2 つの接着分子の関与を検討するため、CADM1 強制発現細胞株を作成したり ICAM-1 の阻害抗体を用いたりして共培養実験を行う。また、それぞれの分子がリンパ腫細胞の増殖能や浸潤能、抗癌剤感受性、腫瘍形成能に影響を及ぼすのかも解析する。本研究は申請者と大学院生、共同研究者の菰原の 3 名が主として担当するが、2 名の実験補助員も含め 6 名の協力の下に実験を遂行する。

4. 研究成果

Pan C, Fujiwara Y, [Horlad H](#), Shiraishi D, Iriki T, Tsuboki J, Ikeda T, Komohara Y. Flavonoid Compounds Contained in Epimedium Herba Inhibit Tumor Progression by Suppressing STAT3 Activation in the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol*. 11:262, 2020.

イカリソウからマクロファージの M2 活性を制御する化合物を単離した研究である。複数のイカリソウ由来成分を解析したところ、limonianin, epimedokoreanin B, icaritin, desmethylicaritin の 4 種類の化合物が M2 マーカーである CD163 の発現を制御した。epimedokoreanin B と limonianin に関しては Stat3 の活性化や IL-10 の産生を抑制することが明らかとなった。epimedokoreanin B はがん細胞とマクロファージの共培養によるがん細胞の活性化を制御することができた。マウス肉腫モデルを用いて前臨床試験を行った結果、epimedokoreanin B は有意に腫瘍の発育や肺転移を抑制することができた。組織を解析してみるとマクロファージのファノタイプ、がん免疫の関連が不明確であったため、epimedokoreanin B は腫瘍細胞に対する直接的な細胞障害作用にくわえて、マクロファージの Protumor activation を抑制することで、腫瘍の発育を制御したものと思われた。

Shiraishi D, Fujiwara Y, **Horlad H**, Saito Y, Iriki T, Tsuboki J, Pan C, 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

CD163 は M2/protumor TAM のマーカーで有り、多くの癌腫で CD163 陽性 TAM が予後不良・治療抵抗性と関わっていることが報告されている。今回、未分化肉腫 62 症例を用いて CD163 陽性 TAM の重要性を解析した。TAM における CD163 陽性 TAM の割合が高い症例ほど、生存率が低いことが明らかとなった。次に培養細胞を用いて、TAM と肉腫細胞の細胞間相互作用を検討した。TAM との共培養により肉腫細胞における BrdU 取り込みが増加し、CD163 制御により TAM による肉腫細胞の増殖誘導が抑制された。CD163 ノックアウトマウスを用いた研究においても CD163 欠損により肉腫の進展が抑制された。CD163 は IL-6 等の TAM 由来増殖因子の産生に関わっているようであった。これまで、CD163 はマーカーとしての重要性が注目されてきたが、CD163 に機能があることが示され、今後 CD163 阻害剤の開発などにつながる研究である。

Ma C, **Horlad H**, Ohnishi K, Nakagawa T, Yamada S, Kitada S, Motoshima T, Kamba T, Nakayama T, Takeya M, Komohara Y. CD163-positive cancer cells are potentially associated with high malignant potential in clear cell renal cell carcinoma. **Med Mol Morphol.** 51:13-20, 2018.

CD163 はマクロファージ特異的に発現すると言われているが、乳癌や大腸癌の癌細胞でも陽性（発現？）になる。乳癌や大腸癌では CD163 の発現ががん細胞に認められた症例は治療抵抗性で予後が悪いことが知られている。今回、淡明型腎細胞癌における CD163 発現を免疫染色を用いて検討し、臨床病理学的因子との相関性を検討した。また、腎細胞癌細胞株における CD163 の発現を PCR 等の手法を用いて検討した。103 症例中、36 症例でがん細胞に CD163 の発現を認めた。CD163 の発現はマクロファージと比較すると弱い強度であった。臨床病理学的因子との相関性を検討したが、CD163 陽性例では無再発生存率および全生存率が低い傾向であった。CD163 陽性 TAM と臨床病理学的因子との相関性はみられなかった（分子標的薬登場前のサンプルを用いた研究では有意差が出ていたことから、治療の影響と考えられた）。がん細胞で CD163 が陽性であった症例では、CD163 陽性 TAM の浸潤密度が高い傾向であった。また、同一症例内でも、CD163 陽性エリアでは CD163 陽性 TAM が陰性エリアよりも多い傾向であった。腎癌細胞での CD163 mRNA 発現を検索したが、腎癌細胞株では CD163 mRNA の発現は見られなかった。CD163 陽性腎癌細胞の存在は、予後と相関している可能性が考えられた。がん細胞株で CD163 の発現が全く見られなかったことから、腎癌細胞が血清中の可溶性 CD163 を取り込んでいることが考えられた。

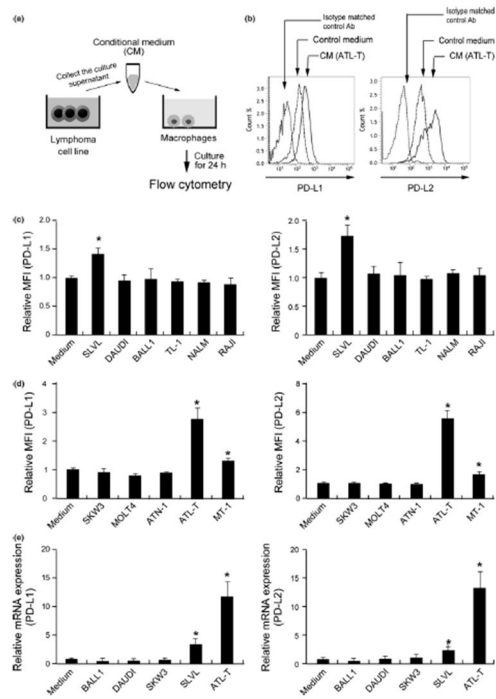
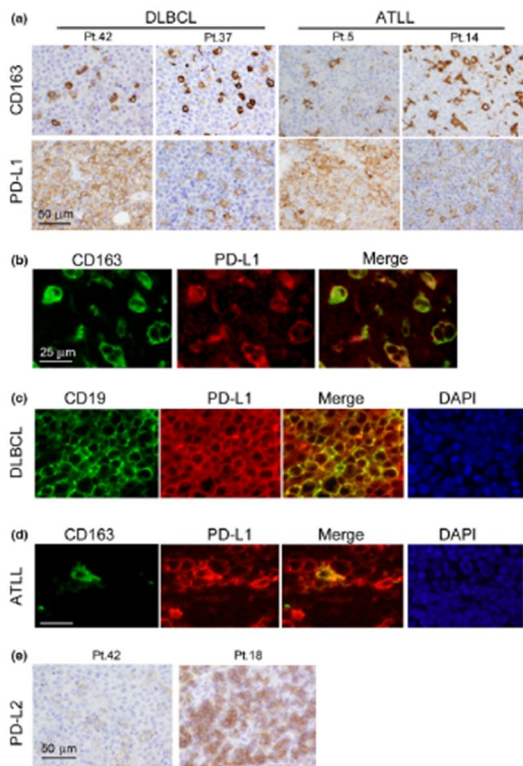
Miyasato Y, Shiota T, Ohnishi K, Pan C, Yano H, **Horlad H**, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Iwase H, Takeya M, Komohara Y. The high density of CD204-positive macrophages predicts worse clinical prognosis in patients with breast cancer. **Cancer Sci.** 108;1693-1700, 2017.

合計 149 症例の乳癌症例（術前治療を行っていない）のパラフィン切片を用いて、腫瘍組織内の TAM を解析した。CD68 陽性 TAM、CD204 陽性 TAM、CD163 陽性 TAM の浸潤密度と臨床病理学的因子を解析したところ、CD204 陽性 TAM が多い症例では再発率が高く生存率が低いことが明らかとなった。いずれのマーカーも TAM 浸潤密度と癌細胞の Ki67 標識率には正の相関性があったが、CD204 で最も強い相関性が見られた。CD204 陽性 TAM と癌細胞の増殖には密接な関連性があることが明らかとなった。培養細胞を用いた実験では、乳癌細胞株の培養上清でマクロファージを刺激したところ、CD204 の発現が有意に増加したが、CD163 の発現には変化が見られなかった。このことからマクロファージにおける CD204 発現が TAM の Protumor activation に関与していることが示唆された。

Horlad H, Ma C, Yano H, Pan C, Ohnishi K, Fujiwara Y, Endo S, Kikukawa Y, Okuno Y, Matsuoka M, Takeya M, Komohara Y. An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma. **Cancer Sci** 107:1696-1704, 2016.

ATL や DLBCL、濾胞性リンパ腫の組織で PD-L1/L2 の発現を検討した。5%の症例でリンパ腫細胞に陽性になったが、PD-L1 を発現する症例と PD-L2 を発現している症例は同一症例ではなかった。それよりも、特筆すべきはマクロファージ TAM において PD-L1/L2 発現がみられたことであった。二重染色やフローサイトメトリーを用いて TAM、およびヒト単

球由来マクロファージに PD-L1/L2 発現がみられること明らかにした。リンパ腫細胞の培養上清でヒトマクロファージを刺激すると PD-L1/L2 発現が顕著に増加した。その過程で、リンパ腫細胞から産生される IL-27 が Stat3 の活性化を誘導し、PD-L1/L2 発現を増加させていることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshihiro Komohara,1,2) Osamu Noyori,3) Yoichi Saito,1) Hiroto Takeya,1) Muhammad Baghdadi,4) Fumihito Kitagawa,4) Naoki Hama,4) Kozo Ishikawa,4) Yutaka Okuno,5) Kisato Nosaka,5) Ken-ichiro Seino,4) Masao Matsuoka,5) and Shinya Suzu3)	4. 巻 Vol. 58 No.4
2. 論文標題 Potential anti-lymphoma effect of M-CSFR inhibitor in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of clinical and experimental hematopathology	6. 最初と最後の頁 152-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.3960/jslirt.18034	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komohara Y, Ma, C, Yano H, Pan C, Horlad H, Saito Y, Ohnishi K, Fujiwara Y, Okuno Y, Nosaka K, Shinosaki S, Morishita K, Matsuoka M, Wakayama T, Takeya M.	4. 巻 Jul 5;57(1)
2. 論文標題 Cell adhesion molecule-1 (CADM1) expressed on adult T-cell leukemia/lymphoma cells is not involved in the interaction with macrophages.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.17003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ma C, Horlad H, Pan C, Yano H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Matsuoka M, Lee A, Niidome T, Yamanaka R, Takeya M, Komohara Y.	4. 巻 Jul 5;57(1)
2. 論文標題 Stat3 inhibitor abrogates the expression of PD-1 ligands on lymphoma cell lines.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop	6. 最初と最後の頁 21-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.17006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 in press
2. 論文標題 CD163 is required for protumoral activation of macrophages in human and murine sarcoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-2011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Horlad Hasita, 藤原章雄、新野大輔、菊川吉高、奥野豊、松岡雅夫、竹屋元裕、菰原義弘
2. 発表標題 悪性リンパ腫ではコレステロール代謝経路が治療標的になりうる。
3. 学会等名 第106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菰原義弘、馬超亜、潘 程、Carreras Joaquim、中村直哉、竹屋元裕
2. 発表標題 B細胞性リンパ腫におけるIL-34の重要性。
3. 学会等名 第57回 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菰原義弘、白石大偉輔、西東洋一、Horlad Hasita、藤原章雄
2. 発表標題 M2-likeマーカーであるCD163はマクロファージの腫瘍促進性活性化に関与する
3. 学会等名 第22回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018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	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	