

平成 21 年 4 月 1 日

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791162
 研究課題名（和文） 卵巣癌発癌における腹腔マクロファージ由来サイトカインの影響
 研究課題名（英文） Effects of cytokines from macrophage in epithelial ovarian carcinoma

研究代表者
 宮原 陽（MIYAHARA YO）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助手
 研究者番号：40404355

研究成果の概要：

マクロファージは微小環境によって、抗腫瘍活性を呈する M1 マクロファージと腫瘍の増殖を促進する M2 マクロファージに分化することが知られている。卵巣癌症例の腹水中では、interleukin(IL)-6、IL-10、Growth related oncogene- が増加し、特に M2 マクロファージが増加することで IL-6 と IL-10 を産生し、卵巣癌細胞の増殖を促進する環境の場を提供していることが示唆された。このことから、マクロファージの M2 マクロファージへの分化が卵巣癌の播種進展機構に関与している可能性が考えられ、M2 マクロファージへの分化に関わる因子の同定が卵巣癌の治療戦略のひとつと考えられる。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	150,000	2,250,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード:卵巣癌、腹腔マクロファージ、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

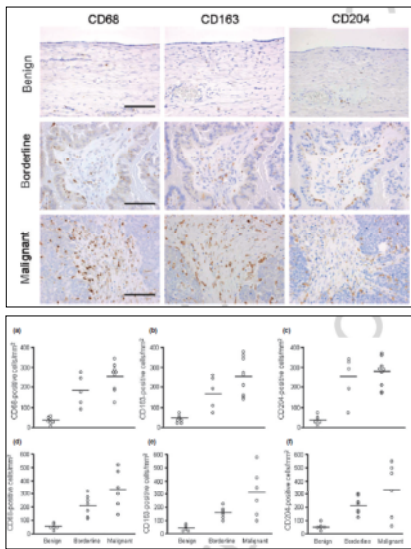
マクロファージは体内に侵入した異物や病原菌を貪食するだけでなく、様々なサイトカインやケモカインを産生することで、多様な病態に深く関わっている。ヒト腹腔内にはマクロファージが常在し、月経周期を有する正常女性の腹腔内には $6.0-7.0 \times 10^6$ のマクロファージが存在するといわれている。腹水を伴った進行した状態で発見されることの多い上皮性卵巣がんの腹水中で、マクロファージが増加していることや、腫瘍組織

間にも浸潤、集簇していることは既に知られている。

マクロファージは腫瘍周囲の微小環境により、免疫抑制に働く M2 マクロファージに分化し、浸潤・血管新生を促進することで腫瘍増殖に関与することが報告されているが、マクロファージの分化と腫瘍増殖に関するヒトでの研究は殆どなされていない。

われわれはこれまで、卵巣癌組織への M2 マクロファージの浸潤が組織学的悪性度と密接に関

連していることを明らかにしてきた。



河村、菟原、高石他 . Pathol Int 2009

また、腹水中のサイトカインに着目したところ、卵巣癌腹水中で IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1 の他に GRO、IL-15 が検出されたこと、卵巣癌の腹水および腹水中より分離されたマクロファージの培養上清は不死化ヒト卵巣表層上皮細胞株 hOSE の増殖能を促進することが分かっている。これらより卵巣癌におけるマクロファージの意義を解析する事が新たな臨床的展開の可能性を有しているものと考えられる。

2. 研究の目的

卵巣癌腹水中における M2 マクロファージへの分化に関わる因子を同定し、卵巣癌の治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 卵巣癌症例およびコントロール群症例の腹水を採取する。腹水のサイトスピン標本を作成し、免疫染色を行ない、腹水細胞中のマクロファージの割合から、総マクロファージ数、ならびに M2 マクロファージ数を求める。(マクロファージおよび M2 マクロファージのマーカーにはそれぞれ CD68, CD163 を用いた。) さらに、総マクロファージ中に占める M2 マクロファージの割合を明らかにする。腹水上清は -20 にて保存する。
- (2) 卵巣癌腹水がヒト単球系細胞株 THP-1 の分化に与える影響をみる。M2 マクロファージの指標には IL-10 を用いる。
- (3) 卵巣癌腹水を卵巣癌の発生母地とされる

hOSE とヒト卵巣癌細胞株 SKOV3 の培養液に添加し、細胞の増殖能を促進するかどうか検討する。

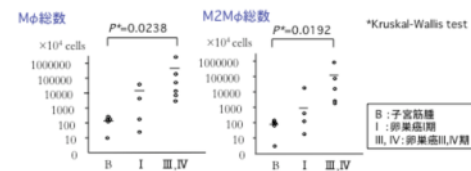
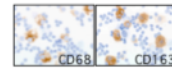
- (4) 卵巣癌患者の腹水中で増えているサイトカインの ELISA 解析を行なう。(IL-6、IL-8、IL1-0、IL-12、IL-15、GRO、LIF、MCP-1、M-CSF、TNF、VEGF)
- (5) 進行期卵巣癌の腹水中で増加しているサイトカインを M2 マクロファージが産生しているか、二重免疫染色にて検討する。
- (6) 進行期卵巣癌の腹水中で増加しているサイトカインを卵巣癌細胞株培養液に加え、細胞増殖に関わるか検討する。

4. 研究成果

腹水中では、マクロファージおよび M2 マクロファージの存在が免疫染色によって確認された。また、良性、卵巣癌 期(5 例)では良性疾患(5 例)や卵巣癌 期(4 例)に比べて腹腔マクロファージおよび M2 マクロファージが増加していた。(図 1)しかし、腹水中のマクロファージに対する M2 マクロファージの割合においては、良性より進行期卵巣癌の方が高い傾向を示すものの、有意な差はみられなかった。

図 1 腹水中のマクロファージ総数

- ① 腹水のサイトスピン標本を作成し、免疫染色を行なった。(抗体: Mφ-CD68, M2Mφ-CD163)
- ② 全腹水細胞数と上記で得られた陽性細胞数/全細胞数の割合から、腹水中のマクロファージ総数をカウントした。

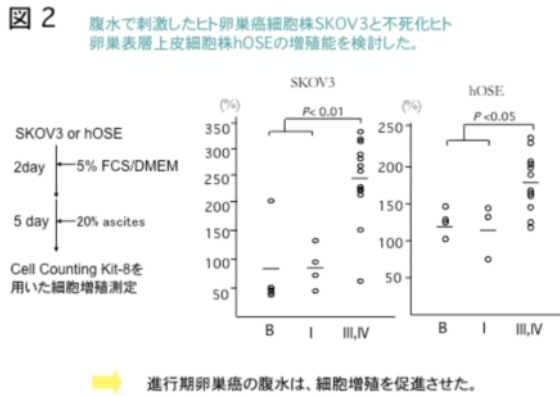


悪性度が高くなるにつれて、MφとM2Mφの増加がみられた。

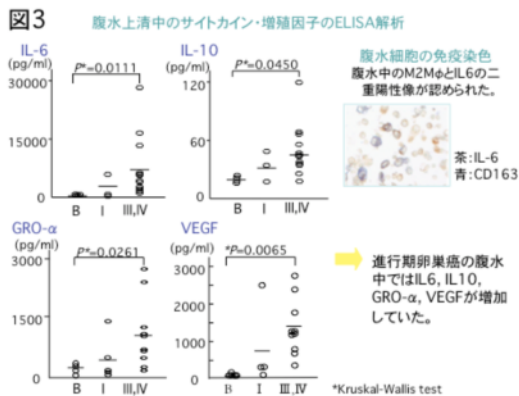
続いて、卵巣癌腹水がマクロファージの分化に及ぼす影響を検討した。THP-1 を腹水存在下で培養したところ、良性、卵巣癌 期、進行期卵巣癌と悪性度が増すごとに IL-10 の産生量の増加がみられた。IL-10 は M2 マクロファージが産生すると報告されており、これから、卵巣癌腹水はマクロファージを M2 マクロファージへ分化させる因子が含まれていることが示唆された。

hOSE と SKOV3 の培養液に 20%の濃度で腹水上清(良性 4 例、卵巣癌 期 3 例、卵巣癌 期 12 例)を加えて 5 日後に増殖能を検討した。良性や卵巣癌 I 期の腹水では細胞の増殖能に変化はなかったが、進行期卵巣癌症例の腹

水を加えた細胞では、有意に細胞の増殖能が促進された。(図2)

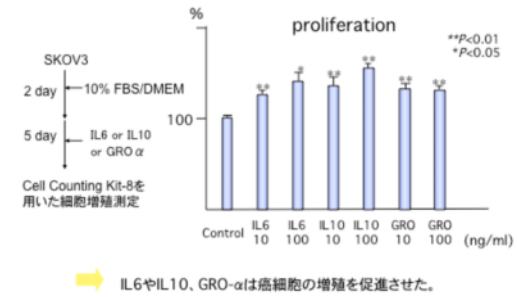


腹水上清(良性4例、卵巣癌 期3例、卵巣癌 期12例)中のサイトカインおよび増殖因子について検討したところ、IL-6、IL-10、GRO- α 、VEGFが良性および卵巣癌 期に比較して、進行期卵巣癌の腹水中で高い産生がみられた。IL-8、IL-15、LIF、MCP-1、M-CSFは産生がみられたが、進行期や悪性度による相違はみられなかった。IL-12とTNF- α は殆ど検出されなかった。IL-10はマクロファージ、IL-6は癌細胞によって産生されることは既に報告されているが、進行期卵巣癌の腹水中で増加しているIL-6は腹水中のM2マクロファージとの二重免疫組織化学にて、二重陽性像が確認され、M2マクロファージもIL-6を産生していることが示唆された。(図3)



次に、進行期卵巣癌腹水中で増加しているIL-6、IL-10、GRO- α が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。SKOV3をこれらのサイトカイン存在下で5日間培養を行ない、細胞増殖能を測定すると、これらの全てのサイトカインが細胞増殖能を促進することが示唆された。(図4)

図4 卵巣癌腹水中で増加のみられたサイトカインで刺激したヒト卵巣癌細胞株SKOV3の増殖能を検討した。



成績

進行期卵巣癌患者の腹水中ではマクロファージは増加しており、腫瘍増殖に關与するM2マクロファージの数も同様に増えていた。M2マクロファージの割合には差がみられなかったことから、悪性度に関わらず、腹腔マクロファージはM2マクロファージへ分化している傾向がみられた。また、進行期卵巣癌腹水はTHP-1によるIL-10の産生を促したことから、THP-1をM2マクロファージへ分化させたことが確認された。これより進行期卵巣癌腹水中にはマクロファージをM2へ分化させる因子が含まれていることが示唆された。さらに、その腹水中には、細胞増殖因子や血管新生因子が多く含まれていたが、これらのうちIL-6やIL-10はM2マクロファージが産生していることから、卵巣癌の腹水中におけるM2マクロファージの増加は腫瘍増殖に好環境の場を提供していることが示唆された。

最近、マクロファージのM2への分化に關与する因子が特定されつつある。細胞質タンパク質であるシグナル伝達性転写因子ファミリー (Signal transducer and activator of transcription: STAT) の一つであり、細胞増殖や生存、血管新生、免疫抑制に司るSTAT1、STAT3がM2マクロファージへの分化に關与することが報告された。これより、今後、卵巣癌腹水がマクロファージのSTAT3活性化に及ぼす影響を検討することで、さらなる腫瘍増殖に關与するマクロファージの機能の解明が期待される。

結論

進行期卵巣癌腹水中には、マクロファージをM2マクロファージへ分化させる因子が含まれており、腫瘍増殖、播種進展に好環境の場を提供していることが示唆された。よって、マクロファージのM2マクロファージへの分化が卵巣癌の播種進展に寄与している可能性が考えられ、M2マクロファージへの分化に關与する因子の同定が卵巣癌の治療戦略の一つと考えられた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

卵巣癌の腹腔内播種進展における腹水中 M2 マクロファージの関与、高石清美、田代浩徳、宮原 陽、河村京子、片淵秀隆、2009 年 4 月 4 日、京都市、日本産科婦人科学会総会

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮原 陽 (MIYAHARA YO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助手

研究者番号: 40404355

(2)研究分担者