

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09555

研究課題名(和文) 腫瘍内微小環境でのマクロファージCD163の機能解析と治療標的分子としての可能性

研究課題名(英文) Elucidation of the function of CD163-positive macrophages in the tumor microenvironment.

研究代表者

白石 大偉輔 (Shiraishi, Daisuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：70769512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境において腫瘍進展に寄与するマクロファージ(M₁)の活性化制御による骨肉腫の新たな治療戦略の開発を目的にM₁特異的分子であるCD163の骨肉腫進展に対する機能ならびにCD163標的化合物の抗腫瘍作用を評価した。その結果、CD163を抑制する環状硫黄化合物であるOnionin Aや、その誘導体がM₁の活性化を制御することで腫瘍細胞増殖を抑制することを明らかにした。また、それら化合物が腫瘍移植モデルマウスにおいても腫瘍浸潤M₁の活性化制御を介して腫瘍進展を抑制することを明らかにした。ゆえに、CD163を標的としたM₁の活性化制御が骨肉腫に対する新規治療戦略の候補とな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

本研究は骨肉腫における腫瘍浸潤マクロファージでのCD163の腫瘍免疫における役割を明らかにすることでCD163標的化合物を癌治療に応用しようとする研究である。本研究では数種の環状硫黄化合物がCD163を抑制することでマクロファージの活性化を抑制し、骨肉腫に対して有効性を示すことを明らかにした。本研究成果は骨肉腫治療において腫瘍浸潤マクロファージの活性化制御が治療ターゲットとなりうる可能性を明らかにしたことで新たな治療戦略の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop a new therapeutic strategy for osteosarcoma by regulating the activation of macrophages contributing to tumor progression in the tumor microenvironment, we evaluated the function of CD163, a macrophage-specific molecule, on tumor progression and the antitumor activity of CD163-targeting compounds. We found that Onionin A, a cyclic sulfur compound, and its derivatives inhibiting CD163 suppressed tumor progression by regulating macrophage activation. These compounds also inhibited tumor progression in tumor-bearing mice by stimulating tumor immunity through regulating the activation of tumor-infiltrating macrophages. Therefore, it is suggested that CD163-targeted regulation of macrophage activation may be a candidate for a novel therapeutic strategy against osteosarcoma.

研究分野：整形外科学

キーワード：腫瘍関連マクロファージ CD163 骨肉腫 肉腫 スルフィド化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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的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、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。また、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 TLR4 や 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各々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、代表的な M2 マクロファージマーカーとして知られている分子である CD163 の M2 マクロファージにおける機能に関しては、殆ど明らかにされていない。そこで、近年、我々はヒト未分化多形肉腫の病理組織やヒト末梢血単球由来マクロファージ、CD163 KO マウスを使用して、腫瘍における CD163 の機能解析を行うことで、M2 マーカーとしての CD163 のみならず、CD163 という 1 分子からみたマクロファージ活性化機構という新たな視点での研究を実施しており、ヒト病理組織において、未分化多形肉腫の腫瘍内に浸潤する M2 マクロファージは CD163 を高発現しており、CD163 陽性 M2 マクロファージと悪性度が正の相関を示し、予後不良との密接な関連が認められることを明らかにした [1]。また、肉腫移植モデルにおいて、CD163 KO マウスでは WT マウスと比較して皮下腫瘍重量ならびに、腫瘍の転移が有意に減少することを明にした [1]。つまり、M2 マクロファージで誘導される CD163 が肉腫においては、腫瘍免疫を抑制することで腫瘍進展に関与し、CD163 阻害化合物が肉腫治療に有効である可能性が示唆されたことから、CD163 の発現制御によるマクロファージの活性化制御が新たな癌の治療戦略につながる可能性が期待されている。

2. 研究の目的

上述の背景をもとに、我々はヒト未分化多形肉腫の病理組織やヒト末梢血単球由来マクロファージ、CD163 KO マウスを使用して、腫瘍における CD163 の機能解析を行うことで、M2 マーカーとしての CD163 のみならず、CD163 という 1 分子からみたマクロファージ活性化機構という新たな視点での研究を行っている。これまでの研究では M2 マクロファージで誘導される CD163 が肉腫においては、腫瘍免疫を抑制することで腫瘍進展に関与することが明らかとなっている、ゆえに、CD163 阻害化合物が肉腫治療に有効である可能性が示唆された。しかしながら、本研究の実施過程において、マウス骨肉腫細胞株 (AXT) を移植したマウスモデルでは、前述の肉腫移植モデルとは異なり、CD163 KO マウスでは皮下腫瘍重量の有意な増加が認められた。また、他の研究者の研究においても、ヒトにおける骨肉腫の病理組織では腫瘍内浸潤 CD163(+) M2 マクロファージと悪性度が負の相関を示し、CD163(+) M2M が多い症例では予後良好であると報告されている。ゆえに、マクロファージの CD163 は骨肉腫においては、肉腫の場合と全く異なり、逆に腫瘍抑制に寄与することが示唆された。つまり、がん腫の違いにより CD163 の腫瘍に対する作用が異なる可能性が示唆され、さらなるマクロファージにおける CD163 の機能解明のための解析が重要であると考えられた。そこで、本研究では、M2 マクロファージで誘導される 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、がん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旨として以下に示す基礎研究を行うことを目的とした。

- (1) CD163 KO マウスを用いた骨肉腫移植モデルによる CD163 の機能の解明
- (2) CD163 制御化合物 (CD163 抑制化合物および CD163 誘導化合物) の腫瘍移植 (骨肉腫や肉腫) モデルマウスにおける有効性の検証

3. 研究の方法

- (1) 骨肉腫移植モデルにおける CD163 の機能評価：骨肉腫細胞株 (AXT) を CD163WT/KO マウスに皮下移植し、腫瘍増殖や生存期間に与える影響を評価するとともに、皮下腫瘍を用いて免疫染色を行い、腫瘍内に浸潤しているマクロファージやリンパ球の数や活性化状態を解析した。
- (2) CD163 の腫瘍細胞増殖に与える影響の評価：CD163WT/KO のマクロファージと骨肉腫細胞株 (AXT) を共培養し、BrdU 取り込みアッセイにて、CD163 の腫瘍細胞の増殖に与える影響を評価した。
- (3) CD163 制御化合物の直接的な腫瘍増殖抑制作用の評価：マクロファージの CD163 発現を抑制する化合物 (Onionin A, 環状スルフィド化合物誘導体、Epimedkoreanin B) の直接的な癌細胞に対する抗腫瘍作用を WST-8 assay, ATP assay にて評価した。また、抗腫瘍作用を示す濃度にて、マクロファージやその他の腫瘍免疫関連細胞 (Myeloid-derived suppressor cells:MDSC, Treg, CTL, NK cell 等) を含む正常細胞に対する安全性 (毒性) も評価した。
- (4) 腫瘍細胞とマクロファージの共培養条件下における CD163 抑制化合物の腫瘍増殖抑制作用の評価：マクロファージとの細胞間相互作用 (直接培養・間接培養) による腫瘍細胞 (肺癌、肉腫、腎癌、卵巣癌等) の細胞増殖に対する CD163 抑制化合物の作用を BrdU 取り込みアッセイにて評価した。
- (5) 腫瘍移植モデルマウスにおける CD163 抑制化合物の抗腫瘍作用の評価：マウスの皮下に腫瘍を移植した腫瘍移植モデルマウスに CD163 抑制化合物を投与し、その抗腫瘍効果を評価 (腫瘍サイズや生存期間の測定等) すると共に、腫瘍組織を用いた免疫染色により、腫瘍細胞の活性化マーカー (Ki-67, pSTAT3, PCNA) やマクロファージ活性化マーカー、リンパ球 (CD8, CD4) の浸潤を評価した。
- (6) CD163 抑制化合物の細胞障害性抗がん剤との併用効果の検討：腫瘍移植モデルマウスを用いて、CD163 抑制化合物と既存の抗腫瘍療法 (シスプラチン等) との併用による抗腫瘍効果を評価すると共に腫瘍組織を用いた免疫染色により、腫瘍細胞の活性化マーカーやマクロファージ活性化マーカー、リンパ球の浸潤を評価した。

4. 研究成果

- (1) 骨肉腫移植モデルにおける CD163 の機能評価：CD163 KO マウスでは WT マウスと比較して腫瘍進展 (皮下腫瘍重量・肺転移) が促進した。一方、皮下腫瘍に浸潤するマクロファージの数やリンパ球の数には変化が認められなかったが、腫瘍細胞の活性化マーカーである Ki67 の発現は WT と比較して CD163 KO の腫瘍にて強く認められた。CD163 の腫瘍細胞の生着に与える影響を評価したところ、WT マウスでは CD163 KO マウスと比較して骨肉腫細胞 (AXT 細胞) の生着が抑制されたことから、マクロファージの CD163 が骨肉腫においては腫瘍形成の初期段階において抑制的に機能している可能性が示唆された。本研究結果は、これまでの肉腫、卵巣癌、肺癌等での検討結果と全く異なり、CD163 が骨肉腫においては腫瘍進展抑制に機能する可能性がある興味深い結果である。
- (2) CD163 の腫瘍細胞増殖に与える影響の評価：CD163WT/KO のマクロファージと骨肉腫細胞株 (AXT 細胞) を共培養し、BrdU 取り込みアッセイにて、CD163 の腫瘍細胞の増殖に与える影響を評価したところ、骨肉腫細胞株の増殖には有意な差は認められなかった。上記の *in vivo* 試験では、WT マウスと比較して CD163 KO マウスでは骨肉腫 (AXT 細胞) 移植により腫瘍進展が認められたことから CD163 の骨肉腫進展抑制作用には腫瘍形成の初期段階における抑制機能が強く関与している可能性が示唆された。
- (3) CD163 制御化合物の直接的な腫瘍増殖抑制作用の評価：マクロファージにおける CD163 発現を抑制する環状スルフィド化合物である Onionin A や環状スルフィド誘導体、生薬「イカリソウ」由来のフラボノイド化合物である Epimedkoreanin B は腫瘍細胞 (肺癌、肉腫、腎癌、卵巣癌等) に対して直接的な抗腫瘍作用を示さなかった。また、それら化合物はマクロファージやリンパ球を含む正常細胞に対しても毒性を示さないことを明らかにした[2,3]。
- (4) 腫瘍細胞とマクロファージの共培養条件下における CD163 抑制化合物の腫瘍増殖抑制作用

用の評価：マクロファージと腫瘍細胞（肺癌、肉腫、腎癌、卵巣癌等）との共培養条件下において CD163 発現を抑制する化合物（Onionin A, 環状スルフィド化合物誘導体、Epimedkoreanin B）はマクロファージの活性化を制御することで腫瘍細胞の増殖を抑制することを明らかにした[2,3]。つまり、CD163 抑制化合物はマクロファージの活性化を制御することで腫瘍細胞の増殖を抑制することが示唆された。

- (5) 腫瘍移植モデルマウスにおける CD163 抑制化合物の抗腫瘍作用の評価：腫瘍細胞（肺癌、肉腫、腎癌、卵巣癌等）を移植したマウスへの CD163 抑制化合物（Onionin A, 環状スルフィド化合物誘導体、Epimedkoreanin B）投与により腫瘍進展（腫瘍重量・腫瘍サイズ）が減少し、皮下腫瘍における腫瘍の活性化マーカーである pSTAT3 陽性細胞数が減少した[2,3]。また、これら CD163 抑制化合物は皮下腫瘍の進展のみならず腫瘍の肺転移を有意に抑制し、腫瘍内におけるリンパ球の活性化も誘導することを明らかにした[2,3]。ゆえに、マクロファージにおける CD163 抑制化合物が腫瘍の進展・増殖に抑制的に機能していることが示唆された。
- (6) CD163 抑制化合物の細胞障害性抗がん剤との併用効果の検討：腫瘍移植モデルマウスを用いて、CD163 抑制化合物が既知抗腫瘍療法（抗 PD-L1 抗体、シスプラチン）との併用効果が認められることを明らかにした。ゆえに、本研究により CD163 抑制化合物がマクロファージの活性化制御に基づく小細胞肺癌に対する新規治療戦略の候補となりうる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 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).
- 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).
- Pan C, Fujiwara Y, Horlad H, Iriki T, Shiraishi D, Komohara Y. Cyclic sulfur compounds targeting macrophage polarization into M2/protumor phenotype and their anti-tumor effects. *Cancer Immunol Immunother.* **71**, 1331-1343 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara Yukio, Ohnishi Koji, Horlad Hasita, Saito Yoichi, Shiraishi Daisuke, Takeya Hiroto, Yoshii Daiki, Kaieda Shinjiro, Hoshino Tomoaki, Komohara Yoshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 CD163 deficiency facilitates lipopolysaccharide induced inflammatory responses and endotoxin shock in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 e1162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cti2.1162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Pan Cheng, Fujiwara Yukio, Horlad Hasita, Shiraishi Daisuke, Iriki Toyohisa, Tsuboki Jyunko, Ikeda Tsuyoshi, Komohara Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Flavonoid Compounds Contained in Epimedii Herba Inhibit Tumor Progression by Suppressing STAT3 Activation in the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.00262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学講座ホームページ http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/patho2/patho2.html	
--	--

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	孤原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	藤原 章雄 (Fujiwara Yukio)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関