

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16595

研究課題名(和文)腫瘍微小環境に着目した新規予後予測因子の解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of a novel prognostic factor focusing on tumor microenvironment and its application to molecular targeted therapy

研究代表者

三木 友香理(MIKI, YUKARI)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70397876

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、腫瘍微小環境及び患者末梢血中に存在する免疫担当細胞が腫瘍の増殖や転移に与える影響を解明するために、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌の患者末梢血中の白血球数、切除組織に存在する免疫担当細胞の分布と臨床病理学的因子の関連を検討した。その結果、腫瘍によって関連する因子に差が見られた。また、各腫瘍細胞株とM1、M2マクロファージとの共培養によって得られた培養上清のサイトカイン定量の結果、コントロールと比較してすべての細胞株でCCL2(MCP-1)、TGF-、VEGF、IL-1RAの産生量に大きな変化が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腫瘍間質に出現する免疫担当細胞が腫瘍に与える影響、及び末梢血中の血液検査データから腫瘍の浸潤や転移の予測因子について明らかにした。さらに腫瘍細胞とマクロファージの作用によりCCL2(MCP-1)、TGF-、VEGF、IL-1RAの産生が影響を受けることを明らかにした。これらの結果は腫瘍による違いはあるものの病理診断時に客観的な予後予測につながる新たな検査技術が構築できるとともに、診断時の免疫担当細胞の分布から推測される腫瘍増殖因子をターゲットとした新たな分子標的治療が開発できれば、各症例に合わせたより副作用の少ない治療への貢献につながるものと期待できる。

研究成果の概要(英文):This study examined the relationship between the white blood cell count in the peripheral blood of patients with gastric, colon, breast, and lung cancers, the distribution of immunocompetent cells in the resected tissues, and the clinicopathological factors, to elucidate the effects of immunocompetent cells in the tumor microenvironment on tumor proliferation and metastasis. Our findings revealed variations in the relevant factors depending on the type of tumor. In addition, the quantitative analysis of cytokines in culture supernatant obtained from the coculture of various tumor cell lines with M1 and M2 macrophages showed significant changes in the production amount of CCL2 (MCP-1), VEGF, TGF- and IL-1RA in all cell lines compared to the control.

研究分野：人体病理学

キーワード：腫瘍微小環境 マクロファージ 細胞傷害性T細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性腫瘍の発生から増殖や浸潤、転移を起こす過程において腫瘍間質におけるリンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞の存在や、血管内皮細胞及び線維芽細胞が作り出す新生血管などの微小環境が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。腫瘍間質には種々の免疫担当細胞とともにマクロファージの浸潤がみられることは以前から知られていたが、腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) が腫瘍の増殖や転移に与える影響について近年注目されている。従来は、腫瘍細胞そのものをターゲットした研究が広く行われてきた。近年では、腫瘍細胞のみならず、腫瘍をとりまく微小環境に出現する細胞から分泌される様々なサイトカインや増殖因子が、腫瘍の増殖や転移に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。TAM は、Th1 から産生される IFN- γ によって活性化され、抗腫瘍免疫促進に働く M1 マクロファージと Th2 から産生される IL-4、IL-13 によって活性化され、腫瘍促進性に働く M2 マクロファージに分類される。腫瘍微小環境には M2 マクロファージが多いといわれており、腫瘍細胞の増殖を刺激する IL-10 や TGF- β 、基底膜構成成分のコラーゲンを分解し転移を惹起する matrix metalloproteinase (MMP)、血管新生を促進する血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) などを分泌する。種々の悪性腫瘍では TAM が多いほど予後不良であるとの報告がある。一方、大腸癌では、TAM が多いほど予後良好であるといわれており、TAM が腫瘍微小環境でどのような作用を示すのかについては未だ不明な点が多い。

腫瘍微小環境に出現する免疫担当細胞は様々なシグナルを受け、各種サイトカインを分泌する。分泌するサイトカインの種類や産生量は症例によって大きく異なり、腫瘍の増殖に与える影響も異なることが推測できる。

2. 研究の目的

本研究は、悪性腫瘍の予後予測因子および新規分子標的治療ターゲット分子の解明を目的として研究を行う。腫瘍間質に出現する TAM をはじめとした免疫担当細胞の分布が腫瘍にどのような影響を与えるか、また、産生されるサイトカインがどのように作用するのかを網羅的に解析し、腫瘍の増殖や転移との関連を解明する。また、末梢血血液データと腫瘍間質に出現する免疫担当細胞の分布との関連を検討することにより、腫瘍診断時に腫瘍の浸潤や予後予測ができる可能性を検討する。

3. 研究の方法

1. 対象

切除手術により摘出された胃癌 40 症例、大腸癌 40 症例、乳癌 40 症例、肺癌 40 症例 (腺癌 20 症例、扁平上皮癌 20 症例) を対象とした。

各症例それぞれのがん取り扱い規約に従って、組織型や分化度、リンパ節転移の有無、脈管侵襲、進行度 (Stage) などの分類を行った。

また、各症例の術前血液検査データを用いて、白血球数と白血球分類 (%) から好中球、リンパ球、単球の実数を算定した。

2. 病理組織標本中に存在する免疫担当細胞の分布と臨床病理学的因子との関連

各症例に対し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) のマーカーとして CD8、TAM のマーカーとして CD68、TAM のうち腫瘍促進性に作用するといわれている M2 マクロファージマーカーとして CD163 を用いて免疫組織化学染色を行った。各症例の正常領域と腫瘍領域について各細胞数をカウントして、1 視野当たりの平均細胞数を算出した。乳癌組織については腫瘍領域のみのカウントとした。また、各症例の腫瘍増殖能 (MIB-1-index) を算出した。

各細胞数、MIB-1 index と年齢、性別、組織型、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、遠隔転移、Stage などの臨床病理学的因子との関連について統計学的解析を行った。

3. 末梢血中の免疫担当細胞と臨床病理学的因子及び病理組織標本中の免疫担当細胞数との関連

各症例の術前血液検査データから算出した好中球、リンパ球、単球数と臨床病理学的因子との関連について統計学的解析を行った。

さらに、上記 1 でカウントした病理組織標本中の免疫担当細胞 CTL、TAM、M2 マクロファージの分布と末梢血中の好中球、リンパ球、単球数との関連について統計学的に解析を行った。

4. M1 および M2 マクロファージと腫瘍細胞の共培養により産生されるサイトカイン定量

Lonza 社より購入した CD14 陽性細胞について R&D Systems 社の Human M1 Macrophage Differentiation Kit 及び Human M2 Macrophage Differentiation Kit を用いて M1 マクロファージ、M2 マクロファージの分化誘導を行った。

これら分化誘導で得られた M1 及び M2 マクロファージと胃癌細胞株 NUGC-3、大腸癌細胞株 DLD-1、乳癌細胞株 MCF-7、肺腺癌細胞株 RERF-LC-Ad1、肺扁平上皮癌細胞株 LK-2 による共培養を行った。5 日後に M1、M2 マクロファージ単独培養、腫瘍株単独培養の培養上清及び M1 あるいは M2 マクロファージとの共培養後の培養上清を回収した。

これら培養上清について BioLegend 社の Legendplex™ を用いてマクロファージ関連サイトカイン CCL2 (MCP-1)、TGF-β1、VEGF、TNF-α、IL-1β、IL-1RA、IL-6、IL-10、IL-12p40、IL-12p70 の定量を行った。

5. 関連サイトカインの免疫組織化学染色及び in situ hybridization 法 による解析

上記方法 4 においてすべての細胞株で定量結果に大きな差がみられたサイトカイン CCL2 (MCP-1)、TGF-β、IL-1RA、VEGF について、方法 1 で検討した病理組織標本での免疫組織化学染色によるタンパクの検出と in situ hybridization 法による mRNA の検出を試みた。

4. 研究成果

1. 病理組織標本中に存在する免疫担当細胞の分布と臨床病理学的因子との関連

胃癌、大腸癌、乳癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌組織における CTL、TAM、M2 マクロファージの分布を検討した。

胃癌では、CTL はリンパ管侵襲を認める症例で有意に多く、進行した症例で多く分布している傾向がみられた。TAM はすべての症例において正常領域と比較して腫瘍領域に多く分布していた。また、予後の悪い症例（5 年以内に死亡した症例）に TAM が多く分布している傾向があった。以上の結果から、CTL や TAM が多い症例ほど予後不良であることが示唆された。

大腸癌では、CTL と TAM の分布にやや正の相関を認めた ($r=0.3280, p<0.05$)。CTL は高分化型の症例で有意に多く、静脈侵襲を認める症例では少ない傾向にあった。TAM と M2 マクロファージの分布については正常領域と比較して腫瘍領域に多く分布する症例と少ない症例が約半数ずつあり、臨床病理学的因子との関連を認めなかったが、TAM と腫瘍増殖能には正の相関を認めた。大腸癌組織について、MMP-9 の免疫組織化学染色を行ったところ、MMP-9 を高発現している症例では CTL、TAM、M2 マクロファージの分布が多かった。さらに、MMP-9 が高発現している症例は有意に腫瘍増殖能が高かった。このことから大腸癌では TAM や M2 マクロファージよりも CTL が腫瘍の浸潤や転移に関わっており、CTL が多いほど予後良好であることが示唆された。

乳癌では腫瘍領域のみの解析の結果、大腸癌と同様に CTL と TAM の分布に正の相関を認めた ($r=0.4038, p<0.01$)。CTL はホルモンレセプター (ER、PgR) 陰性症例で有意に多く、Stage の進行した症例で多い傾向があった。TAM は Stage の進行した症例に多く分布しており、M2 マクロファージは腫瘍増殖能が高い症例で多く分布していた。さらに乳癌組織について PD-L1 の発現を検討したところ、PD-L1 が腫瘍細胞に高発現している症例で腫瘍増殖能が高く、CTL 及び M2 マクロファージが多く分布していた。これらの結果より、CTL、TAM、M2 マクロファージはが多い症例ほど腫瘍が進行しており、予後不良となることが示唆された。

肺癌では、腺癌、扁平上皮癌ともに CTL と M2 マクロファージの分布にやや正の相関を認めた ($r=0.38325, p<0.05$)。CTL、TAM、M2 マクロファージはすべての症例で正常領域と比較して腫瘍領域に多く分布していた。また、腺癌症例と扁平上皮癌症例で CTL、TAM、M2 マクロファージの分布に大きな差は見られなかった。CTL は低分化の症例で多く分布していた。M2 マクロファージは若年者の症例で多く分布しており、低分化の症例、リンパ節転移を認める症例、胸膜浸潤を認める症例で多く分布していた。TAM の分布は臨床病理学的因子との関連はみられなかったが、他の腫瘍と比較して正常領域と腫瘍領域の境界部に多数出現していた。これは腫瘍境界部での腫瘍免疫に大きな役割を担っていることが考えられた。肺癌では、TAM よりも CTL 及び M2 マクロファージが多いほど予後不良因子となることが示唆された。

2. 末梢血中の免疫担当細胞と臨床病理学的因子及び病理組織標本中の免疫担当細胞数との関連

末梢血血液データから算出した好中球、リンパ球、単球の数と各腫瘍の臨床病理学的因子との関連について統計学的に解析を行った。胃癌では、末梢血中の好中球は低分化の症例、深達度が深い症例、リンパ節転移のある症例、Stage の進行した症例で多く存在していた。また、Stage が進行した症例では末梢血中の単球も多く存在していた。大腸癌では、深達度の深い症例で好中球数が多存在しており、上行結腸や横行結腸の腫瘍と比較して S 上結腸や直腸の腫瘍

でリンパ球が多く存在していた。また、リンパ節転移のある症例、遠隔転移のある症例、Stage の進行した症例でリンパ球数が少なかった。乳癌では、好中球数が腫瘍増殖能の高い症例で少なく、Stage が進行した症例で多いという結果が得られた。肺癌では、末梢血中の単球が腺癌と比較して扁平上皮癌で多く存在していた。これは扁平上皮癌の患者が喫煙者に多く、喫煙者の肺組織にはマクロファージが多いことと関連があると考えられる。また、腫瘍の T 分類が進行した症例、Stage が進行した症例で好中球と単球が多く存在していた。

また、末梢血中の好中球、リンパ球、単球数と病理組織標本中の正常領域および腫瘍領域に存在する CTL、TAM、M2 マクロファージの数との相関について検討した。末梢血リンパ球数と病理組織中の CTL、単球と病理組織中の TAM あるいは M2 マクロファージとの関連を期待したが、これらの細胞群で相関を認めたものは肺扁平上皮癌症例の末梢血単球数と組織標本中の正常領域に存在する TAM のみであった ($r=0.5542$, $p<0.05$)。その他の細胞は、胃癌症例では末梢血単球数と組織標本中の腫瘍領域に存在する CTL ($r=0.5145$, $p<0.05$)、肺扁平上皮癌症例では末梢血中の好中球数と正常領域の CTL ($r=0.6119$, $p<0.05$)、TAM ($r=0.6013$, $p<0.05$)、末梢血中の単球数と正常領域の CTL ($r=0.5870$, $p<0.05$) に相関を認めた。その他の腫瘍においては末梢血中の好中球、リンパ球、単球数と病理組織標本中の CTL、TAM、M2 マクロファージとの相関は認めなかった。

3. M1 および M2 マクロファージと腫瘍細胞の共培養により産生されるサイトカイン定量

M1 及び M2 マクロファージと腫瘍細胞株を共培養した培養上清についてマクロファージ関連サイトカインの定量を行った。その結果、TNF- α 、IL-10、IL-12p40、IL-12p70 については培養後のサイトカイン量に変化はみられなかった。IL-1 β は胃癌細胞株 NUGC-3 でのみ発現上昇がみられたが、腫瘍細胞単独、M1、M2 マクロファージとの共培養による上清で同程度の産生量であった。これは NUGC-3 細胞による産生が両マクロファージにより影響を受けいないと考えられた。また、遠隔転移を促進するサイトカインである IL-6 は乳癌細胞株 MCF-7、肺腺癌細胞株 RERF-LC-Ad1 においてコントロールである腫瘍細胞単独培養上清と比較して、M2 マクロファージとの共培養上清で軽度の産生増加を認めた。

すべての腫瘍細胞株で大きな変化を認めたサイトカインは CCL2 (MCP-1)、TGF- β 1、VEGF、IL-1RA の 4 種であった。CCL2 (MCP-1) は M1 マクロファージ単独培養と比較して M2 マクロファージ単独培養で産生量が大きく増加していた。各腫瘍細胞株との共培養において肺腺癌細胞株 RERF-LC-Ad1 を除くすべての腫瘍で M2 マクロファージとの共培養上清での産生が上昇していた。これは CCL2 (MCP-1) が抗腫瘍活性を増強させる因子であることから、M2 マクロファージが細胞増殖に関わるというこれまでの報告と一致している。

TGF- β 1、VEGF は、M1 及び M2 マクロファージ単独培養上清では産生がみられなかったが、各腫瘍細胞株の培養上清では産生レベルに差が認められるもののすべての細胞株において産生が確認された。TGF- β 1 は、M1 あるいは M2 マクロファージとの共培養において、大腸癌細胞株 DLD-1 以外の細胞株では M1 マクロファージとの共培養では細胞株単独培養と同程度の産生量であったのに対し、M2 マクロファージとの共培養では産生量が明らかに増加していた。DLD-1 では、コントロール、M1 及び M2 マクロファージとの共培養での変化は認めなかった。また、VEGF は乳癌細胞株 MCF-7 では共培養による産生量に変化はみられなかったが、その他の細胞株では M2 マクロファージとの共培養で産生上昇を認めた。

IL-1RA は腫瘍細胞株単独培養では産生を認めなかったが、M1 及び M2 マクロファージ単独培養で産生上昇を認め、M1 マクロファージの培養上清で産生レベルが高かった。腫瘍細胞株との共培養では、胃癌細胞株 NUGC-3、肺腺癌細胞株 RERF-LC-Ad1 は M2 マクロファージとの共培養で M1 マクロファージと共培養と比較して、産生量が大きく上昇しており、その他の細胞株では M1、M2 マクロファージとの共培養による差は認められなかった。

4. 関連サイトカインの免疫組織化学染色及び in situ hybridization 法による解析

腫瘍細胞株と M1 あるいは M2 マクロファージとの共培養によりサイトカイン産生に大きな変化を認めた CCL2 (MCP-1)、TGF- β 1、VEGF について、免疫担当細胞及び臨床病理学的因子の検討を行った腫瘍組織標本中における蛋白量をみるための免疫組織化学染色と産生場所を推測するための mRNA 発現量をみるために in situ hybridization 法を試みた。

しかし、組織中でのサイトカイン発現量が少なく、比較できるほどの明確な染色結果には至らなかった。mRNA についても解析に十分な染色結果とはならなかった。サイトカインの産生や作用については、多くの細胞の影響を受けることが考えられるため、in vitro で行った結果をそのまま反映するかどうかは不明であり、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。また、今回用いた症例が 10 年以上経過したものであったことが考えられるため、今後は新規の症例でこれら因子の解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------