

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590415

研究課題名（和文）腫瘍内マクロファージは単球系の骨髄由来抑制細胞を由来とするか？

研究課題名（英文）Are tumor-infiltrating macrophages derived from monocyte-lineage belonging to the myeloid-derived suppressor cell?

研究代表者

高見 剛（TAKAMI TSUYOSHI）

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70136943

研究成果の概要（和文）：腫瘍内浸潤マクロファージ（TIM）の由来を明らかにすべく、細胞のマーカープロファイル、産生サイトカインおよびケモカインを解析し、その抗原提示能を検討した。その結果、TIM は従来より提唱されている腫瘍抑制性マクロファージ（M1 マクロファージ）、腫瘍親和性マクロファージ（M2 マクロファージ）のいずれかに分けることができない、両者の性格を併せ持つ細胞集団であることが明らかになった。一方、M-CSFR siRNA + GM-CSF 処理は TIM のマーカープロファイルに変化をきたさなかったが、抗原呈示樹状細胞への分化に必要な細胞内シグナル伝達分子、STAT-1、STAT-5、STAT-6 の有意な発現を誘導した。しかしながら、OVA 抗原特異的受容体トランスジェニックマウスを用いた検討で、M-CSFR siRNA + GM-CSF 処理 F4/80 陽性 TIM および未処理 TIM のいずれもが抗原提示能を示し、両者間に有意な抗原提示能の差は観察されなかった。これらの結果から、TIM は浸潤した腫瘍組織内の環境に影響されて M1 あるいは M2 マクロファージなどの表現系を示すものであり、単球系の骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）と称されるべき特定の細胞集団ではなく、環境に反応して性格を変えうる、可塑性を保持した細胞であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The marker profile, production of cytokine and chemokine, and antigen-presenting capability were studied to clarify the origin of tumor-infiltrating macrophages (TIM). Our results clearly showed that TIM was the heterogeneous cell population having both capabilities of tumor-suppressing (M1) macrophage and tumor-promoting (M2) macrophages. On the other hand, the treatment of TIM with GM-CSF and siRNA for M-CSF induced the intra-cellular signal transducing molecules such as STAT-1, STAT-5, and STAT-6 of which are necessary for maturation toward antigen-presenting dendritic cells, nevertheless the marker-profiles of treated TIM did not change significantly. However both of the GM-CSF and siRNA for M-CSFR treated and non-treated TIM revealed similar antigen presenting capabilities in the system using OVA-specific TCR transgenic mice. Altogether it was clarified that the phenotype of TIM was reflecting the invading tumor microenvironment, and not certain cell type such as myeloid-derived suppressor cells, but was the cell that still kept plasticity and could be changed by surrounding microenvironment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：TIM、M1 マクロファージ、M2 マクロファージ、骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC)、抗原呈示樹状細胞、GM-CSF、M-CSF siRNA、可塑性

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内には多数のマクロファージが浸潤し、腫瘍関連マクロファージ (TAM) あるいは腫瘍浸潤マクロファージ (TIM) と呼ばれ研究されてきた。その結果、T リンパ球の Th1 と Th2 になぞらえて、TIM には免疫反応を惹起して腫瘍増殖を抑える腫瘍抑制性 (M1) マクロファージと、逆に腫瘍の増殖を助ける (M2) マクロファージの2種類があるとされてきた。一方、腫瘍内浸潤細胞の機能的解析から、腫瘍組織では骨髄由来の浸潤細胞が免疫反応を抑制することが示され、骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC) と呼ぶことが提唱された。しかしながら、MDSC は従来の M1 および M2 マクロファージの概念に触れることなく提唱されたものであり、腫瘍内浸潤マクロファージの由来と働きの理解に混乱をもたらしている。

2. 研究の目的

腫瘍組織には、旧来の分類に拠れば M1 あるいは M2 マクロファージが浸潤し、近年の概念からすると MDSC が浸潤している。本研究では TIM の性格を明らかにし、M1 および M2 マクロファージ、MDSC の相互関係を明確にすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス可移植腫瘍 (大腸癌 MC38、脳グリオーマ GL261) を同系 C57BL/6 マウス皮下に移植し、3週間目の TIM を分離精製して研究に供する。

(2) TIM の分離にはマクロファージに発現の強い抗原 F4/80 に対する抗体を結合した磁気ビーズを用い、ポジティブセレクションでマクロファージを精製した。

(3) F4/80+ TIM の表面抗原 (CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD34, CD80, CD115, Gr1, Ly6C, Ly6G, IL-4Ra, F4/80, M-CSFR1) を、フローサイトメトリー (FCM) で解析した。

(4) マクロファージの分化・成熟に関与するケモカインとその受容体 (CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8, CCL17, CCL22, CXCL10, CXCL12a, CXCL12b, CXCL12c, CCR2, CCR3, CX3CR1, CXCR4)、サイトカインとその受容体 (GM-CSF, M-CSF1, GM-CSFR, GM-CSFRt, M-CSFR1, M-CSFR2, IFN, TGFb1, TGFb2, TGFb3, TNFa)、そのた関連物質 (IL-1b, IL-4, IL-6,

IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, c-kit, c-kitL, Foxp3, CD36) は TIM より型通り精製した mRNA を用い、リアルタイム PCR で解析した。

(5) TIM の可塑性を明らかにするため、抗原呈示能の誘導が可能か否かを、GM-CSF あるいはマクロファージへの分化に働く M-CSF の働きを抑制する M-CSFR siRNA と GM-CSF 処理の効果を検査することで検討した。

(6) 抗原呈示能は OVA 抗原特異的 TCR トランスジェニック C57BL/6 マウスを用い、未処理ならびに GM-CSF あるいは M-CSFR siRNA + GM-CSF 処理 TIM で検討した。

4. 研究成果

(1) 本研究では F4/80 抗体結合磁気ビーズにより TIM を精製して研究に供したが、以下に示す結果は、これまで当研究室が行って来た MDSC をターゲットとした CD11b 抗体結合磁気ビーズを用いて精製した TIM の研究結果と、マーカープロファイルは同等であった。図 1 に精製 TIM の FCM 解析結果を示す。図 1C のように、F4/80+細胞と CD11b+細胞の大多数は同一細胞であった。

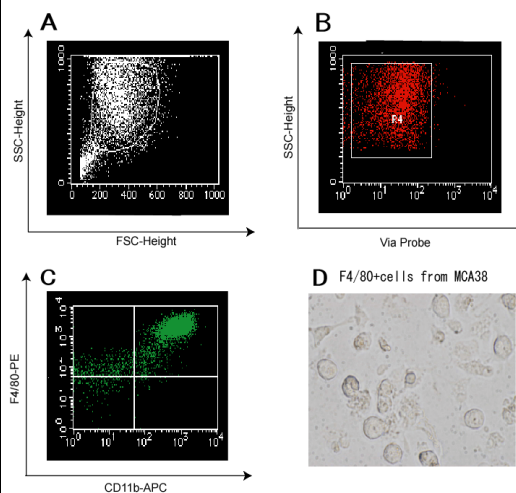


図 1

(2) 図 1 の D にみられるように、精製 TIM は腹腔マクロファージと同様に、短時間培養でプラスチックシャーレに付着性を示した。

(3) MC38 および GL261 に浸潤した TIM はいずれも M1 マクロファージに特徴的な IL-1 β 、TNF α 、CXCL10 を発現する一方、M2 マクロファージに特徴的な CCR2、CD36、CD206 を発現していた (図 2)。

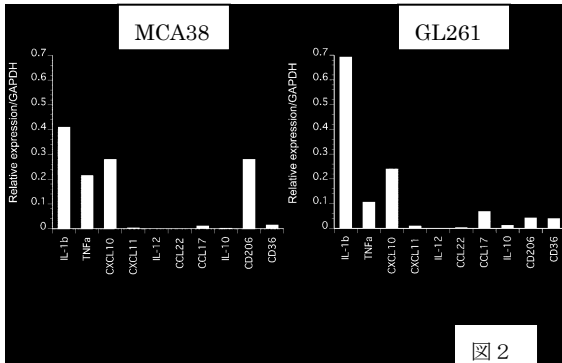


図 2

(4) 精製 TIM に抗原提示樹状細胞への分化に関する GM-CSF を添加して培養すると、プラスチック付着性は若干低下したが、形態的に樹状細胞に相当する像は観察されなかった (図 3)。

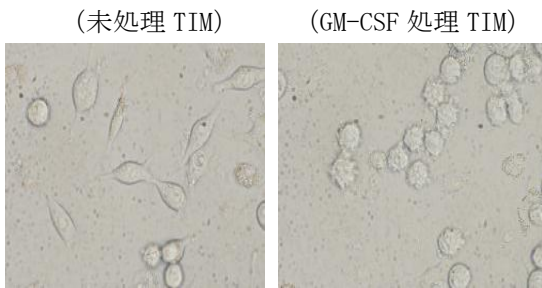


図 3

また、M1 ならびに M2 マーカープロファイル、および細胞内シグナル伝達分子の発現に有意差は観察されなかった (図 4)。

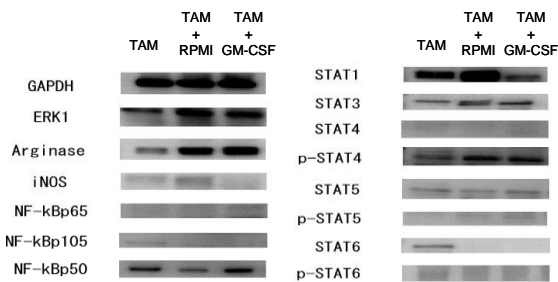


図 4

(5) GM-CSF に加えてマクロファージへの分化を進める M-CSF の作用を抑制する目的で M-CSFR siRNA をさらに添加した培養では、細胞形態学的に大きな変化は観察されず、マ

カープロファイルにも有意差は検出されなかった (図 5)。

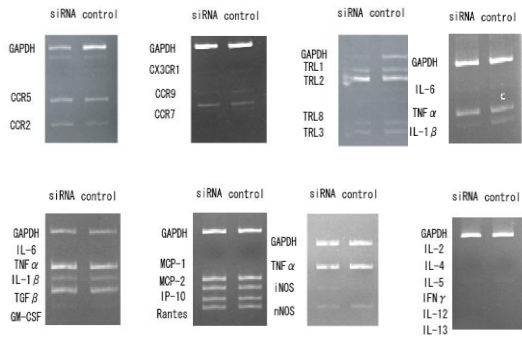


図 5

しかしながら、GM-CSF + M-CSFR siRNA 処理では、STAT-1、STAT-5、STAT-6 などの抗原呈示細胞への分化に必要な細胞内シグナル伝達分子の発現が観察された (図 6)。

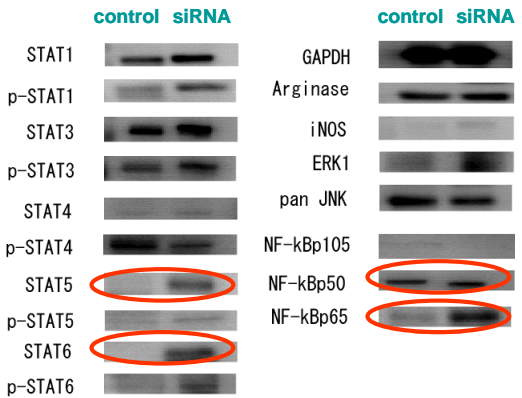


図 6

(6) GM-CSF + M-CSFR siRNA 処理 TIM と未処理 TIM のいずれも、OVA 抗原特異的 TCR トランスゲニックマウスの系では抗原呈示能が検出され、両者間に有意差は認められなかった (図 7)。

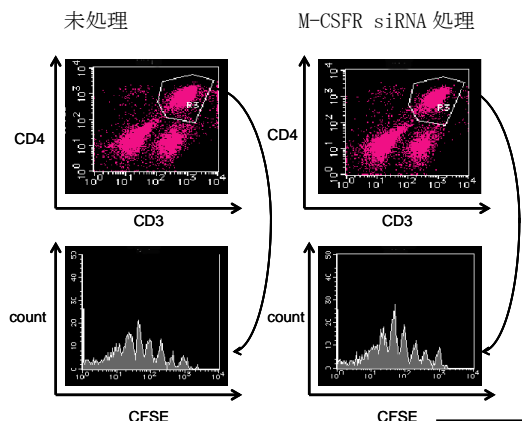


図 7

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)

[雑誌論文] (計1件)

Kitoh Y, Saio M, Gotoh N, Umemura N, Nonaka K, Bai J, Vizkeleti L, Torocsik D, Balazs M, Adany R, Takami T, Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic cell-like signaling in vitro, International Journal Oncology, Vol.38, 2011, pp1409-1419

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高見 剛 (TAKAMI TSUYOSHI)

岐阜大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号 ; 70136943

(2)研究分担者

後藤 尚絵 (GOTOH NAOE)

岐阜大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 80444280

鬼頭 勇輔 (KITOH YUSUKE)

岐阜大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 80444305

(3)連携研究者