

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 31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592137

研究課題名（和文）腹腔マクロファージの分化制御による卵巣癌腹膜播種の抑制を目指した治療法の開発

研究課題名（英文）Novel strategy to control the differentiation of macrophages in ascites for the suppression of ovarian cancer dissemination

研究代表者

田代 浩徳（TASHIRO HIRONORI）

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：70304996

研究成果の概要（和文）：

卵巣癌の伸展様式の特徴は、腹腔内への播種であるが、その過程に M2 に分化したマクロファージの関与が指摘されている。われわれは、癌化したヒト卵巣表層上皮細胞株や卵巣癌細胞株を用いた卵巣癌腹膜播種病巣の実験モデルを作成し、そのなかで腹腔マクロファージやそれが産生するサイトカインの機能を検討し、マクロファージの機能を制御することで腹膜播種病巣を抑制する仕組みを発見した。すなわち、マクロファージと卵巣癌細胞が互いの Stat 3 の活性化により、マクロファージの分化と癌細胞の増殖能の亢進が惹起されることを見出した。さらには、banana plant に含まれる corosolic acid がマクロファージの M2 への分化を抑制するとともに Stat3 の不活化で卵巣癌細胞の増殖をも抑制し、新規治療薬の候補となることが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：

Ascites macrophages in advanced epithelial ovarian cancer (AdEOC) are involved in cancer metastasis and progression by modifying the tumor microenvironment. We investigated the function of macrophages in the ascites of advanced epithelial ovarian cancers and the cell-to-cell interactions between macrophages and EOC cells through Stat3 activation. M2 macrophages in the ascitic fluid may influence epithelial ovarian cancer development via STAT3 activation. Macrophage differentiation could be targeted for development of anticancer therapeutic drugs. Furthermore, corosolic acid (CA), a triterpenoid compound, is contained in the leaves of the banana plant (*Lagerstroemia speciosa* L.). The compound possesses various biological properties, including anti-diabetic, anti-obesity and anti-oxidative activities. We investigated the cytotoxicity of CA against human ovarian cancer cell lines. CA inhibited the proliferation of ovarian cancer cells by suppressing the activation of STAT3. Therefore, CA might be a potential new tool for tumor prevention and therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：婦人科腫瘍学・卵巣癌・腹膜播種・腹腔マクロファージ・STAT3・colosoric acid

1. 研究開始当初の背景

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 $6.0\sim 7.0\times 10^6$ のマクロファージが存在するといわれている。近年マクロファージは炎症、腫瘍の進展などに重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。また、上皮性卵巣がんの症例においても、腹水中にはマクロファージは増加していることや、腫瘍組織間にも浸潤、集簇することは既に知られており、マクロファージは腫瘍周囲の環境に従って、腫瘍に対して抑制的にも促進的にも作用するとされている。

一方、マクロファージに関する研究から、マクロファージは炎症性サイトカインにより誘導されるものをM1マクロファージとし、抗炎症性サイトカインにより誘導されるものをM2マクロファージとし、細胞増殖に関与するTumor associated macrophage (TAM) はM2マクロファージの性格を有していることが明らかになりつつある。

これまでの当教室における卵巣癌症例における腹腔マクロファージの研究において、卵巣癌症例の臨床進行期と腹水中のM2マクロファージ数の相関が明らかとなっている。またこの腹水中のM2マクロファージの作用を検討する目的で、腹水中のサイトカインを、サイトカインアレイにより測定したところ、卵巣癌症例の腹水中ではInterleukin-6(IL-6)、IL-8、IL10、IL-15、Monocyte chemotactic protein-1、Growth related oncogene が検出された。更に、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を培養した上清中は卵巣癌細胞株と不死化ヒト卵巣表層上皮細胞株の増殖

能を高めることも判明した。これらより卵巣癌の特徴である腹水中におけるマクロファージの意義を解析すること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た。さらに、マクロファージのM2への分化を抑制する天然化合物として、corosolic acid(CA)が知られているが、CAは子宮頸癌細胞株に対する細胞毒性を有することも報告されている。卵巣癌細胞株への細胞毒性を有することが認められると、マクロファージの分化抑制と細胞毒性によって、さらなる播種進展を抑制することが期待される。

2. 研究の目的

卵巣癌腹水中のマクロファージがM2マクロファージへ分化することで、腫瘍増殖を促進する環境の場を提供していることが考えられる。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への分化に関わる因子の同定し、これを制御する仕組みを検討する事で卵巣癌の治療戦略のひとつになりうる。さらにマCAのヒト卵巣癌細胞株に対する毒性を検討することで、マクロファージの分化抑制と細胞毒性によって、さらなる播種進展を抑制することが期待される。

3. 研究の方法

卵巣癌腹水の免疫染色を行い、腹水中のマクロファージの活性化を分析した。その腹水上清がマクロファージの分化やヒト卵巣癌細胞株(SKOV3)の増殖能に与える影響について検証した。さらに、マクロファージとSKOV3の細胞間相互作用について免疫細胞化学的

に解析した。

ヒト卵巣癌細胞株(SKOV3、RMG-I、ES-2)に対する corosolic acid、抗癌剤(paclitaxel、cisplatin、doxorubicin)、また、これらの抗癌剤と corosolic acid を併用投与した3群間の細胞毒性を比較検討した。さらに、corosolic acidを添加後のヒト卵巣癌細胞株の細胞内シグナルを免疫染色とWestern blotで解析した。

4. 研究成果

(1) 進行卵巣癌腹水中のマクロファージはM2へ分化している。

汎マクロファージのマーカーとして抗CD68抗体、M2マクロファージのマーカーとして抗CD163抗体を用いて(11, 12, 14, 20-22)、卵巣癌腹水のサイトスピン標本の免疫細胞化学染色を施行し、腹水中のマクロファージの分化について検討した。CD68陽性細胞と同様にCD163陽性細胞が確認され、腹水中マクロファージの56-90%はCD68とともにCD163に陽性となったことから、その多くはM2マクロファージであることが示唆された。

臨床進行期によって、CD68陽性細胞あるいはCD163陽性細胞の細胞濃度に優位な差はみられなかったが、進行卵巣癌腹水中で高い傾向にあった。

(2) 卵巣癌腹水は癌細胞の増殖を促進する生理活性物質を含んでいる。

卵巣癌腹水が卵巣癌細胞株SKOV3の増殖能に与える影響を検討するために、SKOV3の培養液に20%濃度で腹水を添加し、5日間培養した後に細胞増殖能をみた。進行卵巣癌腹水は良性の腹水やI期の卵巣癌腹水に比較して、有にSKOV3の増殖能を促進した。これらの結果から卵巣癌腹水中には癌細胞の増殖因子が含まれていることが示唆された。

(3) 進行卵巣癌の腹水はIL-6、IL-10、GRO-

α、VEGFが高濃度である。

サイトカインアレイを用いて卵巣癌腹水中のサイトカインを調べた結果、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、M-CSF、MCP-1、VEGF、GRO-αの存在が確認された。次に、これらのサイトカインのELISAキットをそれぞれ用いて解析したところ、進行卵巣癌腹水中に高濃度に検出されたものはIL-6、IL-10、GRO-α、VEGFであった。

これらのサイトカインの中で、M2マクロファージがIL-10を産生することは既知の事実である。そこで、IL-6の産生細胞を確認するために、IL-6とM2マクロファージの抗体であるCD163を用いて、腹水細胞の二重免疫細胞化学染色を行ったところ、IL-6は癌細胞のみならず、M2マクロファージとも二重陽性像が認められた。このことから、M2マクロファージはIL-10に加えIL-6も産生していることが確認された。

IL-6とIL-10によるSKOV3の増殖活性は、IL-6あるいはIL-10に対する中和抗体の単独添加では抑制されなかったが、両者の同時投与によって有意に増殖活性が抑制された。これらの結果から、IL-6とIL-10が腫増殖に重要な役割を果たしていることが示された。

(4) 卵巣癌腹水はStat3の活性化を介してマクロファージをM2へ分化させる。

M2マクロファージの指標として、IL-10の産生や転写因子Stat3の活性化が知られている。腹水がマクロファージの分化に及ぼす影響を検討するために、ヒト単球系細胞株THP-1を腹水存在下で培養し、IL-10の産生能をELISA、Stat3のリン酸化を免疫細胞化学染色で解析した。その結果、良性と卵巣癌I期の腹水よりも、卵巣癌III+IV期の腹水存在下で培養したマクロファージによるIL-10の産生が高濃度であった。

Stat3のリン酸化に関しては、良性の腹水で

は THP-1 の Stat3 のリン酸化が確認されなかったのに対して、卵巣癌腹水では THP-1 の Stat3 が顕著にリン酸化された。これらの結果から、卵巣癌腹水は Stat3 をリン酸化することで、マクロファージを M2 へ分化させることが示唆された。

(5) 癌細胞はマクロファージとの細胞間相互作用によって活性化される。

卵巣癌腹水中には多くの癌細胞や M2 マクロファージが共存している。また、M2 マクロファージと腫瘍細胞の細胞間相互作用は腫瘍周囲の微小環境形成において重要な役割を担っていると考えられている (23-25)。そこで、卵巣癌細胞と M2 マクロファージの細胞間相互作用を明らかにするため、共培養システムを用いて評価を行った。まず、ヒト末梢血から単離した単球を M-CSF あるいは GM-CSF で前処理し、それぞれ M1 マクロファージおよび M2 マクロファージに分化させ、SKOV3 を加えて共培養を行った。共培養の 5 日目に、cell scraper で細胞を剥離し、パラフィンで包埋したセルブロックから作製した標本を二重免疫細胞化学染色で解析した。混在した異種の細胞の細胞間相互作用をそれぞれの細胞に関して評価することは困難であるが、セルブロックからパラフィン切片を作成し、細胞に特異的な抗体を用いた二重免疫細胞化学を行うことで、この問題は解決された。

マクロファージの単培養では Stat3 の活性化はみられず、SKOV3 の単培養では一部に Stat3 の活性化がみられるのみであった。これに対して、マクロファージと SKOV3 の共培養では両細胞において、有意に Stat3 の活性化が認められた。さらに、M1 マクロファージよりも M2 マクロファージと SKOV3 を共培養した時に、Stat3 のリン酸化が顕著に確認された。

さらに、細胞周期関連蛋白 Cyclin D1 の発現も、SKOV3 の単培養よりもマクロファージ、特に M2 マクロファージとの共培養によって強く誘導された。

次に、直接的な細胞接着の両細胞の Stat3 活性化における必要性を検討するために、トランスウェルを用いて分離培養し、それぞれの細胞の Stat3 の活性化を比較した。ウェスタンブロッティングの結果から、分離培養しても、両細胞が同じ環境に共存することで、両細胞の Stat3 が活性化されることが示された。この結果から、マクロファージと SKOV3 の両細胞の Stat3 活性化には液性因子が関与していることが明らかになった。

(6) Stat3 をノックダウンしたマクロファージは癌細胞の増殖を抑制する。

マクロファージと SKOV3 の細胞間相互作用における Stat3 の関与を検討するために、siRNA で Stat3 をノックダウンしたマクロファージと SKOV3 を共培養し、SKOV3 の Stat3 活性化を比較した。まず、ウェスタンブロッティングでマクロファージの Stat3 が siRNA によって抑制されることを確認した上で、実験を行った。

その結果、Stat3 をノックダウンしたマクロファージと共培養した SKOV3 の Stat3 は、コントロールに比較して有意に Stat3 活性化が抑制された。Cyclin D1 においても同様の結果であった。

IL-6 および IL-10 の産生と Stat3 の活性化との間には密接な関連があることから (26)、それらの中和抗体を用いて、マクロファージと共培養した SKOV3 における Stat3 活性化への影響を検討した。IL-6 と IL-10 のそれぞれの中和抗体を単独で培養液に添加しても、SKOV3 の Stat3 の活性化には影響しなかったが、両者を加えることで SKOV3 の Stat3 活性化が有意に抑制された。

さらに、siRNA で Stat3 をノックダウンしたマクロファージの IL-6 と IL-10 の産生能をリアルタイム RT-PCR 法にて比較検討した。マクロファージにおける Stat3 の不活化は CD163 の発現低下と同様に、IL-6 と IL-10 の産生を抑制することが示された。以上より、IL-6 や IL-10 を含めた様々な因子を介して、マクロファージと SKOV3 の細胞間相互作用に Stat3 の活性化が関連すると考えられた。

(7) Stat3 の不活化は SKOV3 の増殖を抑制する。

癌細胞における Stat3 の活性化は細胞増殖および血管新生促進、免疫抑制、抗癌化学療法に対する耐性に関与するが、卵巣癌においても Stat3 の活性化と予後の低下が関連することが報告されている (27)。そこで、SKOV3 を用いて、Stat3 の不活化が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。まず、ウェスタンブロッティングにおいて、siRNA で Stat3 の抑制を確認した。さらに、Stat3 と増殖能の関連性について検討したところ siRNA で Stat3 を抑制した SKOV3 の細胞増殖は有意に抑制された。

(8) マクロファージの分化を抑制する Corosolic acid はヒト卵巣がん細胞株に対する細胞毒性を有する。

ヒト卵巣癌細胞株 (SKOV3、RMG-I、ES-2) に対する corosolic acid、抗癌剤 (paclitaxel、cisplatin、doxorubicin)、また、これらの抗癌剤と corosolic acid を併用投与した 3 群間の細胞毒性を比較検討した。さらに、corosolic acid を添加後のヒト卵巣癌細胞株の細胞内シグナルを免疫染色と Western blot で解析した。

Corosolic acid をヒト卵巣癌細胞株の培養液に添加すると、30 μ M より濃度依存性に 40-80% の細胞増殖抑制がみられ、50-60% の細胞死を誘導した ($P < 0.05$)。10 μ M の各々の抗癌剤のみを添加した培養液に比較して、10 μ

M の抗癌剤と 20 μ M の corosolic acid を同時に添加した培養液で、培養した卵巣癌細胞の細胞増殖がいずれも 60-80% 抑制された

($P < 0.01$)。また、corosolic acid はヒト卵巣癌細胞株の STAT3 のリン酸化を抑制することが確認された。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation

Kiyomi Takaishi^{1,2}, Yoshihiro Komohara¹, Hironori Tashiro², Hideyuki Ohtake², Takenobu Nakagawa¹, Hidetaka Katabuchi², and Motohiro Takeya¹

Cancer Sci (査読有) 101: 2128-2136, 2010

② 田代浩徳、高石清美、片瀧秀隆

産婦人科疾患と血管新生関連因子 (3) 婦人科癌

HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY (査読無) 17: 281-286, 2010

③ Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors.

Kyoko Kawamura^{1,2}, Yoshihiro Komohara¹, Kiyomi Takaishi^{1,2}, Hidetaka Katabuchi², Motohiro Takeya¹

Pathol Int (査読有) 59: 300-305, 2009

[学会発表] (計 7 件)

① 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2011 年 4 月 15-17 日 大阪市国際会議場)

「バナバ茶の成分 Corosolic acid は卵巣癌細胞の増殖を抑制する」

高石清美 田代浩徳 伊藤史子 宮原 陽坂口 勲 片瀧秀隆

② 第 42 回日本臨床分子形態学会 (2010 年 9 月 24-25 日 静岡県三島市 東レ総合研修センター)

ワークショップ「疾患とマクロファージ」

「卵巣癌における腹水中マクロファージと癌細胞の細胞間相互作用」

高石清美^{1,2} 菰原義弘² 田代浩徳¹ 大場隆¹ 竹屋元裕² 片瀨秀隆¹
熊本大学大学院生命科学研究所 産科婦人科学分野¹ 細胞病理学分野²

③第 48 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (2010 年 7 月 8-10 日 つくば市 つくば国際会議場)

「上皮性卵巣腫瘍組織における M2 マクロファージの局在」

高石清美^{1,2} 菰原義弘² 河村京子¹ 田代浩徳¹ 竹屋元裕² 片瀨秀隆¹

¹熊本大学大学院生命科学研究所 産科学・婦人科学分野

²同 細胞病理学分野

④第 18 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (2010 年 5 月 20-21 日 熊本市 くまもと県民交流会館パレア)

「Involvement of M2 macrophages in the ascites of advanced epithelial ovarian cancer in tumor progression via Stat3 activation」

Kiyomi Takaiishi^{1, 2}, Yoshihiro Komohara¹, Hironori Tashiro², Hidetaka Katabuchi², and Motohiro Takeya¹

¹Department of Cell Pathology and

²Department of Gynecology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

⑤第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2010 年 4 月 23-25 日 東京国際フォーラム)

「進行卵巣癌腹水中の M2 マクロファージは転写因子 STAT3 を介して卵巣癌細胞を増殖させる」

高石清美 田代浩徳 大竹秀幸 片瀨秀隆

⑥The 2010 Annual Meeting of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology - the International Young Doctors Session - (2010 年 3 月 13-14 日 台中 台湾 Windsor Hotel)

[The effect of macrophage on cancer cell in ascitic fluid of advanced epithelial ovarian cancers]

Kiyomi Takaiishi, Hironori Tashiro, Hideyuki Ohtake, Takashi Ohba, and Hidetaka Katabuchi

Departments of Reproductive Medicine and Surgery, and Gynecology, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

⑦第 24 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (2009 年 11 月 27-28 日 東京 京王プラザホテル)

「進行卵巣癌の腹腔マクロファージと癌細胞の細胞相互作用」

熊本大学大学院医学薬学研究部産科学婦人科学分野

高石清美 田代浩徳 大竹秀幸 大場隆 片瀨秀隆

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 浩徳 (TASHIRO HIRONORI)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：70304996

(H22~H23)

大竹 秀幸 (OHTAKE HIDEYUKI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60336237

(H21)

(2) 研究分担者

片瀨 秀隆 (KATABUCHI HIDETAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：90224451

高石 清美 (TAKAISHI KIYOMI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00601303

(3) 連携研究者

()

研究者番号