

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430117

研究課題名(和文) 腫瘍細胞死に伴い集積する腫瘍随伴マクロファージの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tumor-associated macrophages accumulating in dead tumor cells

研究代表者

西躰 元 (NISHITAI, GEN)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：60509941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍は免疫系からの攻撃を免れているが、その免疫抑制状態の維持に、腫瘍に随伴するマクロファージが関与していることが近年報告されている。我々は、腫瘍細胞死誘導時にCD204を高発現するマクロファージが、腫瘍へ集積することを見出した。次にこのマクロファージの腫瘍再増殖への関与を検討するため、CD204陽性マクロファージを特異的に消去できるノックインマウスを作製し、癌放射線治療後の腫瘍の再増殖の様子を調べた。その結果、CD204陽性マクロファージ非存在下では腫瘍の再増殖が抑制されることを見出した。以上より、CD204陽性マクロファージが腫瘍の再増殖を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant tumors arise even in an immunocompetent host by maneuvering immune recognition. Accumulating evidence has suggested that tumor-associated macrophages play a key role in tumor growth. In the previous study, we revealed that CD204-positive macrophages were infiltrated to tumors in response to tumor cell death. To reveal the involvement of CD204-positive macrophages in tumor regrowth, we generated mice that contain human diphtheria toxin receptor (DTR) under the control of CD204 promoter. When CD204-positive macrophages were depleted by DT administration, tumor regrowth followed by X-ray irradiation was significantly suppressed. These results suggest that CD204-positive macrophages assist tumor regrowth.

研究分野：総合生物

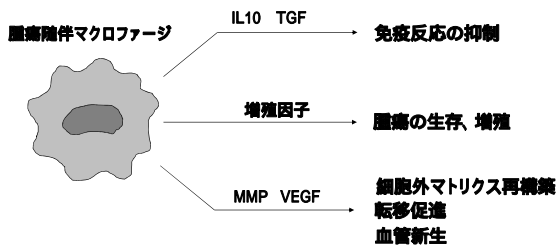
キーワード：マクロファージ 遺伝子組換えマウス 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍に対する免疫抑制

癌細胞は正常細胞由来であるが、その悪性化の過程で、癌抗原の異常発現などの正常細胞とは異なる性質を獲得する。そのため多くの場合、「異常な自己」として免疫系に認識され、排除される。その一方で、悪性腫瘍は免疫系からの攻撃を免れており、これが癌化学療法や癌免疫細胞療法の効果を限定している一因であると考えられる。この悪性腫瘍に対する免疫抑制メカニズムの一つとして、腫瘍組織に浸潤し、腫瘍組織全体の 5-10% の割合を占めるマクロファージの関与が近年提唱されている (図 1)。しかしながら宿主

図1 腫瘍の増殖を助ける腫瘍随伴マクロファージ



由来のマクロファージが、なぜ腫瘍に集積し、異物であるはずの腫瘍の増殖を逆に助ける性質を持つに至るのかは全くわかっていない。

(2) マクロファージの死細胞貪食による免疫抑制誘導

研究代表者の所属する免疫制御学研究室は、これまでにマクロファージが死細胞を選択的に認識し貪食する分子機構について研究を行ってきた。詳細な解析の結果、マクロファージが自己の死細胞貪食を介して、免疫抑制性のサイトカインを産生すること、マクロファージによる自己死細胞の貪食によって、自己抗原特異的 T 細胞に deletion あるいは anergy が誘導されることを明らかにした (Science 2004; 304: 1147-50、J. Exp. Med. 2004; 200: 459-67、J. Clin. Invest. 2007; 117: 2268-78、J. Immunol. 2009; 182: 4127-36)。これらの知見は、マクロファージが死細胞を貪食することにより、強力な免疫抑制状態を誘導することを意味している。

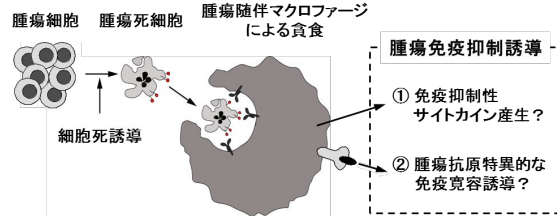
(3) 本研究に至る研究背景

マクロファージによる死細胞貪食が、免疫抑制状態を誘導すること。

腫瘍が無秩序に増殖する過程において、一部の腫瘍細胞が栄養枯渇や酸欠などにより細胞死を起こしていること。

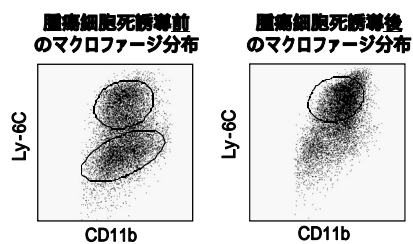
以上の2点を基に、腫瘍のマクロファージが腫瘍死細胞を貪食し、免疫抑制性サイトカインの産生や、腫瘍抗原特異的な免疫寛容誘導などを介して、腫瘍に対する免疫抑制状態を誘導する可能性を考えた (図 2)。この可能性を検証するため、我々は *in vivo* において腫瘍細胞死に伴う、腫瘍随伴マクロファ

図2 腫瘍細胞死に伴う腫瘍免疫抑制誘導仮説



ジの変化を検討した。そのために、*in vivo* において腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系を構築し (詳細は研究方法に記載)、腫瘍細胞死誘導前後の腫瘍随伴マクロファージを単離した。その結果、腫瘍細胞死誘導に伴い Ly-6C 強陽性のマクロファージの著しい集積を認めた (図 3)。さらに Ly-6C 強陽

図3 腫瘍細胞死に伴う腫瘍随伴マクロファージの変化



性マクロファージの性質を調べるため、この細胞をセルソーティングにより単離し、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を調べた。その結果免疫抑制性マクロファージのマーカー遺伝子として知られる Ym1 および CD204 遺伝子の高発現を認めた。これらの結果から、腫瘍細胞死に伴い、腫瘍へ免疫抑制性マクロファージが集積することが示唆された。次にこのマクロファージの腫瘍増殖における役割を明らかにするため、Ym1 あるいは CD204 を発現するマクロファージを特異的に消失させることができるノックインマウス (Ym1-DTR、CD204-DTR) の作製を行った。サザンブロットおよび long PCR 法により、ノックインマウスが作製できたことを確認した (図 4、5)。

図4 Ym1-DTRノックインマウス作製

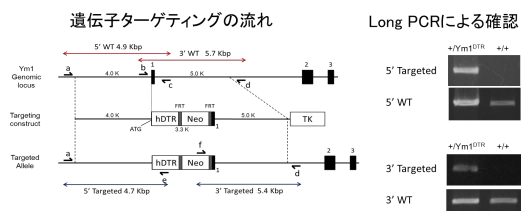
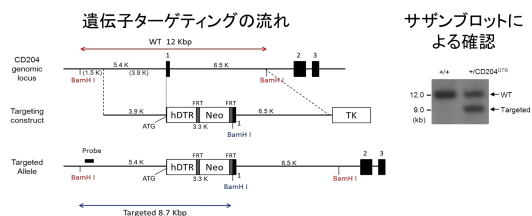


図5 CD204-DTRノックインマウス作製



## 2. 研究の目的

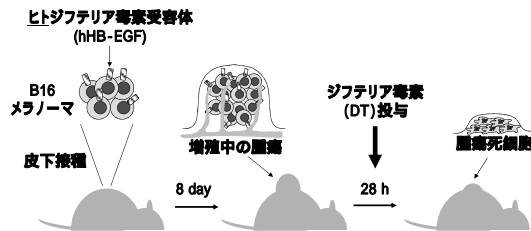
以上の結果を基に、本研究においてまず、(1)マクロファージが消失した状況における腫瘍の増殖、転移、あるいは腫瘍細胞死誘導後の再増殖への影響を調べる。(2)集積したマクロファージによる腫瘍死細胞処理を阻害するモノクローナル抗体を作製する。(3)マクロファージの消失が腫瘍増殖に与える影響が食食阻害抗体投与によっても見られるかを調べることで、マクロファージによる腫瘍死細胞食食から腫瘍増殖へと至る分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

・*In vivo* において腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系の確立

ジフテリア毒素 (DT) はヒトの HB-EGF (hHB-EGF) に特異的に結合して細胞死を誘導する一方で、マウス HB-EGF には結合しない。この性質を利用して、まず hHB-EGF を恒常的に発現させたマウス腫瘍細胞株 B16 メラノーマ (B16-DTR) を作製した。次にこの細胞株をマウスに接種して腫瘍を作らせた後、DT を投与することで、マウスの免疫細胞に傷害を与えることなく、腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系を確立した(図1)。次にこ

図1 *In Vivo*で腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導できる系



の系を応用し、hHB-EGF を Ym1、CD204 各プロモーターの下流に挿入したノックインマウスを作製することで、これらの遺伝子を発現するマクロファージを特異的に消失させることが可能なマウスを作製した。これらのマウスを用いて、以下の項目を検討した。

(1) Ym1-DTR および CD204-DTR マウスにおけるマクロファージ消失の確認

作製した各マウスにおいて、腫瘍に集積するマクロファージの消失が見られるかどうかを検討した。そのために、各マウスに B16-DTR を接種して腫瘍を形成させた後、腹腔あるいは尾静脈に DT を投与することにより腫瘍に集積するマクロファージが消失するかどうかを、フローサイトメトリー法により検討した。

(2) 各ノックインマウスにおけるマクロファージ消失の腫瘍再増殖に与える影響の検討

腫瘍随伴マクロファージ消失が腫瘍再増殖に与える影響を検討するため、癌放射線治

療モデルを用いた。マウスに B16 を接種して腫瘍形成後、鉛の遮蔽材を用いて腫瘍以外の部分を覆い X 線を照射することで、腫瘍細胞限定的に細胞死を誘導した。その後、腫瘍随伴マクロファージの有無によって X 線照射後の腫瘍の再増殖に影響が見られるかどうかを検討した。

(3) 腫瘍随伴マクロファージによる腫瘍再増殖促進分子メカニズムの解明

放射線治療時に集積するマクロファージおよび腫瘍常在のマクロファージをセルソーターにより単離し、マイクロアレイおよび定量 PCR により網羅的に遺伝子発現を調べた。

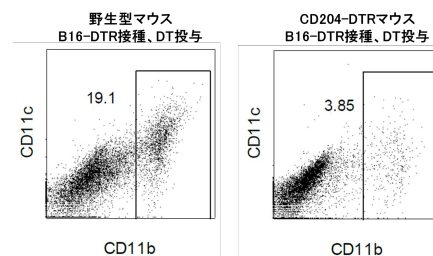
同時に、CD204 陽性マクロファージに高発現している遺伝子が、腫瘍の再増殖に必要なかを明らかにするため、CD204 陽性マクロファージに発現する遺伝子を特異的にノックアウトできるマウス (CD204-iCre マウス) を作製した。

## 4. 研究成果

(1) CD204-DTR および Ym1-DTR マウスにおけるマクロファージ消失の確認

CD204-DTR マウスに B16-DTR を接種して腫瘍を形成後、DT を投与することで腫瘍細胞死を誘導すると、集積するマクロファージの消失が見られた(図2)。一方、Ym1-DTR マウス

図2 CD204-DTRマウスにおける腫瘍随伴マクロファージの消失

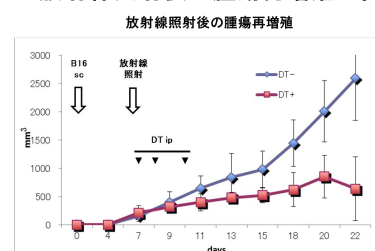


ではマクロファージの消失が見られなかった。よって以降は CD204-DTR マウスのみを用いて検討を行った。

(2) CD204-DTR マウスにおけるマクロファージ消失の腫瘍再増殖に与える影響の検討

マクロファージの腫瘍増殖への影響を調べるため、皮下腫瘍を形成させた CD204-DTR マウスにおいて放射線治療後、持続的に DT を投与し腫瘍の再増殖を調べた。その結果、DT を投与したマウスにおいて腫瘍再増殖の抑制が見られた(図3)。以上のことから、

図3 B16担癌CD204-DTRマウスにおける放射線照射後の腫瘍再増殖の抑制



腫瘍細胞死によって集積する CD204 陽性マクロファージが腫瘍の再増殖を促進している可能性が示唆された。

### (3) 腫瘍随伴マクロファージによる腫瘍再増殖促進分子メカニズムの解明

マクロファージが腫瘍の再増殖を促進する分子メカニズムを解明するため、放射線治療時に集積するマクロファージおよび腫瘍常在のマクロファージをセルソーターにより単離し、マイクロアレイおよび定量 PCR により網羅的に遺伝子発現を調べた。その結果、I 型インターフェロンおよびその応答遺伝子が、集積するマクロファージ特異的に高発現していることを見出した。同時に、CD204 陽性マクロファージから産生されるこれらの遺伝子が腫瘍の再増殖に必須であることを明らかにするため、CD204-iCre マウスを作製した。上記遺伝子に対する flox マウスを入手し、CD204-iCre マウスと掛け合わせることで CD204 陽性マクロファージのみ遺伝子が欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作製する。このマウスに対して癌放射線治療モデルを適用することで、CD204 陽性マクロファージが腫瘍再増殖を促進する上で必須の分子を明らかにできると考えられる。

## 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2件)

Masato T, Nishitai G. “Immune Regulation by Dead Cell Clearance.” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*:1-13 2015 査読有 DOI:10.1007/82\_2015\_472

西躰 元、田中 正人、「死細胞貪食マクロファージ」*臨床免疫・アレルギー科* **63**(5):431-435 2015 査読無 <http://www.kahyo.com/item/M201505-635>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西躰 元 (NISHITAI GEN)

東京薬科大学・生命科学部・免疫制御学研究室・助教

研究者番号：60509941

### (2) 連携研究者

田中 正人 (TANAKA MASATO)

東京薬科大学・生命科学部・免疫制御学研究室・教授

研究者番号：00294059