

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460418

研究課題名(和文)腫瘍関連M2マクロファージを基軸とした食道扁平上皮癌微小環境の解析

研究課題名(英文) Analysis of the microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma from the viewpoint of tumor associated M2 macrophages

研究代表者

横崎 宏 (Yokozaki, Hiroshi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：10200891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌における腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の役割を解析するため、末梢血単球由来マクロファージに食道癌細胞培養上清を作用させた時に発現誘導される遺伝子をマイクロアレイ法により抽出した。NCAMはFGFR1と会合してFGF2シグナルを制御し、TAMの生存、運動を促進した。CXCL8は受容体CXCR1およびCXCR2を介して癌細胞の運動能、浸潤能を亢進した。TAM様マクロファージとの共培養により不死化正常食道扁平上皮細胞Het-1Aに発現誘導されるCSF3はHet-1Aの運動能の亢進およびGSK3 / と -cateninのリン酸化を誘導し、発癌初期段階に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the roles of the tumor associated macrophages (TAMs) in the esophageal squamous cell carcinomas (ESCCs), up-regulated genes in the TAM-like cells through the differentiation of macrophages derived from peripheral blood monocytes by the treatment of conditioned media of ESCC cells were extracted by cDNA microarray analysis. An adhesion molecule NCAM modulated the FGF2 signaling and promoted survival and motility of TAM-like cells by associating with FGFR1. A chemokine CXCL8 induced the migration and invasion of ESCC cells through binding with its receptors CXCR1 and/or CXCR2. CSF3 was up-regulated in the immortalized esophageal squamous epithelial cell Het-1A when co-cultured with TAM-like cells. Recombinant CSF3 promoted the migration of Het-1A and induced the phosphorylation of GSK3 / and -catenin suggesting the contribution in the early stage of the esophageal carcinogenesis.

研究分野：人体病理学

キーワード：病理学 癌 食道 マクロファージ 癌・間質相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 食道扁平上皮癌は難治癌の一つであり、予防ならびに早期発見、早期治療が最も重要な臨床的課題である。病理組織学的には、初期病変である上皮内腫瘍の段階から血管新生・誘導を特徴とする間質変化が生じ、臨床的に狭帯域光観察内視鏡により上皮乳頭内血管の形態異常としてとらえられ、早期診断に役立っている。しかるに、このような形態変化を癌-間質相互作用の観点から解析し、分子病理発生を明らかにした研究はなかった。

(2) これまでに食道扁平上皮癌の増殖・進展におけるマクロファージ/癌細胞相互作用を臨床検体と培養系で解析し、以下の研究成果を論文発表した。1) 癌組織に浸潤するマクロファージ数は癌組織微小血管密度と相関する。2) CD204 陽性マクロファージ数は壁深達度、脈管侵襲、リンパ節転移、臨床病期と相関する。3) CD204 陽性マクロファージ密度の高い症例は低い症例より無病生存率が有意に低い。4) 食道扁平上皮癌由来細胞株培養上清は TPA 刺激 THP-1 単球性白血病細胞の CD204 発現のみならず血管新生因子 (VEGFA, CXCL8, FGF2) 発現を誘導する。これは食道扁平上皮癌微小環境が浸潤マクロファージを CD204 陽性 M2 分化させるとともに血管新生を促進し、悪性度を高める可能性を示唆した。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究計画では、研究期間内に以下の4点を明らかにすることにより、マクロファージ/癌細胞相互作用の観点から食道扁平上皮癌の分子病理発生論を構築するとともに、早期上皮内病変の正確な診断に役立つ知見を得ることを目的とした。1) 食道癌培養株上清により M2 分化したマクロファージにおいて特異的に発現変化する分子の役割ならびにそれらを調節する因子を解析する。2) 食道扁平上皮癌細胞や食道扁平上皮由来細胞と M2 マクロファージの共培養実験により、両者の細胞生物学的相互作用の分子基盤を明らかにする。3) 1) 2) で抽出されたマクロファージ/癌細胞相互作用関連分子の腫瘍性・非腫瘍性食道組織における局在、発現様式を検証する。4) これらの知見を基に、上皮内腫瘍形成における M2 マクロファージの役割を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究計画は、食道扁平上皮癌の発生・増殖・進展におけるマクロファージ/癌細胞相互作用を培養モデル系で解析し、分子病態を明らかにするとともに、臨床検体を用いた検証を通して早期病変の正確な病理組織診断に応用することを目的とし、以下の3つの研究を平行して行う。

(2) 食道扁平上皮癌細胞株培養上清により

M2 分化したマクロファージに特異的に発現変化する分子の解析：

TPA 処理 THP-1 単球性白血病細胞は食道扁平上皮癌培養細胞上清を 48 時間作用させることにより CD204 および血管新生因子発現が誘導されることを明らかにし、マイクロアレイ解析により CD204 発現誘導 M2 様分化 THP-1 で発現上昇の見られたものの内、細胞の運動、増殖、生存に重要と見なされる候補遺伝子のマクロファージ/癌細胞相互作用における役割を解析する。

健康人末梢血単球をマクロファージに分化させ食道扁平上皮癌細胞上清により M2 形質を獲得させる実験系を既に構築しており、この系において上記候補遺伝子の変化を検証するとともに、マイクロアレイ解析により新規候補遺伝子の抽出を試みる。

食道扁平上皮癌細胞株培養上清に含まれる M2 分化誘導因子を明らかにするためサイトカインアレイを実施する。

(3) 食道扁平上皮癌細胞や食道扁平上皮由来細胞と M2 マクロファージの細胞生物学的相互作用の解析：

食道扁平上皮癌培養上清による M2 形質獲得実験系を確立しているが、実際の組織中で見られる癌細胞とマクロファージ相互作用の意義を共培養実験により検証する。

(4) 上皮内腫瘍形成における M2 マクロファージの役割の解明と病理診断への応用：

アレイ解析で抽出された癌細胞/マクロファージ相互作用で発現変化する遺伝子産物の進行食道癌ならびに食道上皮内腫瘍における発現を免疫組織化学的に解析し、食道上皮内腫瘍の特徴的形態学的構築である上皮細胞増殖と異型血管形成に主たる役割を演ずる因子群を特定する。

### 4. 研究成果

(1) 末梢血単球由来マクロファージの腫瘍随伴マクロファージ (TAM) 様分化過程における形態学的変化の解析：健康ヒト末梢血より分離した単球で、M-CSF 存在下で培養しマクロファージモデルを得た。そこに食道癌細胞株培養上清を添加して培養し、TAM モデルを得た。汎マクロファージマーカー CD68 を陽性コントロールとし、M2 型マクロファージマーカー CD163 と CD204 の蛍光免疫染色を施行した。サンプルのデジタル写真を撮影し、細胞長を手動的に計測するとともに、蛍光免疫染色画像からソフトウェアで個々の細胞の核と細胞質を検出し、細胞形態や蛍光強度を計測し以下の結果を得た。1) 末梢血単球由来マクロファージの仮足を含めた平均細胞長は M-CSF を添加した時点で増加し、さらに IL-4 または TE 細胞株培養上清の添加で増加した。2) 上清添加後の TAM モデル細胞は上清添加前と比して CD163 と CD204 の平均蛍光強度が増加した。

個々の細胞の CD163 と CD204 の陽性率も上清添加後に上昇傾向となった。3) 個々の TAM モデル細胞の細胞質面積と CD163 蛍光強度はほぼ無相関ないしごく弱い～弱い正の相関を認めた ( $r = 0.002-0.227$ )。CD204 では弱い～中等度の正の相関を認めた ( $r = 0.241-0.565$ )。4) 末梢血単球に M-CSF を添加すると、細胞質長径は短径と比して有意に増加し、細胞質の伸長が示された。上清添加後の TAM モデルでは細胞質面積は有意に増加し、細胞質長径、短径も増加した。核の長径、短径、面積は上清添加後に有意に増加した。5) 細胞質縦横比の平均値は末梢血単球に M-CSF を添加すると約 0.5 まで低下し、上清添加後に約 0.6 まで緩やかに回復した。核胞体比は長径比、面積比ともに分化の各段階で有意に低下した。

(2) 食道扁平上皮癌微小環境における NCAM/FGF2 を介した FGFR1 シグナルによる TAM および癌細胞の生存・遊走の制御：TAM 様分化細胞に発現誘導される接着因子 NCAM の食道扁平上皮癌微小環境における役割を解析し以下の結果を得た。1) TAM 様細胞において NCAM は葉状仮足の箇所ではファロイジンと共局在し、細胞運動能に与える可能性が示唆され、TAM 様細胞への分化により PI3K-Akt を介した遊走・生存が有意に促進した。2) リン酸化チロシンキナーゼ抗体アレイによる解析により、NCAM をノックダウンした TAM 様細胞において PI3K-Akt-p70S6K のリン酸化減弱を伴う有意な生存・遊走の低下が認められた。3) TAM 様細胞では NCAM と FGFR1 が共局在し、ウエスタンブロット解析では、TAM 様細胞の NCAM 発現をノックダウンすることで FGFR1 のリン酸化が減弱した。興味深いことに、マクロファージ様細胞から TAM 様細胞への分化によっても FGFR1 の発現およびリン酸化が亢進した。さらに TAM 様細胞に FGF2 を作用させると FGFR1、Akt、Erk が活性化し、FGFR 阻害剤 SU5402 処理によりそれらのシグナルは有意に抑制された。FGF2 刺激で細胞生存・遊走が促進され、それらは SU5402 により有意に抑制された。4) FGF2 を食道扁平上皮癌細胞 TE-9 に作用させると、主として Erk の活性化を介して生存・遊走が促進された。食道扁平上皮癌切除標本 70 例について FGF2 の免疫組織化学的発現強度による臨床病理学的解析を行うと、腫瘍間質における FGF2 陽性細胞の浸潤数は進行した深達度、脈管侵襲、臨床病期と有意な相関が得られるとともに、CD163 あるいは CD204 陽性マクロファージ浸潤数とも有意に相関した。

(3) 食道扁平上皮癌微小環境に誘導される CXCL8 による癌細胞の運動、浸潤能制御：TAM 様分化細胞に発現誘導されるケモカイン CXCL8 の食道扁平上皮癌微小環境におけ

る役割を解析し以下の結果を得た。

1) マクロファージ様細胞と比較して TAM 様細胞では CXCL8 の発現が亢進しており、食道扁平上皮癌細胞はその受容体である CXCR1 および CXCR2 を発現していることを確認した。CXCL8 は TAM 様細胞および一部の食道扁平上皮癌細胞から分泌されていた。2) 食道扁平上皮癌細胞に CXCL8 を作用させると Akt および Erk シグナルの活性化とともに癌細胞の運動能、浸潤能が促進されたが、増殖や生存には影響を認めなかった。3) これら CXCL8 の癌細胞に対する作用は、Akt あるいは Erk シグナル経路の阻害剤添加や CXCR1/CXCR2 ノックダウンにより抑制された。4) 食道扁平上皮癌培養株 TE-8 の TAM 様細胞との共培養による運動能および浸潤能促進は、CXCR1、CXCR2 あるいは CXCL8 の中和抗体添加により阻害された。5) 外科的に切除された 70 例の食道扁平上皮癌組織における CXCL8 の発現を同一症例非癌部食道上皮と比較して陰性、低発現、高発現群に分類すると、CXCL8 高発現は進行した所属リンパ節転移と無病生存率と有意に相関した。

(4) マクロファージと食道扁平上皮細胞との相互作用による CSF3/G-CSF 経路の促進：正常扁平上皮細胞株 Het-1A と試験管内でマクロファージ様に分化させたヒト単球性白血球細胞株 THP-1 との間接共培養系を確立し、単独培養の Het-1A とマクロファージ様細胞と共培養した Het-1A との間で cDNA マイクロアレイ解析を施行し、後者において発現上昇していた遺伝子として colony-stimulating factor 3 (CSF3) を見出した。CSF3 は G-CSF と呼ばれ、受容体として G-CSF 受容体が知られている。共培養後の Het-1A では CSF3/G-CSF の発現が亢進していることを確認した。Het-1A は G-CSF 受容体を発現し、リコンビナント CSF3/G-CSF の添加により、運動能の亢進および GSK-3 /  $\beta$ -catenin のリン酸化が確認された。以上から、マクロファージと食道上皮細胞との相互作用による CSF3/G-CSF の発現・分泌亢進が発癌初期段階に与える可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Shigeoka M, Urakawa N, Nishio M, Takase N, Utsunomiya S, Akiyama H, Kakeji Y, Komori T, Koma Y, Yokozaki H: Cyr61 promotes CD204 expression and the migration of macrophages via MEK/ERK pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 査読有, 4 巻, 2015, 437-446  
DOI: 10.1002/cam4.401  
Urakawa N, Utsunomiya S, Nishio M, Shigeoka M, Takase N, Arai N, Kakeji Y,

Koma Y, Yokozaki H: GDF15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways. Lab Invest. 査読有, 95 巻, 2015, 491-503

DOI: 10.1038/labinvest.2015.36

Nishio M, Urakawa N, Shigeoka M, Takase N, Ichihara Y, Arai N, Koma Y, Yokozaki H: Software-assisted morphometric and phenotype analyses of human peripheral blood monocyte-derived macrophages induced by a microenvironment model of human esophageal squamous cell carcinoma. Pathol Int. 査読有, 66 巻, 2016, 83-93

DOI: 10.1111/pin.12381

横崎 宏, 狛雄一郎, 重岡 学, 西尾真理: 消化管がんの進展とがん間質. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症とがん. 査読有, 5 巻, 2016, 77-81

Takase N, Koma Y, Urakawa N, Nishio M, Arai N, Akiyama H, Shigeoka M, Kakeji Y, Yokozaki H: NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells. Cancer Lett. 査読有, 380 巻, 2016, 47-58

DOI: 10.1016/j.canlet.2016.06.009

Hashimoto O, Yoshida M, Koma Y, Yanai T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nishimura N, Yokozaki H:

Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. J Pathol. 査読有, 240 巻, 2016, 211-223

DOI: 10.1002/path.4769

〔学会発表〕(計 59 件)

横崎 宏: 組織としての癌-間質との相互作用から見た消化管癌の増殖・進展および発生についての考察, 第 103 回日本病理学会総会(招待講演), 2014 年 4 月 24 日, 広島国際会議場(広島市中区)

横崎 宏, 重岡 学, 裏川 直樹, 西尾 真理, 高瀬 信尚, 宇都宮 壮顕, 市原 有美, 荒井 慎明, 狛 雄一郎: 食道扁平上皮癌の増殖, 進展と腫瘍組織内 CD204 陽性マクロファージの関連, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日, 名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)

横崎 宏, 重岡 学, 市原 有美, 裏川 直樹, 西尾 真理, 高瀬 信尚, 宇都宮 壮顕, 荒井 慎明, 秋山 寛明, 狛 雄一郎: 食道扁平上皮癌微小環境において Cyr61 はマク

ロファージの CD204 発現誘導および遊走能を亢進する, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日, 名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)

横崎 宏, 狛 雄一郎, 西尾 真理, 重岡 学, 裏川 直樹, 高瀬 信尚, 宇都宮 壮顕, 市原 有美, 荒井 慎明: 食道上皮内マクロファージ密度と上皮増殖性病変分布の相関, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 5 月 1 日, 名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)

Okito Hashimoto, Makiko Yoshida, Yu-Ichiro Koma, Tomoko Yanai, Daiichiro Hasegawa, Yoshiyuki Kosaka, Noriyuki Nishimura, Hiroshi Yokozaki: Contribution of cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages to neuroblastoma

development, 18th ECCO - 40<sup>th</sup> ESMO European Cancer Congress, 2015 年 9 月 25 日, Messe Wien Exhibition & Congress Centre (Vienna, Austria)

Yu-Ichiro Koma, Nobuhisa Takase, Noriaki Arai, Himiko Kodaira, Masayoshi Hosono, Yumi Ichihara, Mari Nishio, Manabu Shigeoka, Hiroshi Yokozaki: Infiltrating macrophages may promote early esophageal carcinogenesis via p38 MAP kinase and IL-6 signaling, 10th AACR-JCA joint Conference on Breakthrough in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016 年 2 月 18 日, Hyatt Regency Maui (Maui, HI, USA)

Nobuhisa Takase, Yu-ichiro Koma, Noriaki Arai, Himiko Kodaira, Masayoshi Hosono, Yumi Ichihara, Mari Nishio, Manabu Shigeoka, Hiroshi Yokozaki: The roles of

FGF-2-NCAM/FGFR1 interplay in esophageal squamous cell carcinomas and its microenvironment including tumor-associated macrophages. AACR Annual Meeting 2016, 2016 年 4 月 17 日, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, LA, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横崎 宏 (YOKOZAKI, Hiroshi)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 10200891