

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462015

研究課題名(和文)胃癌腹膜播種における腹腔内マクロファージの機能解析と造腫瘍性についての実験的検討

研究課題名(英文)The function of intraperitoneal macrophage and its tumorigenesis in gastric cancer with peritoneal metastasis

研究代表者

伏田 幸夫 (Fushida, Sachio)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：10301194

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)：まず、胃癌腹膜播種におけるM2マクロファージの機能解析を行ったところ、播種患者では大量のM2マクロファージが腹腔内に存在した。M2マクロファージと胃癌細胞株をヌードマウスに移植すると、胃癌細胞単独よりも有意に腫瘍サイズが増大した。

次いで、癌性腹水中に存在する1酸性糖蛋白(AGP)は全身投与されたパクリタキセルが腹水中に移行した際に結合し、その抗腫瘍効果を阻害する。エリスロマイシンはAGPと競合し、濃度依存性にパクリタキセルを再活性化させる。マウス腹膜播種モデルにおいて、パクリタキセル単独投与と比較し、エリスロマイシン併用群は有意に腫瘍増殖抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：First, we investigated whether M2 macrophages participate in the development of peritoneal carcinomatosis (PC) in gastric cancer. The number of peritoneal macrophages with the M2 phenotype was significantly higher in gastric cancer patients with PC. The coexistence of MKN45 cells with M2 macrophages resulted in cancer cell proliferation and an acceleration of tumor growth in the xenograft model.

Second, increased concentrations of 1-acid glycoprotein (AGP), an important drug-binding protein, have been reported in the plasma and ascites of cancer patients. This study sought to clarify whether AGP binds to PTX and alters its anticancer effects. AGP > 400 μg/mL significantly suppressed the cell growth inhibitory effect of PTX in vitro, but the co-administration of EM restored it. Elevated AGP concentrations were observed in the ascites of PC model mice. Administration of PTX alone did not markedly diminish PC, whereas co-administration of PTX and EM significantly reduced PC.

研究分野：胃十二指腸外科学

キーワード：胃癌 腹膜播種 腫瘍浸潤マクロファージ 線維化 1酸性糖蛋白 パクリタキセル エリスロマイシン

1. 研究開始当初の背景

胃癌腹膜播種の治療成績は1年生存率40%と極めて不良であるため、抗癌剤に対する治療抵抗性を克服するとともに腹膜播種の確立や増生にかかわる分子機構を解明し、それらを標的とした新たな治療法の確立が急務である。腹膜播種の重要な病態として腫瘍内の癌細胞は周囲に線維芽細胞やコラーゲンファイバーを誘導し、胆管や腸管および尿管の壁肥厚と内腔狭窄による閉塞性黄疸や腸閉塞、水腎症により死に至らしめる。近年、肝線維化に中心的に働く伊藤細胞が炎症細胞などから分泌されるTGF- β により活性化され細胞外マトリックス成分を増生する一方、伊藤細胞はアンジオテンシン1型(AT-1)受容体を発現しており、アンジオテンシンがTGF- β を介してコラーゲン産生を促進することが明らかとなり、われわれも腫瘍(播種巣)内で産生されるアンジオテンシンがアンジオテンシン型受容体を介して増殖・進展に関与していることを証明し、高血圧治療薬の1種であるARB(アンジオテンシン型受容体ブロッカー)による腹膜播種治療の可能性について報告した(Int J Oncol 2009)が、線維化にいたるメカニズムは十分解明されずにいた。すなわち、癌細胞から放出されるTGF- β によって腹膜中皮に細胞間隙を生じさせ基底膜に接着し浸潤することが知られているが、腹膜中皮細胞自体が播種巣の増生・線維化にどのように関与しているかは明らかでなかった。そこで我々は、in vitro および in vivo において腹膜中皮細胞がTGF- β により間葉系細胞様に変化する(epithelial-mesenchymal transition: EMT)ことや癌細胞との共培養により腫瘍の増殖能を促進し、腫瘍の線維化も誘導することを証明した(Int J Oncol 2012)。

癌の微小環境において上記以外にも免疫系の細胞、とくに腫瘍関連マクロ

ファージ(tumor-associated macrophage: TAM)の関与も重要と考えられるが、腫瘍の発生・進展に促進的なのか、抑制的なのかは、報告が相反し一定の見解は得られていなかった。これらの報告の多くは腫瘍周囲間質細胞を単にCD68マーカーで染色したものであったが、最近、マクロファージは通常型(M1)と免疫抑制型(M2)に分類され、M2マクロファージは血管新生を誘導するサイトカインや抗がん剤抵抗性に関与し、癌の進行を促進することが明らかになりつつある。すなわち、癌細胞は種々の免疫抑制性分子の産生を介して直接あるいは間接的に、宿主免疫を抑制しているが、その背景には癌で活性化しているシグナル伝達経路や免疫細胞の抑制性シグナルが重要な役割を果たしている。これらのシグナル伝達経路を標的とすることにより、新たな治療法の開発につながる可能性がある。特に腹膜播種にともなう癌性腹水中には大量のマクロファージが存在することが知られているが腹腔内マクロファージの機能解析は十分行われていない。

また、癌の進行とともに産生が亢進することが知られている α 1酸性糖タンパク(Acid glycoprotein: AGP)は、マクロファージの分泌するIL-1, IL-6の刺激によって肝で生成されるだけでなく、マクロファージ自身もAGPの1つである免疫抑制酸性蛋白(Immunosuppressive acid protein: IAP)を分泌し、腫瘍の増殖を促進することが知られている。これらAGPは塩基性薬剤と強く結合するため、AGP濃度が上昇すると植物アルカロイドであるタキサン[®]の薬効が減弱することが予想されるが、これを証明した報告はない。

2. 研究の目的

今回、腹膜播種巣や癌性腹水中に存在するマクロファージの多くがM2マクロファージ

であり、癌細胞の浸潤・増殖を促進するだけでなく、マクロファージが分泌する AGP が血中、腹水中のタキサン系抗がん剤と結合することで抗癌剤抵抗性を示すという仮説を証明することを本研究の目的とする。

すなわち、胃癌腹膜播種症例から採取した播種巣および癌性腹水中のマクロファージの分画を CD68 (M1+M2), CD204 (M2) マーカーをもちいて検討する。また、M2 マクロファージの産生するサイトカインが癌細胞の増殖・浸潤能を亢進することを磁気抗体ビーズで分離した M2 マクロファージと胃癌細胞株を共培養することによって証明する。さらに、胃癌細胞と腹膜中皮細胞混合移植によって我々が作成した線維化モデルに M2 マクロファージを追加することにより、微小環境における血管新生やリンパ管新生が促進されることを証明する。

次いで、AGP が胃癌細胞株に対するタキサンの殺細胞効果におよぼす影響を検討し、塩基性抗生物質であるエリスロマイシンによる競合阻害によってタキサンの効果が増強(回復)することを証明する。動物実験では腹膜播種モデルを作成し、腹膜播種の進行に伴い AGP 濃度が上昇することを証明し、*in vitro* と同様にタキサン単独投与に比べエリスロマイシン併用群では腫瘍量が減少し生存率が向上することを証明する。

3. 研究の方法

胃癌腹膜播種におけるマクロファージの機能解析では胃癌癌性腹膜炎患者のマクロファージを収集し、その形質や機能をフローサイトメトリー、RT-PCR を用いて検討した。また胃癌細胞株、ヒト末梢血由来マクロファージを使用し、*in vitro*, *in vivo* で腫瘍増殖能を中心に検討を行った。

癌性腹水中の AGP の機能解析では、胃癌細胞株 OCUM-2MD3、NUGC-3 を用いて

AGP による PTX の活性阻害作用および EM 併用による PTX の再活性化に関し *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。

4. 研究成果

胃癌癌性腹膜炎を有する患者と、有しない患者 (control) の腹腔内マクロファージを採取し検討を行ったところ癌性腹膜炎患者の腹腔内には control と比較して多量のマクロファージが集積しており、それらの表面マーカーは CD68⁺CD204⁺マクロファージの割合が 81.8% (control 26.5%, $P < 0.01$)、CD68⁺CD163⁺マクロファージの割合が 58.95% (control 19.8%, $P < 0.01$) であり、そのほとんどが M2 マクロファージであることが分かった。さらに RT-PCR の解析では癌性腹膜炎患者のマクロファージで TNF- α 、CD80、CD86、IL-12p40 が減少し、一方で IL-10、VEGF-A、VEGF-C、MMP-1、amphiregulin の産制が増加していた。*In vitro* の検討では M2 マクロファージと胃癌細胞株との共培養により有意な増殖能の増加を認めた ($P = 0.01$)。さらに胃癌細胞との共培養により amphiregulin の産生上昇を認めた。*In vivo* において、マウス皮下に MKN45 と M2 マクロファージの共投与を行ったところ、MKN45 単独投与と比較して有意に腫瘍の増大を認めた ($P < 0.01$)。

胃癌細胞株における AGP によるパクリタキセルの活性は AGP の濃度依存性に阻害された。また、AGP と競合してエリスロマイシンが濃度依存性にパクリタキセルを再活性化した。さらに、マウス胃癌腹膜播種モデルを作成しコントロール群、PTX 単独投与群、PTX-EM 併用群の 3 群に分けて抗腫瘍効果を比較した。播種結節重量において PTX 単独投与群ではコントロール群に比べて有意に減少しなかったが PTX-EM 併用群では有意に減少した。

以上より、胃癌癌性腹膜炎の病態では M2

マクロファージが腫瘍の進展に寄与すると推察された。さらに、胃癌腹膜播種により濃度が上昇したAGPは静脈投与されたPTXの腹腔内での抗腫瘍効果を抑制するがEMを併用する事で抗腫瘍効果が再活性化することが推察された。

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 2 件)

1, Yamaguchi T, Fushida S et al.: Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. Gastric Cancer 2015 Nov 30. [Epub ahead of print]

2, Ohbatake Y, Fushida S et al.: Elevated alpha 1-acid glycoprotein in gastric cancer patients inhibits the anticancer effects of paclitaxel, effects restored by co-administration of erythromycin. Clin Exp Med. 2015 Sep 10. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 3 件)

1, 山口貴久、伏田幸夫、他：Bidirectional communication between gastric cancer cells and macrophages. 第25回日本消化器癌発生学会総会；2014年11月13日、ホテル日航福岡（福岡県）

2, 大畠慶直、伏田幸夫、他： α 1-酸性タンパク質によるパクリタキセルの活性阻害とエリスロマイシン併用療法による再活性化. 第22回日本がん転移学会学術集会総会；2013年7月11日、ホテルブエナビスタ（長野県）

3, Fushida S et al.: Alpha 1 acid glycoprotein binds to paclitaxel and

substantially alters anticancer effects which could be restored by erythromycin. 21st United European Gastroenterology Week, October 15, 2013, ICC Berlin (Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伏田 幸夫 (FUSHIDA SACHIO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：10301194

(2) 研究分担者

原田 真市 (HARADA SHINICHI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：90272955