

氏名（本籍）	鴨志田 剛	（神奈川県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第160号	
学位授与年月日	平成25年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	The interaction between monocytes and tumor cells promotes monocyte differentiation and tumor cell invasion ～Role of cell adhesion to extracellular matrix～	
論文審査委員	主査	教授 辻 勉
	副査	教授 福井 哲也
	副査	教授 高橋 典子

## 論文内容の要旨

がん組織において、腫瘍細胞と近傍の非腫瘍細胞および細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) との相互作用によって作り出されるがん微小環境 (tumor microenvironment) は、がんの進行に重要であると考えられている。従って、がんを理解するためには、これらががんを取り巻く微小環境を理解することが必要不可欠であると考えられる。がん組織の間質に浸潤するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) と呼ばれ、がん細胞の挙動に影響を与えている。TAM は抗腫瘍作用を発揮する場合もあるが、一方でがん浸潤・転移や血管新生を誘導し、腫瘍進展に対し促進的に働くこともあり、がん患者の予後を良好あるいは不良に導く二面的な作用が知られている。TAM は様々な種類のがん細胞との相互作用により多様な形質を示すことが考えられ、その性状の詳細については未解明である。

本研究ではまず、TAM の性質の理解、分化誘導の機序を解明するため、マクロファージ前駆細胞である単球をがん細胞と共培養し、*in vitro* で TAM 様細胞 (腫瘍馴化マクロファージ: Tumor-conditioned macrophage) の誘導を試みた。ヒト末梢血単球は、ヒトがん細胞株と 3-7 日間共培養することにより、マクロファージ様の伸展した形態を示し、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)-9 産生能をもつ腫瘍馴化マクロファージに形質が変化した。この形質変化誘導能は、ヒト胃がん細胞株 MKN1 とヒトグリオーマ細胞株 A172 では強く、ヒト腎臓がん細胞株 SN12C とヒト膀胱がん細胞株 EJ-1 では弱かった。このことから、共培養に用いるがん細胞の種類により単球の形質変化の程度が

異なることも示された。次に、がん細胞のマトリゲルへの浸潤に及ぼす影響を検討したところ、腫瘍馴化マクロファージの共存により促進され、この促進効果は、共存する腫瘍馴化マクロファージの MMP-9 産生能と相関していた。

次に、MMP-9 産生能と単球の形態変化との間に相関が認められたことから、単球分化における ECM タンパク質の役割について検討を行った。単球とがん細胞の共培養系中に、インテグリン媒介性の細胞接着に対し阻害作用をもつ RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドを添加することにより、単球の分化誘導が顕著に阻害された。さらに、がん細胞が産生するフィブロネクチンを gelatin-Sepharose で吸収することによっても単球の分化誘導が阻害された。また、フィブロネクチンをあらかじめコートしたプレートを用い共培養することによっても、単球の形質変化誘導が促進された。これらのことから、このような単球の形質変化に、がん細胞が産生するフィブロネクチンなどの ECM タンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究から、単球の形質変化に RGD 依存的細胞接着が重要な役割を果たしていることが示された。また、このように分化した腫瘍馴化マクロファージは、MMP-9 産生を通じて、がんの浸潤・転移や血管新生に影響を与えることが示唆された。さらに、本研究で用いた腫瘍馴化マクロファージのモデルは、TAM の性質、分化誘導機序を明らかにするための有用なモデルであると思われる。

これまでに、単球はがん細胞との相互作用で、腫瘍馴化マクロファージへと形質を変えることを明らかにしたが、がん細胞も単球との相互作用により、形質を変化させている可能性を考え、がん細胞の浸潤能に注目し解析を行った。

腫瘍馴化マクロファージを誘導したモデルを応用し、ヒトがん細胞株とヒト末梢血単球を 5 日間共培養し、共培養後のがん細胞の形質を解析した。マトリゲルへの浸潤能および MMP-9 産生能を評価したところ、MKN1 および HT1080 (ヒト線維芽肉腫) 細胞では、単球との共培養により、浸潤能および MMP-9 産生能の増強が認められた。しかし、EJ-1, A172, SN12C 細胞では、そのような形質変化は認められなかった。形質変化を詳しく解析したところ、MKN1 細胞は単球との 5 日間の共培養により、非常に伸展した形態を示し、間葉系マーカーであるビメンチンの発現が上昇した。また、フィブロネクチン産生およびその受容体である  $\alpha 5\beta 1$  インテグリン発現も単球との共培養により増加することが示された。さらに、MKN1 細胞の浸潤能亢進は RGD ペプチドにより抑制され、単球との共培養により、細胞接着で活性化されるシグナルカス

ケードの 1 つである focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化も認められた。HT1080 細胞でも単球との 5 日間の共培養により、MKN1 細胞同様フィブロネクチンおよび  $\alpha 5\beta 1$  インテグリン発現の増強が認められた。しかし、単球との共培養を行っても浸潤能および MMP-9 産生能の増強が認められなかったがん細胞株では、フィブロネクチンおよび  $\alpha 5\beta 1$  インテグリン発現の増強も起こらなかった。これらのことから、一部のがん細胞では、単球との相互作用で誘導される浸潤能および MMP-9 産生能の亢進に、フィブロネクチン- $\alpha 5\beta 1$  インテグリン相互作用が関与していることが示唆された。

次に、がん細胞の形質変化誘導に関わる因子について解析を試みた。近年、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが、がんの悪性挙動を促進することが報告されている。単球/マクロファージはしばしば、TNF- $\alpha$  を産生することが知られている。そこで、単球の培養上清を MKN1 細胞に作用させたところ、浸潤能の亢進が認められたが、培養上清を抗 TNF- $\alpha$  抗体および protein G-Sepharose で処理し、TNF- $\alpha$  を吸収することによって MKN1 細胞の浸潤能亢進が抑制された。また、MKN1 細胞に TNF- $\alpha$  を直接作用させることによっても、浸潤能、MMP-9 産生能およびフィブロネクチン産生能が亢進したこれらのことから、がん細胞の形質変化の一部には、単球が産生する TNF- $\alpha$  が関与することが示唆された。

がん細胞も単球との相互作用により、その形質を変化させ、高い浸潤・転移能、血管新生能などを獲得し、がん進展に促進的に働くことが推察された。さらに、がん細胞からのフィブロネクチン産生が増強することから、単球の TAM への分化にも促進的に作用し、がん細胞と単球の形質変化が相乗的にがんを進展させることが示唆された。

本研究から、単球とがん細胞の相互作用によるそれぞれの細胞の形質変化には、フィブロネクチンなどの ECM タンパク質を介した細胞接着が重要な役割を果たすことが明らかとなった。がん微小環境における ECM タンパク質を介する細胞接着の役割を理解することは、がんの悪性化機序の解明へと繋がり、がんの予防や治療に貢献するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

腫瘍組織に浸潤するマクロファージは、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) と呼ばれ、がんの悪性形質に大きな影響を与えると考えられている。TAM は、抗腫瘍活性を発揮する一方で、がんの浸潤・転移や血管新生に対し促進的に働くこともあり、がん患者の予後を良好あるいは不良に導く二面的な作用があることが報告されているが、その性状については未知の部分が多い。マクロファージは、血液中の単球が起源であり、組織特異的な分化が誘導され、さまざまな形質をもつマクロファージが生成する。しかしながら TAM の分化に関してはほとんど解析されていない。本研究で学位申請者は、単球とがん細胞との相互作用により、単球が TAM 様細胞に変化する過程を *in vitro* で解析することを目的とし、がんの浸潤・転移や血管新生に関与することの知られるマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) の産生能に焦点を当て解析した。また、同時にがん細胞も単球との相互作用によって形質が変化することを見出し、これについても検討を加えた。

第 1 章では、ヒト末梢血単球とがん細胞を共培養し、培養上清の MMP 産生をゼラチンザイモグラフィによって検出した。単球を 4 種のがん細胞 (ヒト胃がん細胞株 MKN1, ヒトグリオーマ細胞株 A172, ヒト腎がん細胞株 SN12C, ヒト膀胱がん細胞株 EJ-1) と 3-7 日間共培養することにより、いずれの細胞株でも MMP-9 の産生が増強され、その作用は MKN1 および A172 細胞では強く、SN12C および EJ-1 細胞では比較的弱いことを見出した。一方で、MMP-2 の産生は、ほとんど変化が認められず、MMP-9 に特異的な現象である可能性を示した。また、抗 MMP-9 抗体を用いた免疫染色後の共焦点レーザー顕微鏡観察から、産生された MMP-9 は、主に単球由来であることが示された。このような MMP-9 産生能が亢進した TAM 様細胞の存在下では、がん細胞の疑似基底膜への浸潤が促進されることを明らかにした。次いで、この共培養系に、インテグリン媒介性の細胞接着に対して阻害作用をもつ RGD ペプチドを添加すると、MMP-9 産生を指標とする単球の分化が強く抑制されることを見出した。さらに、代表的な細胞外マトリックスタンパク質であるフィブロネクチンを除去すると分化が抑えられ、逆に精製したフィブロネクチンを培養系に添加すると MMP-9 産生能が増強されることから、細胞外マトリックスへの接着が単球分化に深く関与することが示唆された。

第 2 章では、がん細胞の形質も単球との相互作用によって変化する可能性を

検討した。第1章で確立した培養系を用いて、がん細胞を単球とともに5日間培養し、その後のがん細胞のMMP産生能および浸潤能を評価した。その結果、MKN1細胞およびHT1080細胞（ヒト線維芽肉腫細胞）では、共培養によりMMP-9産生能および疑似基底膜への浸潤が増強することが判明した。SN12CおよびEJ-1細胞では、MMP-9産生能の増強は顕著ではなく、また浸潤能の増強も認められなかった。がん細胞の形質変化についてさらに調べたところ、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ やフィブロネクチンの発現も上昇し、これらの相互作用ががん細胞の浸潤能亢進に寄与している可能性を示した。最後に、がん細胞の形質変化をもたらすメディエーターとしての腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の重要性を示した。

本研究では、単球から高いMMP産生能をもつTAM様細胞への分化を*in vitro*において達成することに成功し、またその過程にインテグリン媒介性の細胞接着が重要な役割を演じていることを明らかにした。この成果は、腫瘍に浸潤するマクロファージの分化誘導機構を解明するための有用なモデルを提供するものと考えられる。また、がん細胞が分化型の単球との相互作用により浸潤能を獲得する機序の解明に大きく貢献するものと考えられる。本研究で得られた成果は、がんと宿主の微小環境との相互作用によりがんの形質が大きく影響されるという概念を支持すると同時に、新たながん治療にも貢献するものと考え博士（薬学）の学位に十分値するものと判断した、