

氏 名 ・ (本籍)	栗林 邦明 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 880 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	<b>C-Reactive Protein Reduces the Relative Number of Tumor -Associated M2 Macrophages and Intratumoral Angiogenesis in Mice</b> (CRP の抗腫瘍効果 -腫瘍関連マクロファージと腫瘍内血管新生に関して-)
論文審査委員	(主査) 教授 清水 徹男 (副査) 教授 寺田 幸弘 教授 田中 正光

## 学位論文内容要旨

### C-Reactive Protein Reduces the Relative Number of Tumor-Associated M2 Macrophages and Intratumoral Angiogenesis in Mice

CRP の抗腫瘍効果 -腫瘍関連マクロファージと腫瘍内血管新生に関して-

申請者氏名 栗林 邦明

### 研究目的

癌の進展や転移においては腫瘍間質、つまり腫瘍内血管、線維芽細胞、炎症性細胞などが大きな役割を果たしている。その中でも腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophages; TAMs) は、多様なサイトカインを産生することで癌の進展、転移に重要な働きをしている。TAMs は大きく分類すると M1 マクロファージと M2 マクロファージに分かれるが、近年、M2 マクロファージが癌転移や腫瘍内血管新生を促進するとの報告が散見される。

一方、炎症反応の指標として、日常診療において広く用いられている C-reactive protein (CRP) は、癌細胞の増殖や腫瘍内血管新生、転移に対し抑制的に働くことが教室から、また、その他の研究者からも数件報告されている。

そこで私は CRP の抗腫瘍効果における TAMs の関与を検討するべく、腫瘍移植モデルマウスを用い、CRP 投与による移植腫瘍内の TAMs の変化、および腫瘍内血管新生の変化について検討を行った。

### 方法と結果

6 週齢の C3H/HeN マウスの背部尾側に、 $5 \times 10^6$  個の NR-S1M マウス扁平上皮癌細胞を移植した。100  $\mu$  L の PBS に溶いたマウス CRP 1  $\mu$  g を、マウスの頸部背側に 2 日ごと、計 15 回皮下注射した群を CRP 群とし、対照群には 100  $\mu$  L の PBS のみ計 15 回皮下注射した群を設定した。開始から 30 日目にマウスを犠牲死させ、腫瘍を摘出した。

腫瘍の重量および最大断面の面積を両群で比較検討した結果、腫瘍の重量、および最大断面の面積は、両群で差を認めなかった。一方、F4/80、CD206 免疫組織化学染色により、それ

ぞれ全ての TAMs、および M2 マクロファージを同定し、両群で比較検討したところ、CRP 群において TAMs 総数が有意に多く (P=0.0028)、M2 マクロファージの割合が有意に減少していた (P=0.0091)。

また、CD31 に対する免疫組織化学染色により腫瘍内血管を同定し、腫瘍内血管数を両群で比較検討した結果、腫瘍内血管数は CRP 群で有意に少なかった (P=0.0028)。

腫瘍内の IL-4、IL-10、tumor necrosis factor、interferon- $\gamma$ 、colony stimulating factor 1 (CSF-1) の mRNA 発現量を Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) で測定し、両群で比較検討した。その結果、M2 マクロファージに関連する CSF-1 の腫瘍内 mRNA 発現量が、CRP 群で有意に少なかった (P=0.0376)。

### 考察

CRP は、in vitro でヒト末梢血単球を M2 マクロファージに分化させ、また、in vivo では腹腔内マクロファージの M1 マクロファージを増加させるとの報告がある。M2 マクロファージは T 細胞性免疫を抑制して腫瘍免疫を抑制するとともに、endothelial growth factor (EGF) や vascular endothelial growth factors (VEGFs) などの癌浸潤や腫瘍内血管新生を促進するサイトカインを産生する。本研究では CRP 投与により M2 マクロファージの割合が有意に減少し、これに伴い VEGFs などの腫瘍内血管新生を促進するサイトカインが減少したことで、腫瘍内血管新生が減少したと考えた。

また、腫瘍間質では腫瘍細胞が産生する CSF-1 がマクロファージに EGF を産生させ、その EGF が腫瘍細胞に CSF-1 を産生させる EGF - CSF-1 paracrine loop が存在し、この CSF-1 が TAMs の M2 マクロファージへの分化、癌の進展の促進に必須といわれている。腫瘍内 EGF タンパク量など、さらなる追加の検討が必要ではあるが、CRP は TAMs の M2 マクロファージへの分化を抑制する機序で、EGF - CSF-1 paracrine loop を阻害する可能性があると考えた。

### 結論

CRP 投与により、癌転移において重要な腫瘍内血管新生が減少した。また、TAMs の総数を増加させ、M2 マクロファージの割合を減少させることで、抗腫瘍効果をもつ可能性が示唆された。

# 学位 (博士-甲) 論文審査結果の要旨

主 査：清水徹男

申請者：栗林邦明

論文題名：C-reactive protein reduces the relative number of tumor-associated M2 macrophages and intratumoral angiogenesis in mice (CRPの抗腫瘍効果-腫瘍関連マクロファージと腫瘍内血管新生に関して-)

## 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、CRPによる抗腫瘍効果の発現機序の一部に腫瘍関連マクロファージ(Tumor-associated macrophages:TAMs)への影響が関与しているのか否かを解明するためにマウス扁平上皮癌細胞を頸部背側に移植したマウスに2日に一回計15回にわたりCRPを皮下注射したのち腫瘍を取り出して種々の検討を行ったものである。対照群のマウスには同様の手順でPBSを皮下注射したものをを用いている。解析したのは腫瘍の大きさ、腫瘍内TAMsの総数、M2マクロファージの割合、腫瘍内血管数、腫瘍内のIL-4、IL-10、TNF、interferon- $\gamma$ 、CSF-1のm-RNA発現量である。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

近年、癌の治療のターゲットとして、腫瘍関連マクロファージ(TAMs)が注目されている。TAMsはM1マクロファージとM2マクロファージとに大別されるが、M2マクロファージは癌転移、血管新生を促進し、M1マクロファージは癌細胞を抑制する。一方CRPは癌増殖の抑制と転移の抑制に働くことが著者らの研究グループを含む研究者によって報告されている。本研究の斬新さはCRPの抗腫瘍効果ならびに転移抑制効果の発現機序にTAMsが関与する可能性を、癌を移植した動物を用いて初めて明瞭に示したことにある。具体的には、CRP投与によってTAMsのうちM2マクロファージの数は変化せず、M1マクロファージのみが増加したこと、腫瘍内血管数が有意に減少したこと、M2マクロファージの関与するCSF-1

mRNAのみが有意に低下したことを初めて見いだしたことが本研究の斬新さを示すものである。

### 2) 重要性

生体の炎症マーカーであるCRPがTAMsのM2マクロファージへの分化を抑制する機序により腫瘍内血管新生が減少したという著者らのもたらした発見は、今後の癌治療の標的として脚光を浴びているTAMsの理解をすすめる大きな一歩で有り、ひいては新たな癌治療の開発に寄与するものであるという点で極めて重要である。

### 3) 研究方法の正確性

腫瘍組織におけるマクロファージの同定と計測、M2マクロファージの同定と計測、血管新生の評価にあたっては免疫組織染色法を用いて精度の高い測定を行っている。また、マクロファージ関連サイトカインなどのmRNAの発現量についてはreverse transcription-quantitative PCR法を用いて正確に測定している。用いられている統計法も適正で有り、結果の解釈も適切である。○

### 4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決、すなわち、CRPの抗腫瘍効果にTAMsへの影響が関与することを明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載している。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。