

氏名(本籍)	中川二郎(富山県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第707号
学位授与日付	平成19年3月25日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma
審査委員	(主査)教授 岩間 亨 (副査)教授 高見 剛 教授 森脇久隆

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

腫瘍内へのマクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) 浸潤数が増えると乳癌、子宮癌などでは予後が良く、胃癌や大腸癌では予後が悪いと報告されているが、その理由は未だ十分解明されていない。TAM から産生される腫瘍壊死因子 (TNF) は多種の機能を持つサイトカインとして知られ、TNF が免疫応答で正と負の両面の働きをすることが今までの報告で明らかになっている。

そこで我々は、TNF の作用の有無がインターロイキン2 (IL-2) を基調とした免疫治療にどのように影響するか二種類の腫瘍を用いて検討した。

#### 【対象と方法】

- 1) マウス: C57BL/6J マウス (6 週齢, 雄) を用いた。
- 2) 遺伝子導入腫瘍の作製: マウス IL-2 と可溶性 TNF 受容体 2 型 (CD120 b) の cDNA をマウス大腸癌株 MCA38 及びマウス膠細胞腫瘍 (グリオーマ) 株 GL261 に単独又は組み合わせて遺伝子導入した。
- 3) 腫瘍の接種と腫瘍内浸潤細胞の採取: マウスに麻酔後、腫瘍を定位的に脳内に接種した。腫瘍内浸潤細胞採取は腫瘍接種後 14 日目に行い、磁気をつけたビーズで標識された抗 CD8 抗体あるいは抗 CD11 b 抗体で染色後、磁場内のカラムを通し、磁場内に残った細胞を回収して用いた。
- 4) フローサイトメトリー: 細胞表面抗原の染色では、前処理後に蛍光物質で標識された各種細胞表面抗原に対する抗体で染色し、洗浄後固定して解析した。細胞死の検討では、細胞表面抗原の染色後、細胞をカルシウム入りの緩衝液で浮遊させ、アポトーシスした細胞の表面のリン脂質と結合するアネキシン V や、死細胞の核を染色する 7AAD (ViaProbe) で染色し、直ちに解析した。
- 5) マルチプル PCR 法: 細胞のトータル RNA を逆転写し cDNA を調製した後、各種サイトカイン、ケモカインや受容体等に対するプライマーの混合液と混ぜ、PCR 装置で増幅し解析した。
- 6) 免疫染色: 腫瘍を採取後、包埋・凍結し、クリオスタットで 4  $\mu$ m に薄切。その後蛍光標識抗 CD11 b と抗 CCR3 抗体で染色し、洗浄後蛍光顕微鏡と解析ソフトで解析した。

#### 【結果】

- ①GL261 と MCA38 に同一の免疫治療を施し生存日数を検討した。GL261 は IL-2 単独治療が最も長期間生存し、MCA38 では IL-2 と TNF 阻害を併用した群が最も長期間生存した。
- ②腫瘍内浸潤 CD8<sup>+</sup>細胞 (主にキラーT 細胞) と CD11 b<sup>+</sup>細胞 (主に単核性食細胞系細胞, 脳内ではマクロファージとマイクログリア: 以下食細胞と略す。) を回収し、腫瘍の重量と比較した。GL261 では、IL-2 単独群より TNF 阻害との併用群の方がキラーT 細胞及び食細胞のいずれも腫瘍重量あたりの浸潤数は増加した。併用群では、両細胞ともに浸潤しているものの機能が得られていない可能性があった。
- ③GL261 では IL-2 と TNF 阻害の併用でかえって生存日数が延びにくかったことから、GL261 と MCA38 の試験管内での TNF や IFN $\gamma$  に対する感受性を検討した。GL261 では、TNF 単独で細胞死が誘導された

が、MCA38 では、IFN $\gamma$ が共存して初めて明らかな細胞死がみられた。また、GL261 ではわずかだが IFN $\gamma$  によって、TNF 受容体の発現が増強された。

- ④腫瘍内浸潤食細胞の TNF が遊離型か細胞表面型かを検討した。遊離型は検出されなかったが、いずれの群由来の食細胞も細胞表面型の TNF が発現していた。
- ⑤腫瘍内浸潤食細胞がマクロファージ主体かマイクログリア主体か捉えるために、腫瘍を脳内だけではなく、肝内や皮下にも接種し食細胞の分画を回収し比較検討した。食細胞の各種 mRNA の発現パターンは接種した腫瘍が同じであれば同じ傾向がみられたが、接種部位による差はみられなかった。つまり、脳内だけに限定された細胞ではなく、各臓器に共通の細胞が主体と思われた。
- ⑥さらに脳内接種時の腫瘍内浸潤食細胞の由来を決定するために、マクロファージのマーカーである CD45 とマイクログリアのマーカーである CCR3 の発現を調べた。正常肝と正常脳内の Kupffer 細胞やマイクログリアを調べると CCR3 は強発現していた。腫瘍内浸潤食細胞は、皮下、肝、脳内のいずれから採取しても CCR3 陰性、CD45 陽性でありマクロファージのパターンであった。免疫染色では腫瘍内浸潤食細胞のごく一部に CCR3 が陽性となったが、IL-2 治療でマイクログリアの浸潤割合が変化せず、各種 mRNA の発現パターンにも影響を与えなかった。つまり、免疫治療の有無に関わらず、腫瘍内浸潤食細胞はマクロファージが大多数を占めることが判明した。

### 【考察】

腫瘍内浸潤マクロファージ (TAM) は腫瘍内の免疫担当細胞の中で最も多数を占め、腫瘍の浸潤、増殖、血管新生、転移形成、免疫抑制などに広く関わっているが、マクロファージの働きには二面性があり、親腫瘍性と抗腫瘍性の性格がある。今回の結果から少なくとも GL261 では TAM が細胞表面の TNF を介して腫瘍を細胞死させる抗腫瘍性の性格があると思われたが、TNF に感受性のない MCA38 では、TNF 阻害と IL-2 と併用した群の方が生存日数が長く、腫瘍の性格を事前に把握して免疫治療を施すべきであることが2つの腫瘍モデルを比較することで明らかとなった。

また、TAM の各種 mRNA の発現パターンは腫瘍の接種場所の違いより、むしろ腫瘍自体の違いに大きく影響され、さらに腫瘍内浸潤食細胞は出生前から臓器に定住しているマイクログリアではなく、炎症などで局所に浸潤するマクロファージが大半を占めることがわかった。ラットの報告ではマイクログリアとマクロファージの腫瘍内浸潤数はほぼ半数ずつであるといわれているが、我々のマウス系では、ヒトの例と同様マクロファージを主体とすることが明らかとなった。

### 【結語】

我々は TAM 表面の TNF がグリオーマの細胞死誘導に関与する可能性を明らかにした。その過程で「同一免疫治療であっても、腫瘍が異なれば治療結果が異なる。」ことが解明され、腫瘍により免疫治療を選択する必要性があると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 中川 二郎は、マウス腫瘍内浸潤食細胞を解析して、それらがマイクログリアでなくマクロファージであることを解明した。さらに大腸癌とグリオーマ細胞の TNF 感受性の違いに着目し、グリオーマが腫瘍内浸潤マクロファージ表面の TNF を介してアポトーシスになることを解明した。本研究の結果は、個々の腫瘍の治療感受性を加味したオーダーメイド治療の必要性を示すもので、脳腫瘍の免疫治療学のみならず、脳神経外科学、腫瘍学、免疫学の発展に少なからず寄与するものと認められる。

### 【主論文公表誌】

TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma  
Int. J. Oncol. 30, 803-811(2007).