

論文内容要旨

Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression

(大腸癌の浸潤先進部における腫瘍関連マクロファージの役割)

Cancer Science 2021; 112: 2692-2704

主指導教員：田中 信治 教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：伊藤 公訓 教授

(広島大学病院 総合診療医学)

副指導教員：相方 浩 准教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

稲垣 克哲

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) には、リンパ球、好中球、マクロファージなどの免疫細胞が浸潤しており、特に大腸では多くのマクロファージの浸潤を認める。マクロファージは、主に M1 マクロファージ (M1) または M2 マクロファージ (M2) に分類され、M1 はウイルスや微生物の感染に対する宿主防御や抗腫瘍活性に関与し、一方、M2 は壊死組織の除去、血管新生、損傷した組織の再構築と修復、腫瘍の進展に関与するとされている。TME に存在するマクロファージは、

tumor-associated macrophage (TAM) と呼ばれ、しばしば M2 表現型を呈し、悪性黒色腫や乳がんなど多くのがん種で予後不良と関連しているとの報告が多数認められる。

一方、大腸癌では、*in vitro*、*in vivo* の検討において TAM が腫瘍進展を促進させるとの報告が散見されるが、臨床検体を用いた検討においては、TAM が予後不良と関連するという報告もあれば、良好な予後と関連するという報告もあり、大腸癌における TAM の役割については、いまだに議論の余地がある。さらに、大腸癌の進展における TAM の腫瘍内での局在や進展早期における TAM の役割も明らかにされていない。

【目的】

大腸癌の進展、特に早期の段階における TAM の腫瘍内での局在、役割を明らかにすることを目的とし、以下の検討を行なった。

【対象と方法】

まず、粘膜内腫瘍 (IM)、粘膜下層浸潤癌 (SM)、進行癌 (AD) 全 53 例 (IM20 例、SM-CRC20 例、AD13 例) のヒト大腸腫瘍臨床検体を用い、腫瘍進展における TAM の数、表現型、腫瘍内での局在を評価した。TAM の表現型を評価するため、抗 CD68 抗体 (汎マクロファージマーカー) と抗 CD163 抗体 (M2 マーカー) を用いた蛍光二重免疫染色を行い、CD68+CD163-を M1、CD68+CD163+を M2 と定義した。また、腫瘍を腫瘍内部、腫瘍浸潤先進部、腫瘍辺縁、腫瘍外側正常部の 4 つの部位に分け、腫瘍内での局在性の評価を行なった。蛍光二重免疫染色を行なった検体を蛍光顕微鏡で観察し、マクロファージ高浸潤部を同定した。その後、高倍率で高浸潤部を 5 視野ずつ選択し、解析ソフトを用いて汎マクロファージ、M1、M2 の数をカウントし、マクロファージの数を評価し、腫瘍進展におけるマクロファージの数、表現型、腫瘍内での局在について検討を行なった。

次に、SM87 例のヒト大腸癌臨床検体を用い、上記と同様の蛍光二重免疫染色を行い浸潤先進部の TAM の数、表現型を評価し、SM における浸潤先進部の TAM の数、表現型とリンパ節転移を含む臨床病理学的特徴との関連について検討を行なった。

【結果】

IM では、全体的に TAM の数は少なくその多くは M1 であり、比較的均一に分布していたが、SM、AD と腫瘍が進展するにつれ、各部位で TAM の数が増加し、特に M2 数、M2/M1 比が増加していた。さらに腫瘍浸潤先進部でその傾向が顕著であった。症例毎で見ると、IM 症例では浸潤先進部の M2 数はほとんどの症例で少なかったのに対し、AD ではほとんどの症例で多いことが分かった。一方、SM では、浸潤先進部の M2 数が多い症例と少ない症例が混在していることが分かった。

SM87 例を用いた次の検討では、浸潤先進部の M1 数が少ない群で M1 数が多い群に比べてリンパ管侵襲陽性およびリンパ節転移陽性の割合が有意に高かった（順に $P=0.0004$ 、 $P=0.005$ ）。また、浸潤先進部の M2 数が多い群で M2 数が少ない群に比べて浸潤先進部の組織学的分化度が低下している割合、リンパ管・脈管侵襲陽性、リンパ節転移陽性の割合が有意に高かった（順に $P=0.0028$ 、 $P=0.0049$ 、 $P=0.0013$ 、 $P=0.0011$ 、 $P=0.0001$ ）。次に、リンパ節転移陽性症例（LN 陽性群）と陰性症例（LN 陰性群）の浸潤先進部の汎マクロファージ数、M1 数、M2 数、M2/M1 比を比較したところ、汎マクロファージ数は 2 群間で有意な差は認めなかったが、LN 陽性群で M1 数が有意に少なく、M2 数が有意に多く、M2/M1 比が有意に高かった。さらに、receiver operating characteristic 曲線解析を用いて、浸潤先進部の汎マクロファージ数、M1 数、M2 数、M2/M1 比に基づいたリンパ節転移の予測能を検討したところ、area under the curve (AUC) はそれぞれ 0.64、0.78、0.87、0.90 であり、M2/M1 比の AUC が最も高かった。

さらに、腫瘍浸潤先進部を詳細に観察したところ、TAM は癌腺管を取り囲むように分布し、同一症例においても TAM が多い領域、少ない領域が混在していた。TAM が少ない領域、多い領域についてさらに詳細に観察したところ、TAM が少ない領域では、癌腺管の構造は保たれ、組織学的分化度が高く、上皮系のマーカーである E-カドヘリンの発現が保たれていたが、M2 数が多い領域では、癌腺管の構造が崩れ、組織学的分化度が低下し、E-カドヘリンの発現が低下していた。一方、M1 数が多い領域では、TAM が破壊的に浸潤し、癌の腺管構造が破壊されている像が観察された。

【結論】

大腸癌の進展において、特に早期の段階で、浸潤先進部の TAM が重要な役割を果たしていると考えられ、リンパ節転移を含む転移の予測因子や大腸癌治療のターゲットとなり得ることが示唆された。