

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | ヒト食道扁平上皮癌における腫瘍随伴マクロファージによる抗癌剤耐性機序の解明                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Sub Title        | The role of tumor-infiltrating macrophages in the chemoresistance of esophageal squamous cell carcinoma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Author           | 尾原, 健太郎(Ohara, Kentaro)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Publisher        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Publication year | 2017                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Abstract         | <p>食道扁平上皮癌の抗癌剤耐性における腫瘍随伴マクロファージの意義を検討するため、CD68とCD204の免疫染色を行った。CD204陽性細胞は、抗癌剤耐性などの悪性度に関連する種々の臨床病理学的因子と有意に相関した。CD204陽性細胞の浸潤密度の高い症例は低い症例と比較して予後が悪い傾向にあったが、有意差は得られなかった。抗癌剤耐性への関与が指摘されているADAM10分子の免疫染色を施行したところ、CD204陽性細胞数の多い症例では癌細胞におけるADAM10陽性率が有意に高かった。CD204陽性マクロファージは、癌細胞のADAM10発現上昇を介して抗癌剤耐性に関与している可能性が考えられた。</p> <p>To elucidate the role of tumor-infiltrating macrophages in the chemoresistance of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), we performed immunohistochemical analysis of CD68 and CD204 in ESCC. Infiltration of CD204-positive cells was significantly associated with several aggressive pathological factors, including poor chemotherapeutic response. Patients with high infiltration of CD204-positive cells presented a worse prognosis than low infiltration of CD204-positive cells, but this difference did not reach statistical significance. Subsequently, we examined the ADAM10 protein expression by immunohistochemical staining, and found that ADAM10 overexpression was significantly correlated with high infiltration of CD204-positive cells. It is suggested that CD204-positive macrophages may play an important role in the chemoresistance of ESCC through overexpression of ADAM10 protein.</p> |
| Notes            | <p>研究種目：若手研究(B)</p> <p>研究期間：2015～2016</p> <p>課題番号：15K19058</p> <p>研究分野：人体病理学</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K19058seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K19058seika</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19058

研究課題名(和文) ヒト食道扁平上皮癌における腫瘍随伴マクロファージによる抗癌剤耐性機序の解明

研究課題名(英文) The role of tumor-infiltrating macrophages in the chemoresistance of esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

尾原 健太郎 (Ohara, Kentaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40571724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌の抗癌剤耐性における腫瘍随伴マクロファージの意義を検討するため、CD68とCD204の免疫染色を行った。CD204陽性細胞は、抗癌剤耐性などの悪性度に関連する種々の臨床病理学的因子と有意に相関した。CD204陽性細胞の浸潤密度の高い症例は低い症例と比較して予後が悪い傾向にあったが、有意差は得られなかった。抗癌剤耐性への関与が指摘されているADAM10分子の免疫染色を施行したところ、CD204陽性細胞数の多い症例では癌細胞におけるADAM10陽性率が有意に高かった。CD204陽性マクロファージは、癌細胞のADAM10発現上昇を介して抗癌剤耐性に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of tumor-infiltrating macrophages in the chemoresistance of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), we performed immunohistochemical analysis of CD68 and CD204 in ESCC. Infiltration of CD204-positive cells was significantly associated with several aggressive pathological factors, including poor chemotherapeutic response. Patients with high infiltration of CD204-positive cells presented a worse prognosis than low infiltration of CD204-positive cells, but this difference did not reach statistical significance. Subsequently, we examined the ADAM10 protein expression by immunohistochemical staining, and found that ADAM10 overexpression was significantly correlated with high infiltration of CD204-positive cells. It is suggested that CD204-positive macrophages may play an important role in the chemoresistance of ESCC through overexpression of ADAM10 protein.

研究分野：人体病理学

キーワード：食道がん 抗癌剤耐性 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は消化器領域の悪性腫瘍の中でも予後の悪い難治性癌の一つである。欧米諸国では腺癌の割合が増加しているが、日本をはじめとする東アジアでは 90%以上が扁平上皮癌である。食道扁平上皮癌は他の消化器癌と比較して早期よりリンパ行性転移や血行性転移を引き起こすため、外科的治療単独での根治には限界がある。このため、我が国では術前の化学療法が標準治療となっている。しかし、抗癌剤による治療効果の乏しい症例が少なくないため、術前化学療法の施行にもかかわらず予後の改善は十分ではない（Oncology 80:307-313 2011）。このため、抗癌剤抵抗性の克服が食道癌治療成績改善に必須である。食道扁平上皮癌と抗癌剤耐性については様々な研究が行われてきたが、未だ不明な点が多いのが現状である。

近年、癌微小環境を構成する腫瘍随伴マクロファージ（Tumor-associated macrophage: TAM）が様々な悪性腫瘍の発育や進展に関与していることが明らかになりつつあるが、抗癌剤耐性への関与についての情報は限られている。

## 2. 研究の目的

食道癌は予後の悪い治療困難な癌であるが、術前あるいは術後補助化学療法の導入により治療成績は改善しつつある。しかし、遺残・再発率の高さが依然として大きな課題となっており、予後向上のためには抗癌剤耐性の克服が急務となっている。本研究では、腫瘍随伴マクロファージ（Tumor-associated macrophage: TAM）に着目して研究を遂行し、癌微小環境の制御という観点から食道癌における抗癌剤耐性メカニズムを解明することを目的とする。食道扁平上皮癌外科切除検体におけるマクロファージの浸潤密度を検討し、各種臨床病理学的因子、予後、治療耐性との関連を見ることで、食道扁平上皮癌の抗癌剤耐性機序の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

食道扁平上皮癌外科切除検体 93 例を対象とした。そのうち、シスプラチン+5-FU による術前化学療法を施行された症例が 48 例、術前化学療法を施行していない症例は 45 例である。これらの症例の HE 標本およびパラフィン切片を用いた。組織学的治療効果判定は Tumor regression grading (TRG) system を採用した。TRG1~5 に分類し（Front Oncol. 2013; 3: 262）、TRG4 と TRG5 を non-responder 群、TRG1~3 を responder 群に分類した。

マクロファージの浸潤密度は、汎マクロファージマーカーとして CD68 (PG-M1)、M2 型マクロファージマーカーとして CD204 (SRA-C6) の免疫染色を行い、陽性細胞をカウントした。CD68 および CD204 陽性細胞数と、各種臨床病理学的因子や予後との相関を検討した。マクロファージの浸潤密度と臨床病理学的因子

の相関はカイ 2 乗検定、予後との相関は log rank 検定を行い、有意水準は 5%とした。

抗癌剤耐性への関与を指摘されている ADAM10 分子の免疫染色も行い、マクロファージの浸潤密度との相関を検討した。浸潤部における ADAM10 陽性細胞率を測定し、ADAM10 の発現を評価した。マクロファージの浸潤密度と ADAM10 発現率の相関は、マンホイットニーの U 検定により検討した。

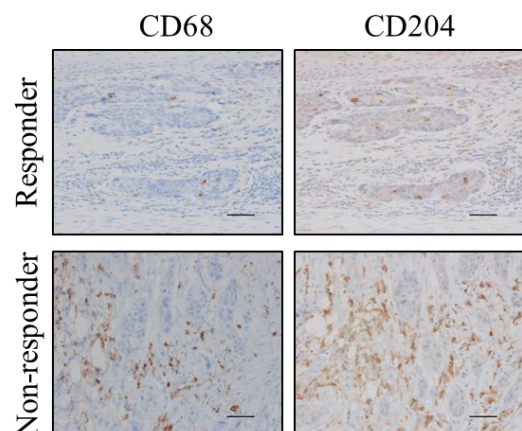
本研究は、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理指針を順守して行い、倫理面への配慮を十分に行った。

## 4. 研究成果

術前化学療法を施行された 48 例のうち、TRG1 は 0 例、TRG2 は 3 例、TRG3 は 14 例、TRG4 は 21 例、TRG5 は 10 例であった。T 因子、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移の有無、分化度、治療効果の陽性症例数は下記表の通りであった。

CD68、CD204 陽性マクロファージのカウントは、浸潤部の陽性細胞数が最も多い箇所 3 か所の合計とした。陽性細胞数が中央値より大きい症例と中央値以下の症例の 2 群にわけ、CD68 陽性マクロファージと CD204 陽性マクロファージの浸潤密度と各種臨床病理学的因子との相関を検討した。CD68 陽性マクロファージの浸潤密度と各因子については、術前化学療法の治療効果と有意に相関したが（ $p=8.48 \times 10^{-6}$ ）、その他の因子とは有意な相関は得られなかった。

一方、CD204 陽性マクロファージの浸潤密度の高い症例は、リンパ管侵襲陽性（ $p=9.37 \times 10^{-4}$ ）、静脈侵襲（ $p=1.76 \times 10^{-2}$ ）、リンパ節転移（ $p=1.89 \times 10^{-4}$ ）、T 因子（ $p=2.20 \times 10^{-2}$ ）と正の相関を示した。また、術前化学療法施行群のうち non-responder 群において、CD68 陽性マクロファージと同様に、CD204 陽性マクロファージの浸潤密度の高い症例が有意に多かった（ $p=1.43 \times 10^{-5}$ ）。術前化学療法の有無と、CD68 および CD204 陽性マクロファージの浸潤密度の間には有意な相関は認めなかった。



（図：CD68 と CD204 の免疫染色。）

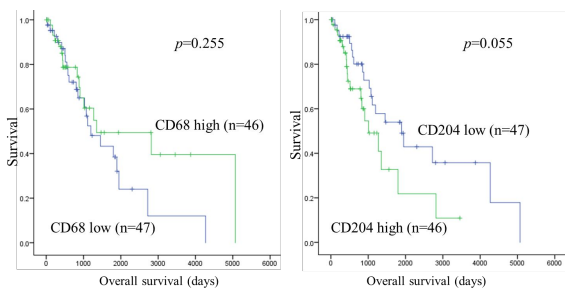
non-responder 群において、responder 群と比較して CD68 陽性マクロファージと CD204 陽性マクロファージの浸潤密度が高い)

|                          | CD68           |               | p      | CD204          |               | p      |
|--------------------------|----------------|---------------|--------|----------------|---------------|--------|
|                          | High<br>(n=46) | Low<br>(n=47) |        | High<br>(n=46) | Low<br>(n=47) |        |
| Tumor depth              |                |               |        |                |               |        |
| T1/2                     | 16             | 26            | 0.061  | 15             | 27            | 0.022  |
| T3/4                     | 30             | 21            |        | 31             | 20            |        |
| Lymphatic invasion       |                |               |        |                |               |        |
| Positive                 | 34             | 27            | 0.127  | 38             | 23            | 0.001> |
| Negative                 | 12             | 20            |        | 8              | 24            |        |
| Venous invasion          |                |               |        |                |               |        |
| Positive                 | 33             | 26            | 0.132  | 35             | 24            | 0.018  |
| Negative                 | 13             | 21            |        | 11             | 23            |        |
| Lymph node metastasis    |                |               |        |                |               |        |
| Positive                 | 37             | 29            | 0.067  | 41             | 25            | 0.001> |
| Negative                 | 9              | 18            |        | 5              | 22            |        |
| Differentiation          |                |               |        |                |               |        |
| Well                     | 12             | 11            | 0.442  | 13             | 10            | 0.691  |
| Moderately               | 24             | 20            |        | 20             | 24            |        |
| Poorly                   | 10             | 16            |        | 13             | 13            |        |
| neoadjuvant chemotherapy |                |               |        |                |               |        |
| absent                   | 22             | 23            | 1.000  | 20             | 25            | 0.409  |
| present                  | 24             | 24            |        | 26             | 22            |        |
| responder                | 1              | 16            | 0.001> | 2              | 15            | 0.001> |
| non-responder            | 23             | 8             |        | 24             | 7             |        |

(表：CD68 陽性マクロファージおよび CD204 陽性マクロファージの浸潤密度と臨床病理学的因子の相関)

次に、マクロファージの浸潤密度と予後との相関を検討したところ、CD204 陽性マクロファージの浸潤密度の高い症例は全生存期間が短い傾向にあったが、有意差は得られなかった ( $p=5.50\times10^{-2}$ )。CD68 陽性マクロファージの浸潤密度と全生存期間の間にも有意な相関は認めなかった。

以上のことから、食道扁平上皮癌組織に浸潤する CD204 陽性マクロファージは、抗癌剤耐性に関与しているのみならず、症例の悪性度に寄与していることが示唆された。

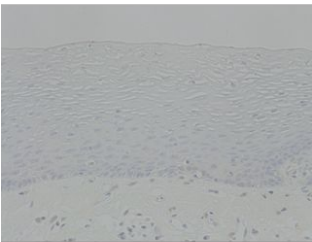


(図：CD68 陽性マクロファージの浸潤密度及び CD204 陽性マクロファージの浸潤密度で分けた時の kaplan-meier 曲線)

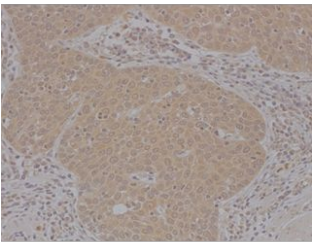
CD204 マクロファージがどのような機序で抗癌剤耐性に関与しているのか検討するた

め、他の癌腫で抗癌剤耐性への関与を指摘されている ADAM10 の癌細胞における発現率と、マクロファージの浸潤密度の相関を免疫染色により検討した。その結果、CD204 陽性マクロファージの浸潤密度の高い症例では、癌細胞における ADAM10 の陽性率が有意に高いという結果が得られた ( $p=2.40\times10^{-2}$ )。CD204 陽性マクロファージは、癌細胞の ADAM10 発現上昇を介して抗癌剤耐性に関与している可能性が考えられた。

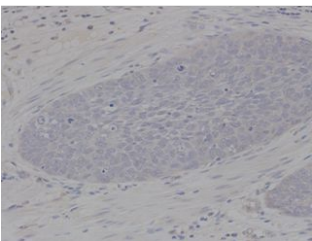
非癌部粘膜



扁平上皮癌（陽性例）



扁平上皮癌（陰性例）



(図：非癌部と扁平上皮癌の ADM10 免疫染色。非癌部では ADAM10 陰性である。)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)



名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

尾原 健太郎 (Ohara Kentaro)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：40571724