

大腸がん治療抵抗性にかかわるヒスタミン含有間質細胞の同定

愛知県がんセンター 研究所
がん病態生理学分野 主任研究員 藤下晃章

愛知県がんセンター 研究所
がん病態生理学分野 主任研究員 小島 康

1. 研究の背景・目的

がん微小環境は血管、線維芽細胞、免疫細胞など様々な間質細胞によって構成されており、がんの発生や進展に促進的あるいは抑制的に関与している。これまでに大腸がんマウスモデルを用いた解析から、浸潤部に集積する間質細胞が大腸がん細胞の分子標的薬に対する治療抵抗性獲得に関与することを明らかにした(文献1)。さらに解析を進めたところ、浸潤部に集積する間質細胞はマクロファージであり、ヒスタミンを含有していることを見出した。治療抵抗性大腸がんにおけるヒスタミンおよびそれに関連するマクロファージの役割を検証するため、大腸がんモデルマウスにヒスタミン受容体阻害薬を投与したところ、分子標的薬抵抗性大腸がん浸潤先端におけるマクロファージの集積が抑制され、大腸がんの浸潤が顕著に抑制された。このことから、大腸がん組織におけるヒスタミン刺激の抑制は大腸がんの浸潤を制御する可能性が示唆された。

ヒスタミン含有マクロファージが大腸がん臨床検体にも存在し、それらが大腸がんの再発、予後、治療抵抗性に関与する可能性を検証するための前段階として、本研究では、臨床大腸がん組織中のヒスタミン濃度を測定し、ヒスタミンに関連するマクロファージが集積する可能性について検証する。

2. 研究の対象ならびに方法

大腸がん組織のヒスタミン濃度測定

ヒト大腸がん組織 34 検体 (2019 年 12 月から 2020 年 12 月の期間に採取) 5-40mg を用いて大腸がん組織のヒスタミン濃度を ELISA 法 (NBP2-62860, Novus) により測定した。

検出された数値を使用した試料の重量で補正した。

大腸がんにおけるヒスタミン関連遺伝子の解析

TCGA の大腸がんの遺伝子発現データセットから、ヒスタミン合成酵素 (HDC)、ヒスタミン H1 受容体 (HRH1)、および H2 受容体 (HRH2) と相関のある遺伝子を、cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) を用いて同定し、各遺伝子と相関の高い上位 100 遺伝子について Metascape (<https://metascape.org/>) を使って Enrichment 解析を行った。

大腸がん組織を用いた免疫染色

大腸がん組織ヒスタミン濃度の高い 10 検体とヒスタミン濃度の低い 10 検体のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片について、CD163 (MCA1853, BioRad)、GPNMB (#38313, Cell Signaling Technology)、CD68 (916104, BioLegend) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。組織切片は脱パラフィン後、クエン酸緩衝液 (pH6.0) で抗原賦活化を行った。ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) により定量化を行い、大腸がん浸潤部単位面積あたりの染色領域を算出した。

3. 研究結果

大腸がん組織ヒスタミン濃度測定

大腸がん組織 34 検体のヒスタミン濃度を ELISA 法により測定した。がん組織中のヒスタミン濃度はおよそ 0.7–4 ng/mL であり、大腸がん臨床検体間でもヒスタミン含有量のばらつきが生じていることを確認した (図 1)。組織中のヒスタミン濃度が高い 10 検体と低い 10 検体を用いて、以降の解析を行った。

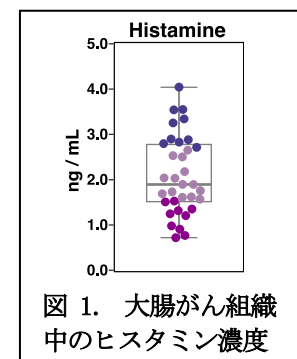


図 1. 大腸がん組織中のヒスタミン濃度

大腸がん組織中の CD68 陽性マクロファージの同定

高頻度に用いられる組織マクロファージ・単球のマーカー CD68 抗体を用いて免疫染色を行った。ヒスタミン濃度、管腔側や浸潤部 (漿膜側) など部位にかかわらず、CD68 陽性のマクロファージは大腸がん組織中に一様に存在していた (図 2)。

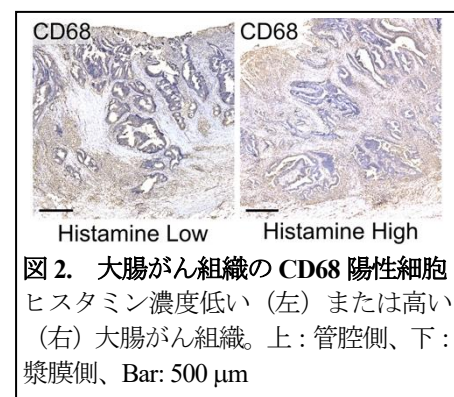
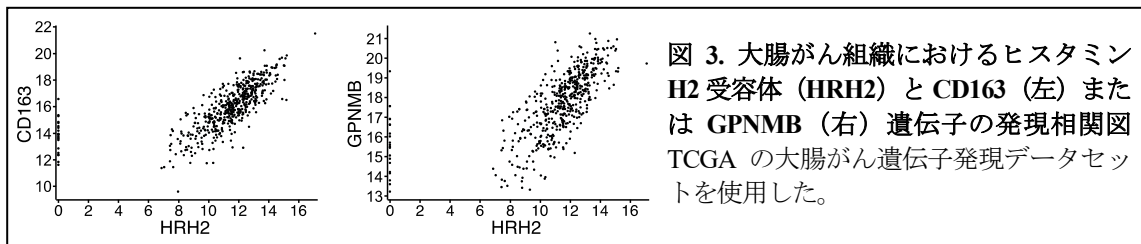


図 2. 大腸がん組織の CD68 陽性細胞
ヒスタミン濃度低い (左) または高い (右) 大腸がん組織。上: 管腔側、下: 漿膜側、Bar: 500 μm

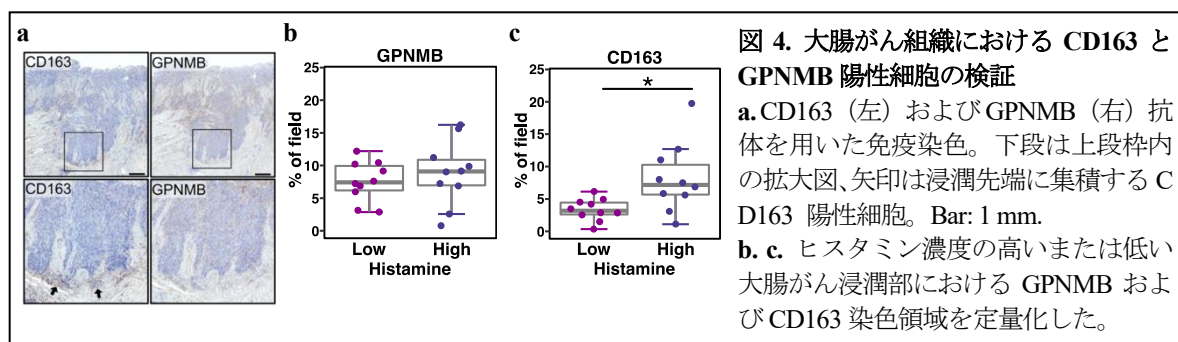
大腸がん組織におけるヒスタミン関連マクロファージマーカーの選定

大腸がん組織においてヒスタミン合成酵素 (HDC)、ヒスタミン H1 および H2 受容体 (HRH1, HRH2) と相関の高い遺伝子について Enrichment 解析を行ったところ、lymphocyte activation (HDC: LogP=-26.5)、wound healing (HRH1: LogP=-6.8)、myeloid leukocyte activation (HRH2: logP=-25.8) がそれぞれ上位にランクされた。HRH2 と強い相関が認められた遺伝子にはマクロファージ・単球のマーカーである CD163 (Spearman's Correlation 0.88) やマクロファージが産生する GPNMB (Spearman's Correlation 0.81) が含まれていた (図 3)。



大腸がん組織における CD163 陽性マクロファージの同定

大腸がん組織における CD163 および GPNMB の発現を免疫染色で検証した。CD163 陽性の細胞は大腸がん細胞の浸潤先端に集積しており、管腔側にはほとんど確認されなかった (図 4a)。一方、GPNMB 陽性細胞は大腸がん浸潤部に広範囲に認められたが、CD163 陽性細胞と比べて浸潤先端に限局してなかった (図 4a)。組織中のヒスタミン濃度が高い 10 検体と低い 10 検体を用いて、CD163 および GPNMB の染色領域を定量化したところ、GPNMB 染色領域と組織中のヒスタミン量に差は認められなかったが (図 4b)、CD163 染色領域はヒスタミン濃度が高い組織において高くなることが確認された (図 4c)。これらの結果から大腸がんにおける CD163 陽性マクロファージが大腸がん組織におけるヒスタミンと関わりがある可能性が示唆された。



4. 考察

CD163 はマクロファージの中でも M2 に分類されるマクロファージのマーカーであり、組織修復に関与し、腫瘍関連マクロファージのマーカーとしても用いられている (文献 2,3)。また CD163 陽性マクロファージが多い乳がんや大腸がん患者の予後は悪いことが報告さ

れている（文献4,5）。本研究において大腸がん組織中のヒスタミン濃度と大腸がん浸潤部におけるCD163陽性マクロファージの集積との関わりが示唆されたこと、そしてマウスモデルを用いた研究からヒスタミン阻害薬によって大腸がん浸潤部へのマクロファージの集積が抑制されたことから、組織中のヒスタミン濃度が高くCD163陽性マクロファージの集積が多い大腸がん患者においてヒスタミン阻害薬の投与が予後改善に結びつく可能性が期待される。

一方、今回使用した臨床検体はヒスタミンの安定性を考慮し直近に採取されたものであることから、再発や治療抵抗性、予後などの情報が不足している。現時点では臨床情報とヒスタミン濃度との関連は解析できていないが、今後これらを考慮し検討を続けたい。

5. 文献

1. Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, Aoki M. Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene*. 36, 6480-6489, 2017.
2. Frank A W Verreck, Tjitske de Boer, Dennis M L Langenberg, Linda van der Zanden, Tom H M Ottenhoff. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol*. 79, 285-293, 2006.
3. Moniek Heusinkveld, Sjoerd H van der Burg. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*. 9, 216, 2011.
4. Ivan Shabo, Olle Stål, Hans Olsson, Siv Doré, Joar Svanvik. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer*. 123, 780-786, 2008.
5. Chaogang Yang, Chen Wei, Shuyi Wang, Dongdong Shi, Chunxiao Zhang, Xiaobin Lin, Rongzhang Dou, Bin Xiong. Elevated CD163⁺/CD68⁺ Ratio at Tumor Invasive Front is Closely Associated with Aggressive Phenotype and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci*. 15, 1325-1335, 2019.

6. 論文発表

なし（投稿準備中）