

論 文 内 容 要 旨

題目 Surfactant Protein A Suppresses Lung Cancer Progression by  
Regulating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages

(肺サーファクタント蛋白 SP-A は腫瘍関連マクロファージ分化  
制御を介して肺癌進展を抑制する)

著者 Atsushi Mitsuhashi, Hisatsugu Goto, Takuya Kuramoto, Sho Tabata,  
Sawaka Yukishige, Shinji Abe, Masaki Hanibuchi, Soji Kakiuchi,  
Atsuro Saijo, Yoshinori Aono, Hisanori Uehara, Seiji Yano, Julie G.  
Ledford, Saburo Sone, and Yasuhiko Nishioka

平成 25 年 5 月 14 日発行 The American Journal of Pathology 第 182  
巻第 5 号 1843 ページから 1853 ページに発表済

内容要旨

肺 surfactant protein A (SP-A) は肺胞内腔を覆うサーファクタントにおける蛋白質成分の一つであり、その機能として肺胞表面張力を低下させるほか、生体防御機能にも関与することが知られている。一方、SP-A は肺腺癌のマーカーとしても使用されており、SP-A を高発現する肺腺癌症例では予後が良好である報告もあることから、癌の増殖、進展との関連性が示唆されている。本研究では肺微小環境下での肺癌進展、転移における SP-A の役割とその作用機序についてヒト肺腺癌細胞株と免疫不全マウスを用いた皮下移植、肺転移モデルにおいて解明することを目的とした。

*In vitro* において SP-A は各ヒト肺腺癌細胞株でその遺伝子、蛋白質発現が認められなかったため、ヒト肺腺癌細胞株 (PC14PE6, A549) に SP-A を強制発現させた株を作製した。これらの細胞株をマウスの皮下に移植したところ、SP-A 強制発現株は control 株と比較して腫瘍増殖の抑制が見られた。また、SP-A 強制発現株の腫瘍組織では CD68 陽性細胞 (マクロファージ) 数の増加が見られ、その中でも抗腫瘍性マクロファージである TNF- $\alpha$  陽性 M1 マクロファージの数が上昇していることを免疫組織化学的検討にて確認した。また、M1 マーカーとしても知られる CCL5 等の炎症性ケモカインの遺伝子発現上昇も認められた。一方、腫瘍内における MRC-1 陽性である M2 マクロファージ数および M2 マーカー遺伝子発現に有意な変化は見られなかった。さらに、CCL5 を始めとする炎症性ケモカインは NK 細胞の誘導因子としても知られることから、腫瘍組織中

の NK 細胞数を比較したところ、SP-A 強制発現株の皮下移植組織に集積した NKp46 陽性 NK 細胞数は control 群に比べ増加しており、NK 細胞の活性化マーカーである Prf1, GzmB 遺伝子発現量の上昇も認められた。また、*in vitro* において SP-A 蛋白をマウス NK 細胞に直接添加した場合、Prf1, GzmB の遺伝子発現変化は見られなかったことから、SP-A による NK 細胞の誘導、活性化は直接的ではなく、マクロファージの M1 分化を介した間接的な作用であることが考えられた。

また、*in vitro* でマウス腹腔滲出性マクロファージおよびヒト末梢血単球に SP-A 蛋白を添加すると、M1 マクロファージマーカー、特に CCL5 などの炎症性ケモカインの遺伝子発現量が上昇した一方、マウス肺胞マクロファージはその影響を受けなかったことから、SP-A は循環血液中より腫瘍内へ集積するマクロファージや単球の M1 分化を誘導する可能性が示唆された。

さらに、肺微小環境下における SP-A の腫瘍転移能への影響を確認するため、*nude mouse* に PC14PE6 細胞を尾静脈より接種し肺転移形成を比較、検討した。その結果、SP-A 強制発現株では control 株に比べ有意に転移結節数、胸水量の減少が認められ、皮下移植モデルと同様に腫瘍内 M1 マクロファージや NK 細胞数の増加が見られた。

最後に、SP-A の腫瘍転移抑制効果における NK 細胞の影響を確認するため、抗マウス IL-2R $\beta$  鎖モノクローナル抗体 (TM- $\beta$ 1) 投与により NK 細胞を除去した *nude mouse* において PC14PE6 細胞の腫瘍転移能を検討した結果、SP-A 強制発現株と control 株との有意差は認められなくなった。

以上の結果より、腫瘍における SP-A の発現は、腫瘍内へ M1 マクロファージを誘導し、それに伴う NK 細胞の集積と活性化により腫瘍進展を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1195</b> 号	氏名	三橋 惇志
審査委員	主査 安友 康二 副査 井本 逸勢 副査 片桐 豊雅		

題目 Surfactant Protein A Suppresses Lung Cancer Progression by Regulating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages

(肺サーファクタント蛋白 SP-A は腫瘍関連マクロファージ分化制御を介して肺癌進展を抑制する)

著者 Atsushi Mitsuhashi, Hisatsugu Goto, Takuya Kuramoto, Sho Tabata, Sawaka Yukishige, Shinji Abe, Masaki Hanibuchi, Soji Kakiuchi, Atsuro Saijo, Yoshinori Aono, Hisanori Uehara, Seiji Yano, Julie G. Ledford, Saburo Sone, and Yasuhiko Nishioka

平成 25 年 5 月発行 The American Journal of Pathology 第 182 巻第 5 号 1843 ページから 1853 ページに発表済  
(主任教授 西岡 安彦)

要旨 肺 surfactant protein A (SP-A) は肺胞内腔を覆うサーファクタントにおける蛋白質成分の一つであり、その機能として肺胞表面張力を低下させるほか、生体防御機能にも関与することが知られている。一方、SP-A を高発現する肺腺癌症例では予後が良好である報告もあることから、SP-A は肺癌の増殖・進展と関連することが示唆されている。

申請者らは、肺微小環境下での肺癌進展・転移における SP-A の役割とその作用機序について解明することを目的に、ヒト肺腺癌細胞株 (PC14PE6、A549) に SP-A を強制発現させ、免疫不全マウスへの皮下移植モデルおよび経尾静脈接種による肺転移モデ

ルを用いて検討した。得られた結果は以下に要約される。

- (1) 皮下移植モデルにおいて SP-A 強制発現株は control 株と比較して腫瘍増殖が抑制されていた。
- (2) SP-A 強制発現株の腫瘍組織では、CD68 陽性マクロファージ、特に TNF- $\alpha$  陽性 M1 マクロファージ数の増加および M1 マーカー遺伝子発現の上昇が確認された。一方、腫瘍内における MRC-1 陽性 M2 マクロファージ数および M2 マーカー遺伝子発現に有意な変化は見られなかった。
- (3) SP-A 強制発現株の腫瘍組織では、NKp46 陽性 NK 細胞数の増加およびパーフォリン 1、グランザイム B の遺伝子発現の上昇が認められた。
- (4) *In vitro* でマウス腹腔滲出性マクロファージおよびヒト末梢血単球に SP-A 蛋白を添加すると、M1 マクロファージマーカーの発現が上昇した。
- (5) 肺転移モデルにおいて、SP-A 強制発現株では control 株に比べ有意に転移結節数、胸水量の減少が認められ、腫瘍内 M1 マクロファージおよび NK 細胞数の増加が見られた。
- (6) NK 細胞を除去したマウスでは、SP-A 強制発現株と control 株との肺転移能における有意差は認められなかった。

以上の結果より、SP-A は腫瘍内マクロファージの M1 分化誘導を介して NK 細胞の腫瘍内集積および細胞傷害活性を増強することにより腫瘍進展を抑制する可能性が示唆された。本研究は SP-A による新たな抗腫瘍免疫機構の解明と肺腺癌に対する新規治療法開発に寄与する可能性が大であり、学位授与に値すると判定した。