

学 位 論 文 要 約

研究題目

Itraconazole Repolarizes Tumor-associated Macrophages
and Suppresses Cervical Cancer Cell Growth

(イトラコナゾールは M2 型腫瘍関連マクロファージを M1 型に再分極し癌細胞増殖を抑える)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻

器官・代謝制御系

産科学婦人科学 (指導教授 柴原 浩章)

氏 名 瀧本 裕美

背景：当科ではこれまで抗真菌薬であるイトラコナゾール(ITZ)の抗腫瘍効果に着目し複数のがん種で臨床及び基礎研究を報告してきた。その目的は、有効で安全ながん治療薬を安価に提供すること、および、作用機序を解明し新規治療薬開発のシーズを探索することである。2014 年より婦人科がんを含む複数の癌腫で化学療法中に ITZ が投与された患者の予後が改善する可能性があることを報告してきた。基礎研究では婦人科がんを含む複数のがん種由来 12 種のがん細胞株を用いて検討し、子宮頸癌由来の CaSki 細胞が最も ITZ に感受性があること、CaSki 細胞は子宮頸癌で頻度の高い PIK3CA や sonic Hedgehog の活性型変異を有しており、ITZ 投与により異常亢進した Akt や Hedgehog シグナルが抑制され、腫瘍増殖が抑えられることを明らかにした。他機関から血管内上皮や髄芽腫細胞の増殖抑制に細胞内コレステロール輸送障害が関与することが報告されたため、CaSki 細胞でも実施したところ機序はそれぞれ異なるが細胞内コレステロールの輸送障害と細胞膜や細胞内小器官膜を構成するリン脂質に変化が生じることが明らかとなった。2015 年よりイトラコナゾールを用いたトランスレーショナルリサーチである window of opportunity 試験 (WOO 試験、jRCTs051190006) を開始し、PIK3CA 変異が検出された子宮頸癌患者を積極的に登録した。頸がん患者 6 名の投与前後組織マイクロアレイ解析にて、M1 型マクロファージ (anti-tumorigenic) に関するパスウェイと、コレステロール代謝が関係するパスウェイが抽出されることが推測された。上記経緯より、ヒト単球白血病細胞(THP-1 細胞)株から M2 TAM を誘導し、ITZ を添加することで M1 様に極性変化し抗腫瘍効果を示すか検討した。

方法： THP-1 細胞は phorbol myristate acetate によりマクロファージに誘導し、さらに lipopolysaccharide、IFN- γ で M1 マクロファージ、IL-4、IL-13 で M2 マクロファージに誘導した。

M1 及び M2 マクロファージの極性評価として細胞膜抗原をウェスタンブロット、分泌タンパク質を ELISA により評価した。また、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬標的プロテオミクスプロジェクトとの共同研究により M2 マクロファージについて、ITZ 添加培養の有無によるタンパク発現の違いを液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)で網羅的に解析した。

抗腫瘍効果は、M2 マクロファージの上清との培養下、そして M2 マクロファージとの共培養下での Caski 細胞(子宮頸がん細胞)の生存率を評価した。ITZ の添加培養はいずれも 10^{-5} M とした。

結果：M1 マクロファージは、樹状突起を持ち紡錘形で接着性が強く、M2 マクロファージは大型球

形多核で形態的にも異なっていた。M2 マクロファージは、ITZ で 24 時間処理すると M1 様の形態に変化し、CD163 および CCL18 の発現が減少した。この M1 様形態は、ITZ 投与 7 週間後も維持され、ITZ 除去後は元の形態に戻った。ITZ で処理した M2 マクロファージのプロテオミクスでも、腫瘍壊死因子 (TNF) 関連タンパク質のレベル上昇など、M1 様の表現型への変化が確認された。

M1 マクロファージとの共培養により、CaSki 細胞の増殖は有意に抑制された ($p=0.012$) 一方で、M2 マクロファージでは増殖が促進された ($p<0.0001$)。

M2 マクロファージを ITZ 添加により培養した上清は ITZ のみを添加した培養と比較して有意に Caski 細胞増殖が抑制された ($p<0.0001$)。Caski 細胞は M2 マクロファージと共培養すると増殖が促進されるが ($p<0.0001$)、M2 マクロファージと共培養すると Caski 細胞のみを ITZ 添加培養したものに比べてさらに増殖が抑制された ($p<0.0001$)。

結論：ITZ は M2 マクロファージを M1 型に再分極させ、液性因子により子宮頸がん細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

ITZ の TAM を介した抗がん作用を実証した上記の論文報告以降、TAM の細胞内コレステロールに着目して研究を継続している。TAM の M2 形質維持には細胞内コレステロールの枯渇が必要である。がん組織での ITZ 投与後のコレステロール産生抑制、M2 マクロファージの発現蛋白 LC/MS 解析での排出パスウェイ亢進から、ITZ は M2 マクロファージの細胞内コレステロールを増加し、ネガティブフィードバックでコレステロール産生抑制と排出促進が生じたのではないかと考え、細胞内コレステロール増加により M1 マクロファージに形態・形質変化したのではないかと考え、現在、シングルセル RNA 解析、細胞内脂質と脂質代謝にかかわるオルガネラの免疫細胞染色、関西学院大学理学部化学科との共同研究によりラマン分光法による細胞内コレステロール定量化及び分布の可視化を行っている。