

乳がんの病期に伴う末梢血 CD14^{high}CD16⁺ 単球の増加

山元 奈穂¹ 白川 愛子² 塩崎 均¹ 綿谷 正弘¹ 義江 修²

¹近畿大学医学部外科学教室 ²近畿大学医学部細菌学教室

抄 録

末梢血中の単球は表面抗原 CD14 と CD16 の発現により CD14^{high}CD16⁻ 単球と CD14^{low}CD16⁺ 単球に大別される。近年様々な疾患で、両者の中間型サブセット CD14^{high}CD16⁺ 単球の増加が報告されている。今回、健常者と乳がん患者の末梢血中単球分画を比較した結果、組織型や HER2・ホルモンレセプターの発現の有無には関わらず、病期の進行した症例では CD14^{high}CD16⁺ 単球の有意な増加を認めた。ケモカインレセプター (CCR2, CXCR4, CXCR7, CX₃CR1) の発現パターンからは CD14^{high}CD16⁺ 単球は CD14^{high}CD16⁻ 単球と CD14^{low}CD16⁺ 単球の中間型の形質を示し、この発現パターンには健常者と乳がん患者で差はなかった。また、健常者由来末梢血単核球を数種のサイトカインやリポポリサッカライドで刺激した結果、TGF- β 1 のみが CD14^{high}CD16⁺ 単球を増加させた。さらに、末梢血単核球と乳がん細胞株との共培養でも CD14^{high}CD16⁺ 単球は著明に増加し、その効果は TGF- β タイプ1レセプターキナーゼ選択的阻害剤で抑制された。しかしながら、乳がん患者の血漿中 TGF- β 1 値については病期に関わらず、有意な上昇は見られなかった。以上より、乳がん患者では病期が進行するとともに末梢血中の CD14^{high}CD16⁺ 単球が増加すること、および乳がん細胞株は TGF- β 1 を産生することにより CD14^{high}CD16⁺ 単球を増加させる作用を示すこと、を明らかにした。

Key words: 乳がん, 単球, ケモカインレセプター, TGF- β 1

緒 言

わが国において、乳がんは罹患率、死亡率ともに増加の一途にあり、年齢調整死亡率では女性における部位別がん死因の第1位である。また、死亡割合において50歳代と75歳以上に2回のピークを有しており、若年時の死亡割合が高いことから社会的にも非常に重要な疾患と言える。乳がん細胞は比較的病初期より全身に微小転移を起こしているとされ¹、治療は外科療法や放射線療法といった局所療法と全身療法である内分泌療法・化学療法・分子標的療法を組み合わせる集学的に行われる。再発・転移は8~9割が5年以内に起こることが多いが、少数ながらそれ以降も見られることより、他の腫瘍性疾患に比べ予後が長く、治療開始後長期の経過観察を要する。長期にわたる加療期間において病勢の判断は極めて重要であり、CA-125・CA15-3等の腫瘍マーカーによる診断が行われてはいるが、初期のがんにおいてはほとんど上昇が認められないなどの問題点が指摘されている。そのため、感度のよいバイオマーカー

の開発が求められる。

単球は、末梢血白血球の3~6%を占め、骨髄で生産され末梢血中に放出される。単球は免疫反応において異物の貪食、ヘルパーT細胞への抗原提示、TNF- α , IL-1 β , IL-6などのサイトカインの生産、といった重要な役割を担っている。ヒトの単球はさらに表面マーカーのCD14とCD16の発現の違いから、大きく2つのサブセット (CD14^{high}CD16⁻ 単球と CD14^{low}CD16⁺ 単球) に分類され、前者が80-90%を占める。また、ケモカインレセプターは白血球・リンパ球の遊走と組織ホーミングを制御し、個々の機能的サブセットにより発現パターンや発現レベルが異なることが知られている⁴。単球は、ケモカインレセプター CCR2 と CX₃CR1 の発現の違いから、CCR2⁺CX₃CR1^{low} と CCR2-CX₃CR1^{high} の2つのサブセットに分けられる⁵。そして前者は炎症組織に浸潤する炎症性単球、また後者は恒常的に組織にホーミングする組織型単球と考えられる⁵。また前者はメジャーサブセットの CD14^{high}CD16⁻ 単球に対応し、後者はマイナーサブセットの CD14^{low}CD16⁺ 単

球に対応する。さらに近年、これらの2つのサブセットの中間的な形質を示す CD14^{high}CD16⁺ 単球が、自己免疫疾患、感染症、転移性の胃がん・大腸がん、などで増加することが報告されている⁶⁻¹¹。

乳がんも含めたがん状態では免疫抑制的な体内環境が作られていることが知られており、がん細胞の産生する液性因子や、がん細胞の存在により誘導される免疫抑制細胞（制御性T細胞、腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来抑制細胞など）の関与が報告されている^{2,3}。特に、がん細胞やがん組織が産生する液性因子は単球も含めた免疫担当細胞の分化や機能に対して大きな影響を及ぼすと考えられる。今回、我々は乳がん患者におけるがん状態の免疫系への影響を明らかにし、また簡便に測定可能かつ臨床上有用な新たなバイオマーカー探索の目的で、健常者と乳がん患者で末梢血単球の比較を行った。その結果、乳がん患者では中間的サブセットの CD14^{high}CD16⁺ 単球が病期の進行にともない有意に増加していることを見いだした。さらに、様々なサイトカイン処理や乳がん細胞株との共培養実験から、TGF- β 1 が CD14^{high}CD16⁺ 単球を増加させる因子のひとつであることを明らかにした。

方 法

1. 症例

2009年4月以降、近畿大学医学部付属病院にて治療を受けた乳がん症例63例と、同病院職員である健康な女性20例を症例とした。症例にはすべて研究に関する十分な説明がなされ、同意を得たうえで採血を行った。本研究は学内倫理委員会において承認を得た上で行われた。

経静脈的に末梢血の採血を行い、検体採取に関する問題は全症例で認められなかった。採取後の末梢血から Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を用いて末梢血単核球 (PBMC) を分離し、セルバンカー（三菱化学メディエンス、東京）に懸濁して-80°Cで凍結保存した。

2. HER2 とホルモンレセプターの検出

診断に関わる組織型の判定や免疫学的染色はすべて近畿大学医学部付属病院病理部にて施行された。HER2 発現は immunohistochemistry (IHC 法) にて染色し、判定0/+1を陰性、+3を陽性とし、+2の場合はさらに fluorescent in situ hybridization (FISH 法) にて HER2 遺伝子増幅が確認されたものを陽性、それ以外を陰性とした。エストロゲンレセプターとプロジェステロンレセプターの発現は IHC 法で染色のうえ、Allred Score を用いて判定を行い、Total score 0-2を陰性、3-8を陽性とした。

表1 フローサイトメーターによる解析に用いた抗体

抗体	クローン	メーカー
一次抗体		
CXCR4	44716	R&D Systems
CXCR7	358426	R&D Systems
CCR2	48607	R&D Systems
FITC-CX ₃ CR1	2A9-1	MBL
mouse IgG _{2a}		Dako
mouse IgG _{2b}		Dako
FITC-rat IgG _{2b}		MBL
二次抗体		
FITC-anti-mouse IgG F(ab') ₂		SIGMA-ALDRICH
三次抗体		
PE-anti-CD14	61D3	e-Bioscience
PECy7-anti-CD16	3G8	BD Pharmingen
APC-anti-HLA-DR	L243	BioLegend

3. フローサイトメーターによる単球分画の解析

凍結保存された PBMC を融解して染色バッファー（2%牛胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝液）に懸濁し、ヒト AB 型血清を用いてブロッキングを行った。その後、PE-labeled anti-CD14, PECy7-labeled anti-CD16, および APC-labeled anti-HLA-DR で3重染色した。ケモカインレセプターを同時に染色する場合は、1次抗体を加えて4°C、45分間反応させ、染色バッファーにて洗浄の後、2次抗体を反応させ（4°C、30分）、再度洗浄後にマウス血清にてブロッキングを行い、3次抗体を反応させた（4°C、30分）。使用した抗体およびその順序は表1にまとめた。染色後、PBMC は染色バッファーに懸濁し、FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて測定し、CellQuest Software にて解析を行った。

4. 各種サイトカイン、リポポリサッカライド、および乳がん細胞株との共培養の単球サブセットに対する効果

健常者 PBMC を非付着性プレート（ハイドロセル、セルシード、東京）を用い、各種サイトカインやリポポリサッカライド (LPS) の存在下に、播種した上で24時間培養した乳がん細胞株 (MRK-nu-1, MCF-7)、および正常乳腺上皮細胞 HMEC と共に一晩培養した。その後、細胞を十分にピペッティングして回収し、単球サブセットを上記の細胞膜免疫染色にて解析した。IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β 1, TNF- α は R&D systems あるいは PEPROTECH (Rocky Hill, NJ) より購入した。TGF- β タイプ1レセプターキナーゼ選択的阻害剤 SB431542 および LPS は SIGMA-ALDRICH より

購入した。

5. 定量的 PCR

乳癌細胞株と乳腺上皮細胞より TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて全 RNA を調整し, cDNA を合成した (Nakayama J Virol 2002). 定量的 PCR は, 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った. GAPDH の検出については TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) のキットをそのまま使い, また TGF- β 1 については, 以下のプライマーとプローブを合成した: プライマー, +5'-CCCTGCCCTACATTTG GA-3' と -5'-CCGGGTTATGCTGGTTGTACA-3'; プローブ, +5'-CCTGGACACGCAGTACAGCAAGGT-CC. プローブは, 蛍光レポーター色素である 6-FAM で 5'-末端を標識した. 相対的な遺伝子発現のレベルは, Sequence Detection System Software (Applied Biosystems) を用いて解析し, GAPDH で標準化した.

6. 血漿 TGF- β 1 の測定

血漿は採血後速やかに遠心分離し, -80°C に保存したものを測定に供した. TGF- β 1 の濃度は, Quantikine® Human TGF- β 1 測定キット (R&D systems) を用いて測定した.

7. 統計解析

統計的な解析は Student's *t*-test を用いて行い, *p* 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した.

結 果

今回実験に用いた健常者 20 症例, 乳がん患者 63 症例のプロファイルを表 2 にまとめた. 全員女性で, 年齢において統計学的有意差は認められなかった.

末梢血より PBMC を分離し, HLA-DR, CD14, CD16 を染色し, フローサイトメーターで解析を行った. セルサイズと HLA-DR 強度を用いて単球分画にゲートを合わせ, CD14 と CD16 の発現を指標に健常者と乳がん患者の間で単球サブセットを比較した. 図 1 には代表例を示す. 健常者と比べて, 乳がん患者では中間的サブセットの CD14^{high}CD16⁺ 単球の増加がみられた (図では健常者で 3.4%, 乳がん患者で 7.1%).

図 2 は単球の 3 つのサブセットの比率を健常者と病期ごとに分けた乳がん患者で比較した結果を示す. メジャーサブセット (CD14^{high}CD16⁻ 単球) (A) とマイナーサブセット (CD14^{low}CD16⁺ 単球) (B) の比率については健常者と患者の間で有意な差は見られなかった. しかし中間的な CD14^{high}CD16⁺ サブセット (C) の比率については, 病期 III/IV の患者では健常者

表 2

	健常者	乳癌患者
症例数	20	63
性別	女性のみ	女性のみ
年齢	48.3(±9.5)	60.5(±12.9)
病期		
	0	7
	I	10
	II	11
	III	10
	VI	25
腋窩リンパ節転移		
	あり	36
	なし	27
白血球数 (/L ⁻⁶)		5833(±1837)
単球数 (%)		6.7±1.8
CRP (mg/dl)		0.19(±0.3)
組織学的診断		
	乳頭腺管癌	10
	充実腺管癌	21
	硬癌	15
	非浸潤癌	7
	その他	10
ホルモンレセプター発現		
	陽性	40
	陰性	22
	不明	1
HER2 発現		
	陽性	32
	陰性	30
	不明	1

年齢, 白血球数, CRP 値の () 内数値は標準偏差を示す.

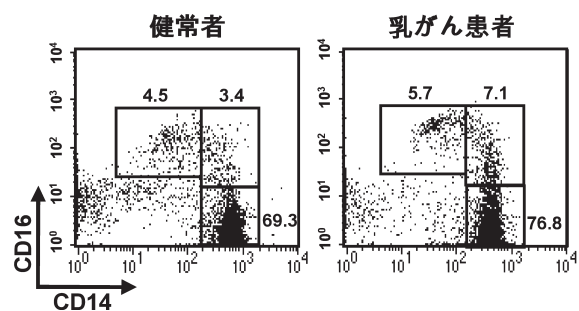


図 1 細胞表面抗原 CD14 と CD16 の発現を指標にした単球サブセット解析

健常者と乳がん患者の PBMC を抗 HLA-DR, 抗 CD14, 抗 CD16 で 3 重染色し, フローサイトメーターで解析を行った. セルサイズと HLA-DR 発現強度を指標に単球分画にゲートを合わせ, CD14 と CD16 の発現レベルを解析した. 健常者と比べて, 乳がん患者では CD14^{high}CD16⁺ 単球の増加がしばしば認められた (図では健常者で 3.4%, 乳がん患者で 7.1%).

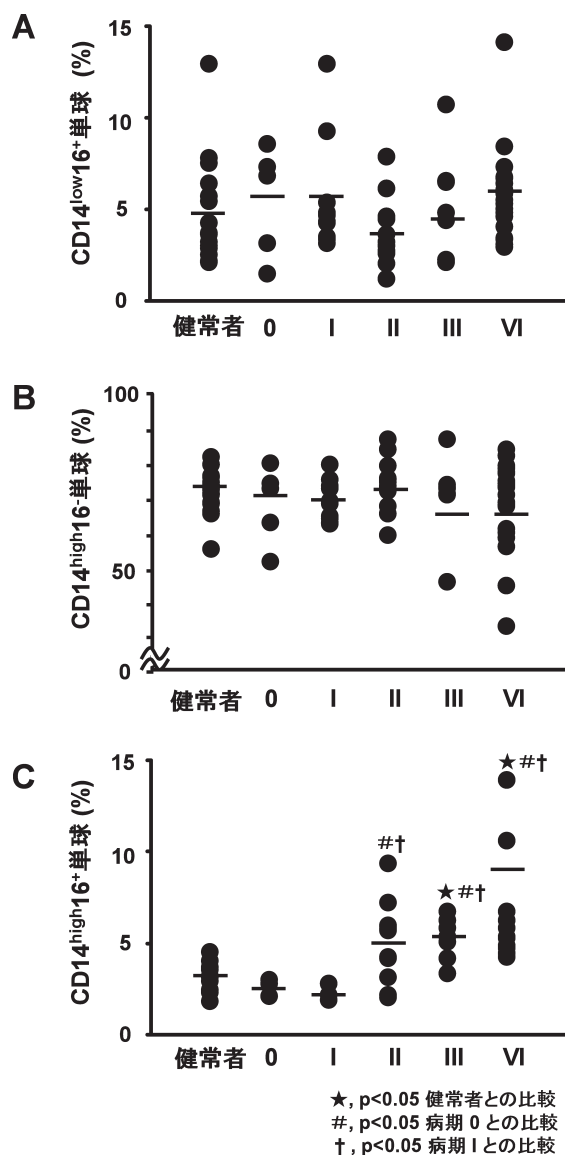


図2 健康者と病期ごとにグループ化した乳がん患者での3つの単球サブセットの比率
 (A) $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球, (B) $CD14^{low}CD16^{+}$ 単球, (C) $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球. 病期III/IVの患者では, $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の比率が健康者や病期0/I患者と比べて有意に増加している ($p<0.05$).

や病期0/Iの患者と比べて著明に増加しており, その差は有意であった ($p<0.05$). ただし, 病期0/Iの患者では健康者と比べて中間型の比率がわずかではあるが低下していた. しかしながら, 症例数が少ないこともあり, その意義は現在のところ不明である. 表3には各病期ごとの平均値, 標準偏差値, 各病期間の差の有意検定を示した.

病期IIの患者では, 腋窩リンパ節転移がある症例とない症例が存在する (表2). そこで, $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の比率が, 同一病期で腋窩リンパ節転移の有無により異なるかどうかを検討した. その結果,

表3

	p Value VS				
$CD14^{high}CD16^{+}$ 単球割合 (%)	健康者	病期 0	病期 I	病期 II	病期 III
健康者	3.63 (± 1.22)	—			
病期 0	2.59 (± 0.45)	0.022*	—		
病期 I	2.38 (± 0.46)	0.013*	0.573	—	
病期 II	4.81 (± 2.19)	0.078	0.006	0.003	—
病期 III	5.12 (± 1.24)	0.019	0.001	0.001	0.361
病期 IV	9.86 (± 1.89)	0.028	0.014	0.012	0.059
				0.068	

$CD14^{high}CD16^{+}$ 単球割合 (%) の () 内の数値は標準偏差を示す.

*; 健康者に比し有意に低下.

下線: $p<0.05$.

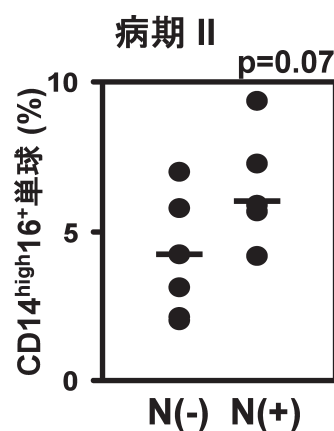


図3 病期II患者での腋窩リンパ節転移の有無と $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の比率の関係 N(-), 腋窩リンパ節転移なし; N(+), 腋窩リンパ節転移あり. N (+) 症例において $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の比率が高くなる傾向はあるが, 両群に有意差はない ($p=0.07$).

リンパ節転移陽性患者において有意差はないものの $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の比率が増加する傾向を認めた (図3).

乳がんには幾つかの腫瘍組織型が存在するが, 乳がんの組織型と $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の増加との間には相関関係は見られなかった (図4). また, HER2 やエストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PR) の発現は乳がんの予後に関与し, また治療方針決定においても重要な因子であるため, HER2 およびホルモンレセプターの発現と $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の比率との関係を検討したが, 有意な相関は認められなかった (図5).

乳がん患者で比率の増加がみられる $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球サブセットの形質をさらに明らかにする目的で, 単球の3つのサブセットでの代表的なケモカインレセプターの発現を健康者と乳がん患者で比較した. まず健康者のPBMCでの解析から (図6

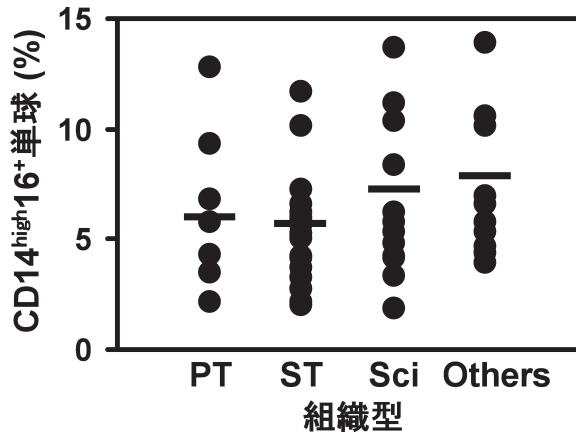


図4 乳がんの組織型と CD14^{high}CD16⁺ 単球の比率との関係
PT, 乳頭腺管がん; ST, 充実腺管がん; Sci, 硬がん; Others, その他. 乳がんの組織型と CD14^{high}CD16⁺ 単球の比率の間には相関関係は見られない.

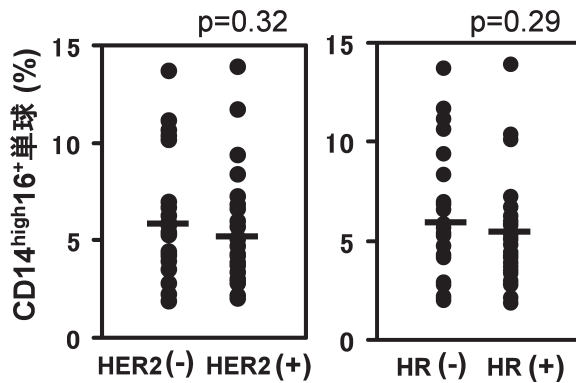


図5 HER2 およびホルモンレセプター (HR) 発現の有無と CD14^{high}CD16⁺ 単球の比率との関係
HER2 (-), HER2 発現陰性; HER2 (+), HER2 発現陽性. HR (-), エストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PR) 陰性; HR (+), エストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PR) 陽性. HER2 発現の有無あるいは HR 発現の有無と CD14^{high}CD16⁺ 単球の比率の間には有意な差は認められない (HER2, $p=0.32$; HR, $p=0.29$).

のようなケモカインレセプターの3つの単球サブセットでの発現パターンは乳がん患者でも変わらなかった (図6B).

慢性関節リウマチの患者では血液中の IL-10, M-CSF, TGF- β 1 の値が上昇しており, また患者由来 PBMC を IL-10, M-CSF あるいは TGF- β 1 存在下で培養すると, CD14^{high}CD16⁺ 単球の比率が増加することが報告されている⁶. そこで我々も健常者 PBMC を用いて, これらのサイトカインの単球サブセットに対する効果を検討した. 図7に代表的な結果を示す. PBMC を非付着性プレートで24時間培養すると, CD14^{high}CD16⁺ サブセットは培養のみでも増加した (4.1%から18.4%). しかし10 μ g/ml の TGF- β 1 添加するとその比率はさらに増加した (60.1%). この TGF- β 1 の効果は, その作用をブロックする TGF- β タイプ1レセプターキナーゼ選択的阻害剤 SB431542 (10 μ M) を加えると完全に抑えられた. 一方, IL-10 や M-CSF には CD14^{high}CD16⁺ サブセットを増加される効果は認められなかった (データ省略). さらに同様に, 炎症性サイトカインの IL-1, IL-6, TNF α , Th2 サイトカインの IL-4, IL-13, あるいは単球を非特異的に刺激する LPS を用いて検討したが, CD14^{high}CD16⁺ サブセットを増加される効果は認められなかった (データ省略). これらの結果から, 少なくとも健常者 PBMC では TGF- β 1 のみが CD14^{high}CD16⁺ サブセットを強力に増加させる作用を持つことが分かった.

乳がん患者末梢血での CD14^{high}CD16⁺ 単球サブセットの増加は, 乳がん細胞が産生するサイトカインなどの液性因子の影響である可能性が高い. そこで健常者 PBMC を乳がん細胞株 MRK-nu-1, MCF-7 および対照として正常乳腺上皮細胞 HMEC と共培養し, CD14^{high}CD16⁺ 単球サブセットの比率に対する影響を調べた (図8A). その結果, 培養そのものによる増加 (3.1%から33.8%) 以上の増加は HMEC との共培養では認められなかったが (25.8%), MRK-nu-1 あるいは MCF-7 との共培養では CD14^{high}CD16⁺ 単球の比率はさらに上昇した (60.4%および60.3%). そしてこの共培養による効果は TGF- β タイプ1レセプターキナーゼ選択的阻害剤の SB431542 を加えることによって, MRK-nu-1 の場合は完全に, また MCF-7 の場合も大幅に抑えられた. また定量的 PCR により, これらの乳がん細胞株は HMEC と比べて MRK-nu-1 では2倍, MCF-7 では5倍以上のレベルで TGF- β 1 を発現していることが確認された (図8B). これらの結果から, 少なくとも乳がん細胞株から産生される CD14^{high}CD16⁺ 単球を増加させる因子はおもに TGF- β 1 で

A), すでに報告されているように⁵, メジャーサブセットの CD14^{high}CD16⁻ 単球 (a) は CCR2⁺CX₃CR1^{low}, マイナーサブセットの CD14^{low}CD16⁺ 単球 (b) は CCR2⁻CX₃CR1^{high} であることが確認された. さらに CXCR4 については2つのサブセットの間でほぼ同じレベルの発現を示し, 一方 CXCR7 については CCR2 と同様にメジャーサブセット (a) で陽性, マイナーサブセット (b) で陰性であった. CD14^{high}CD16⁺ 単球 (c) はこれらのケモカインレセプターの発現についてほぼ中間型の発現レベルを示した. こ

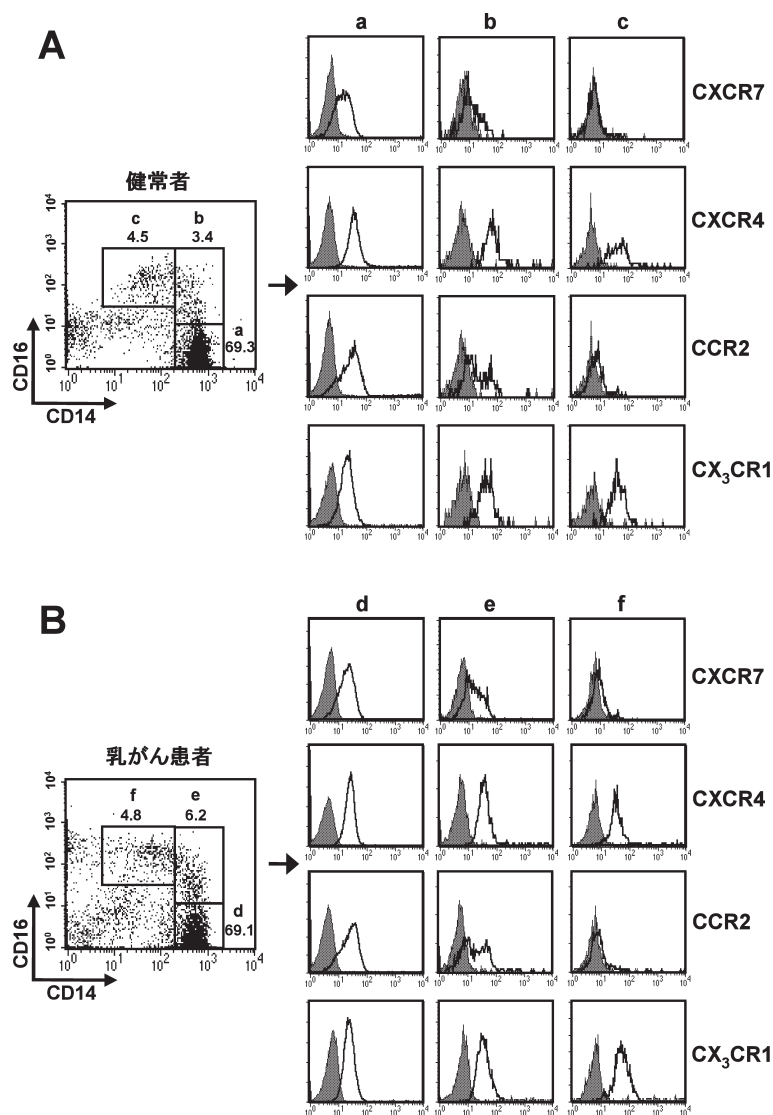


図6 3つの単球サブセットにおけるケモカインレセプターの発現解析
健康者(A)と乳がん患者(B)のPBMCを表1に示す順序で抗体染色し、フローサイトメーターで解析した。(a) CD14^{high}CD16⁻ 単球, (b) CD14^{high}CD16⁺ 単球, (c) CD14^{low}CD16⁺ 単球。

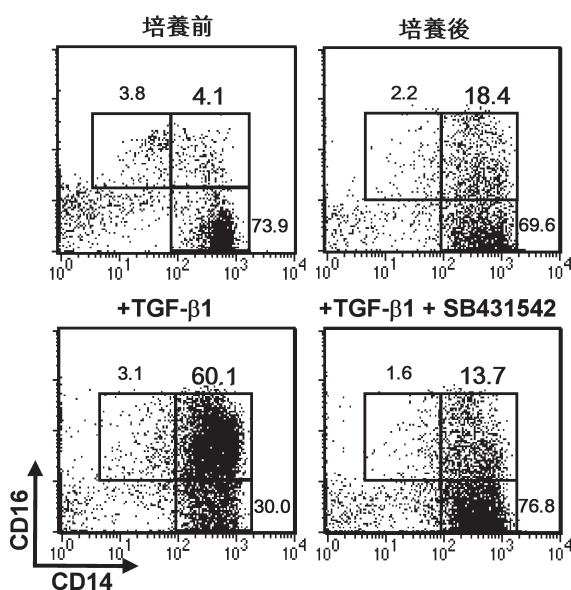
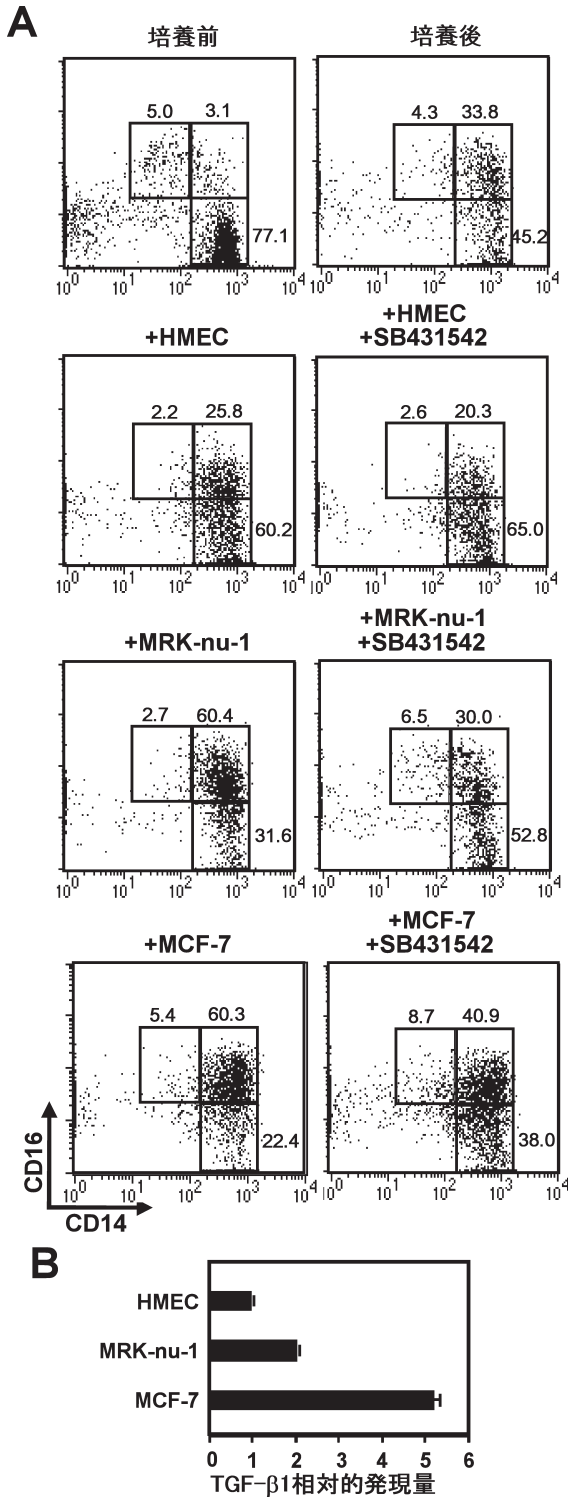


図7 TGF- β 1の単球サブセットに対する効果
健康者 PBMC を以下の条件で24時間培養し、3つの単球サブセットの比率を解析した。培養前, 培養前の PBMC; 培養後, 培養後の PBMC; +TGF- β 1, TGF- β 1を10 μ g/mlで添加して培養した PBMC; +TGF- β 1+SB432542, TGF- β 1を10 μ g/mlおよび TGF- β タイプ1レセプターキナーゼ選択的阻害剤 SB431542 を10 μ M 添加して培養した PBMC。

あることが示された。

乳がん患者では血漿 TGF- β 1 値が上昇していることが報告されている¹²。そこで、今回の症例についても血漿中の TGF- β 1 値を ELISA により測定した。その結果、今症例では進行した病期で血漿中の TGF- β 1 値が有意に上昇するという傾向は認められなかった (図 9)。



考 察

末梢血中の単球は細胞膜での CD14 と CD16 の発現レベルによって、CD14^{high}CD16⁻ サブセットと CD14^{low}CD16⁺ サブセットの 2 つに大きく分けられる¹³。前者は末梢血中の単球において 80~90% を占め、CCR1 や CCR2 などのケモカイン受容体を発現し、TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインによって活性化されて炎症組織に浸潤し、マクロファージへと分化する炎症性単球と考えられる¹⁴。一方、後者は CX₃CR1 を高レベルで発現し、炎症性サイトカインの TNF- α や IL-1 β を高レベルで産生するとともに強い抗原提示能を持ち^{13,15,16}、CX₃CL1 に反応して血管内皮を通過して組織内に移行する組織型単球と考えられている¹⁷。近年、サルコイドーシスや喘息といったアレルギー性疾患や、潰瘍性大腸炎・ク

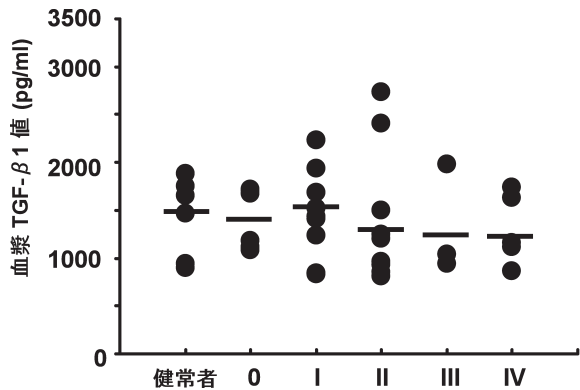


図 9 健康者および病期ごとにグループ化した乳がん患者の血漿中 TGF- β 1 値
血漿中の TGF- β 1 値の測定は ELISA キットを用いて行った。

図 8 共培養による CD14^{high}CD16⁺ 単球サブセットの比率の変化

(A)健康者 PBMC を正常乳腺上皮細胞 (HMEC) あるいは乳がん細胞株 (MRK-nu-1, MCF-7) と 24 時間共培養し、3 つの単球サブセットの比率を検討した。培養前、培養前の PBMC；培養後、一晚培養した PBMC；+HMEC, HMEC と共培養した PBMC；+HMEC+SB431542, HMEC との共培養に TGF- β タイプ 1 レセプターキナーゼ選択的阻害剤 SB431542 を 10 μ M 添加して培養した PBMC；+MRK-nu-1, MRK-nu-1 と共培養した PBMC；+MRK-nu-1+SB431542, MRK-nu-1 との共培養に SB431542 を 10 μ M 添加して培養した PBMC；+MCF-7, MCF-7 と共培養した PBMC；+MCF-7+SB431542, MCF-7 との共培養に SB431542 を 10 μ M 添加して培養した PBMC。(B) 定量的 PCR による TGF- β 1 の発現解析。HMEC, MRK-nu-1, MCF-7 での TGF- β 1 の相対的発現量を示す。

ローン病等の炎症性腸疾患, 多発性硬化症・慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患, 転移性の胃がん・大腸がんなどの悪性腫瘍, などの様々な疾患で中間に位置する $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球が増加することが報告されている⁶⁻¹⁰。このサブセットは, LPS 刺激によって免疫抑制作用を持つ IL-10 を高レベルで産生し, $CD14^{low}CD16^{+}$ 単球に比べ貪食作用は高いが, 抗原提示能は劣ることが報告されている¹⁸。以上により, $CD14^{high}CD16^{+}$ サブセットは免疫抑制的な役割を担うと考えられる。

今回, 我々は乳がん患者において単球サブセットを解析し, 病期の進行にともない $CD14^{high}CD16^{+}$ サブセットが有意に増加することを初めて見いだした(図1, 2, 表3)。また病期II症例における腋窩リンパ節転移との関係では, 有意差はないものの転移陽性例で増加傾向を認めた(図3)。ただし, 病期0/I の患者では健常者と比べて中間に位置するサブセットの比率がわずかではあるが低下していた。しかしながら, 症例数が少ないこともあり, この観察の意義についてはさらなる検討が必要と考えられる。

乳がんの60~70%はホルモン依存性であり, エストロゲンレセプター (ER) とプロゲステロンレセプター (PR) の2種のホルモンレセプターは, 細胞の増殖・分化・アポトーシスの誘導を介してホルモン依存性腫瘍の増殖に大きなかわりを持っている。また HER2 は, HER2/neu (c-erbB-2) がん遺伝子によりコードされる Epidermal Growth Factor Receptor ファミリーの細胞膜タンパク質であり, チロシンキナーゼ活性を有し, 上皮細胞の増殖・分化に関与する。乳がんの15~30%で HER2 の遺伝子増幅または蛋白過剰発現が確認され, 予後因子として, また分子標的薬トラスツズマブの標的分子としても重要である。そこで乳がんの組織型や腫瘍細胞でのホルモンレセプター発現, HER 発現と, $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の増加との関連性を検討したが, 相関は認められなかった(図4, 5)。

さらに我々は幾つかのケモカインレセプターについて単球での発現解析を行い, $CD14^{high}CD16^{+}$ サブセットは $CD14^{high}CD16^{-}$ サブセットと $CD14^{low}CD16^{+}$ サブセットのほぼ中間パターンを示すことを初めて明らかにした(図6A)。これは, 中間に位置するサブセットが, $CD14^{high}CD16^{-}$ サブセットから $CD14^{low}CD16^{+}$ サブセットへの移行期に相当する可能性を示唆している。さらにケモカインレセプターの発現パターンで見ると, 乳がん患者で増加する中間型サブセットは健常者に存在するそれと質的には変わらないことも示唆された(図6B)。

乳がんも含め, 各種の疾患で $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球

が増加する原因についてはいまだ十分解明されていない。しかしながら, 炎症性疾患, アレルギー性疾患, 自己免疫疾患, 感染症, 一部の転移性腫瘍などの多様な病態で共通して増加がみられることから, 病的状態に対する共通の宿主反応の結果と考えられる。さらに Kawanaka らは, 慢性関節リウマチ患者の血液中で増加している TGF- β 1, M-CSF, IL-10 などのサイトカインにより $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球が増加することを患者由来の PBMC を用いた実験から示している⁶。そこで我々も, 健常者由来 PBMC を用いてこれらのサイトカインの効果を検討した。その結果, 我々の実験でも TGF- β 1 に $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球を増加させる作用を認めた(図7)。しかしながら, M-CSF と IL-10 にはそのような作用は認められなかった。そのほか, 炎症性サイトカインの IL-1, IL-6, TNF α , Th2 サイトカインの IL-4, IL-13, あるいは LPS の効果についても検討したが, いずれも $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球を増加させる作用を示さなかった。さらに健常者由来 PBMC と乳がん細胞株との共培養によっても $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球が著明に増加し, その作用は TGF- β タイプ1レセプターキナーゼ選択的阻害剤である SB431542 添加により強く抑制された(図8)。このことから, 乳がん患者末梢血中の $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の増加には乳がん組織由来の TGF- β 1 が関与している可能性が示唆された。

TGF- β 1 は細胞の増殖と分化を制御するサイトカインであり, 乳がんにおいては肺転移や骨転移を促進することが報告されている¹⁹⁻²¹。また TGF- β 1 が腫瘍細胞から生産されることを示す報告もある²²。さらに乳がん患者の血液中では TGF- β 1 の値が有意に上昇しているという報告もある¹²。しかしながら, 今回の症例では血漿中の TGF- β 1 が乳がんの病期進行にともない上昇するという傾向は確認できなかった(図9)。そのため, 乳がん患者における $CD14^{high}CD16^{+}$ 単球の増加に関与するのは造血組織内での局所 TGF- β 1 レベルである可能性が考えられる。また, TGF- β 1 スーパーファミリーのアクチビンなども乳癌組織において高発現し, 骨転移に関わるという報告もあり, それらが中間型単球の増加に関与している可能性も考えられ, 今後の検討課題のひとつである^{23,24}。

本研究では, 乳がん患者において病期の進行に伴い血液中の単球サブセットのうち中間に位置する $CD14^{high}CD16^{+}$ サブセットが特異的に増加することを初めて明らかにし, $CD14^{high}CD16^{+}$ サブセットの増加は乳がん患者の病勢を推し量る一因子となることを明らかにした。また, 少なくとも乳がん

細胞株から産生される CD14^{high}CD16⁺ サブセットを増加させる因子として TGF- β 1 が挙げられることを明らかにした。現在、いまだ症例数は少ないが、手術の前後での単球サブセットの変化を解析しており、病巣切除後の症例では CD14^{high}CD16⁺ サブセットの比率が正常化する傾向を認めている。このことから、乳がん細胞あるいは腫瘍組織の存在そのものが、直接的あるいは間接的な作用を介して、血液中の CD14^{high}CD16⁺ サブセットの比率を増加させると考えられる。今後は、実際に乳がん患者の生体内で CD14^{high}CD16⁺ サブセットを増加させる因子の同定、また治療および再発・予後と CD14^{high}CD16⁺ 単球の増減との関わりなどについて、さらに検討していく予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究にご協力いただきました血液検体提供者の皆様へ深く感謝申し上げます。血液採取にご協力いただきました近畿大学医学部附属病院外科学乳腺部門の先生方、同腫瘍内科学鶴谷純司先生にも感謝申し上げます。また、いろいろ貴重な助言を頂きました共同分析機器室の蔵下伸治氏、近畿大学医学部細菌学教室のスタッフの方々に感謝申し上げます。

文 献

1. Fisher B, Wolmark N, Redmond C, Deutsch M, Fisher ER (1981) Findings from NSABP Protocol No. B-04: comparison of radical mastectomy with alternative treatments. II. The clinical and biologic significance of medial-central breast cancers. *Cancer* 48: 1863-1872
2. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6: 715-727
3. Rabinovich GA, Ilarregui JM (2009) Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol Rev* 230: 144-159
4. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H (2001) Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78: 57-110
5. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82
6. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T (2002) CD14⁺, CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 2578-2586
7. Okamoto H, Mizuno K, Horio T (2003) Circulating CD14⁺ CD16⁺ monocytes are expanded in sarcoidosis patients. *J Dermatol* 30: 503-509
8. Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81: 584-592
9. Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M (2009) Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin Immunol* 130: 338-346
10. Saionji K, Ohsaka A (2001) Expansion of CD4⁺CD16⁺ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol* 105: 21-26
11. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF (1995) CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85: 2910-2917
12. Grau AM, Wen W, Ramroopsingh DS, Gao YT, Zi J, Cai Q, Shu XO, Zheng W (2008) Circulating transforming growth factor-beta-1 and breast cancer prognosis: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res Treat* 12: 335-341
13. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69: 11-20
14. Martinez FO (2009) The transcriptome of human monocyte subsets begins to emerge. *J Biol* 8: 99
15. Szafarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M (2004) Antitumor response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation. *Exp Hematol* 32: 748-755
16. Belge KU, Dayyani F, Horelt A (2002) The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-3542
17. Ancuta P, Wang J, Gabuzda D (2006) CD16⁺ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J Leukoc Biol* 80: 1156-1164
18. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J (2008) Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152-159
19. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J (2008) TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 133: 66-77
20. Zhang Y, Ma B, Fan Q (2010) Mechanisms of breast cancer bone metastasis. *Cancer Lett* 292: 1-7
21. Juárez P, Guise TA (2010) TGF- β in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases. *Bone*
22. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL (1995) Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 222: 155-162
23. Reis FM, Luisi S, Carneiro MM, Cobbellis L, Federico M, Camargos AF, Petraglia F (2004) Activin, inhibin and the human breast. *Mol Cell Endoc* 225: 77-82
24. Leto G, Incorvaia L, Badalamenti G, Tumminello FM, Gebbia N, Flandina C, Crescimanno M, Rini G (2006)

Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer. Clin Exp Metas-

tasis 23 : 117-122