



Software-assisted morphometric and phenotype analyses of human peripheral blood monocyte-derived macrophages induced by a microenvironment model of human esophageal...

西尾, 真理

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6542号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006542>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Software-assisted morphometric and phenotype analyses of
human peripheral blood monocyte-derived macrophages
induced by a microenvironment model of
human esophageal squamous cell carcinoma

蛍光画像解析ソフトウェアを用いたヒト食道扁平上皮癌微小環境モデル誘導
ヒト末梢血単球由来マクロファージの形態計測と表現型解析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
病 理 学
(指導教員：横崎 宏 教授)

西 尾 真 理

背景と目的

癌組織内に浸潤するマクロファージは癌の進展に関与し、腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophage, TAM)と呼ばれる。マクロファージは炎症促進的な M1 型と炎症抑制的な M2 型に大別され、TAM は M2 様の形質を示す。CD163 や CD204 は M2 型マクロファージマーカーとして幅広く利用されている。申請者らは以前に食道扁平上皮癌臨床検体において、CD204 陽性 TAM の浸潤数が多いほど予後が悪くなることを示した。さらに、ヒト末梢血単球由来 M-CSF 誘導マクロファージに食道扁平上皮癌培養上清を添加して食道癌微小環境における TAM モデルを作成し、mRNA レベルで M2-TAM 様の形質を示すことを確認した。またこれに先立ち、ヒト白血病細胞株 THP-1 由来マクロファージに食道扁平上皮癌培養上清を添加した際、容器の底に接着して仮足を伸ばすことを指摘した。これらのことから、マクロファージが食道扁平上皮癌モデル中で形態と機能の両面で TAM としての形質を獲得しているのではないかと考え、その形態変化を詳細に定量評価する必要があると考えた。本研究では、上述のヒト末梢血単球由来マクロファージおよび TAM モデル細胞の蛍光免疫染色画像を撮影し、個々の細胞形態と M2 マーカータンパク蛍光強度を TissueQuest® ソフトウェアで半自動解析することにより、形態と機能の両面の経時的変化を可視化し、定量評価することを目的とした。

材料と方法

【食道癌 TAM モデルの蛍光免疫染色】

健常ボランティア 3 名の末梢血より MACS®細胞分離で CD14⁺単球を得、チャンバースライドグラスに M-CSF 存在下で 6 日間培養しマクロファージモデル細胞を得た。培地を 50%食道癌 TE 細胞株培養上清に交換しさらに 2 日間培養し、TAM モデル細胞を得た。分化の各段階のサンプルをメタノール固定し、汎マクロファージマーカー CD68 を陽性コントロールとし、M2 型マクロファージマーカー CD163 と CD204 の蛍光免疫染色を施行した。

【細胞の観察と蛍光二重免疫染色画像解析】

初めに透過光の細胞形態観察で簡易的に撮影したデジタル画像から、代表的な細胞 10 個の仮足を含めた長さを手動的に計測した。次に蛍光免疫染色を施したサンプルを顕微鏡で観察し、カメラ付属の cellSens® Standard ソフトウェアで標本を撮影した。各サンプルを 20 枚ずつ撮影し、ImageJ ソフトウェアで 3 色のチャンネルに分離した。この画像から TissueQuest® ソフトウェアにて自動的に個々の細胞の核と細胞質を検出し、個々の細胞の形態や CD163、CD204 の蛍光強度を計測した。Excel® に出力された生データを統計解析に供した。

結果

1. IL-4 または食道癌細胞株培養上清の添加により末梢血単球由来マクロファージの形態変化は促進される

末梢血単球由来マクロファージは容器の底に接着して仮足を伸ばす。これに IL-4 または TE 細胞株培養上清を加えて培養すると細胞質が大きくなる。透過光の画像で仮足を含めた細胞長を計測したところ、M-CSF を添加した時点で細胞長の増加を認めた ($P < 0.001$)。さらに IL-4 または TE 細胞株培養上清を加えると細胞長の増加を認めた ($P < 0.01$ or 0.001)。

2. 食道癌培養上清を添加したマクロファージは M2 マーカートンパク (CD163 および CD204) 蛍光強度が増加し、細胞の M2 マーカートンパク陽性率も上昇傾向となる

マクロファージに TE 細胞株培養上清を添加し、CD163 と CD204 の蛍光免疫染色画像を撮影・解析したところ、上清の添加によって個々の細胞の蛍光強度の平均値が増加した ($P < 0.05$ or 0.01)。個々の細胞の CD163 陽性率はマクロファージで 5%未満、上清添加後は 18-72%となった。CD204 陽性率はマクロファージで 7-13%、上清添加後は 23-69%となった。

3. TAM モデル細胞の細胞質面積と M2 マーカ (特に CD204) 蛍光強度の間には正の相関関係を認める

上清添加後の TAM モデル細胞につき、各細胞の細胞質面積と M2 マーカ蛍光強度の相関関係を検討したところ、CD163 ではほぼ無相関ないしごく弱い～弱い正の

相関を認めた ($r = 0.002-0.227$)。CD204 では弱い～中等度の正の相関を認めた ($r = 0.241-0.565$)。

4. 末梢血単球はマクロファージに分化するに従い伸長し、TAM モデルに分化するに従い大きさが増す

分化の各段階における細胞質と核の長径、短径、面積の平均値につき、3 名のボランティアから各 2 サンプルを採取し検討した。末梢血単球に M-CSF を添加して 2 日後と、マクロファージとなった 6 日後を比較すると、細胞質長径は短径と比しても有意に増加し ($P < 0.01$ or 0.001)、細胞質の伸長が示された。上清添加後の TAM モデルでは細胞質面積は増加し ($P < 0.001$)、細胞質長径、短径も増加していた。核の長径、短径、面積は M-CSF 添加にても著変なかったが ($P = 0.219-0.960$)、上清添加後は増加した ($P < 0.001$)。

5. 核および細胞質の面積と径、細胞質縦横比と核胞体比はマクロファージの TAM 様形態変化を反映する

個々の細胞の細胞質縦横比 (短径/長径) の平均値は末梢血単球に M-CSF を添加して 2 日後からマクロファージとなった 6 日後にかけ約 0.5 まで低下し ($P < 0.001$)、上清添加後には約 0.6 まで緩やかに回復した ($P < 0.05$)。核胞体比は長径比、面積比ともに分化の各段階で低下した ($P < 0.01$)。

考察

今回の実験で、*in vitro* 平面培養細胞の蛍光免疫染色画像を解析することにより、末梢血単球に M-CSF を添加したマクロファージモデル細胞で細胞質が伸長し、さらに食道扁平上皮癌細胞株培養上清を添加した TAM モデル細胞で核と細胞質の面積が大きくなり、これらが細胞質の縦横比と核胞体比に反映されることが明らかとなった。分化の各段階に応じて個々の細胞に発現する M2 マーカートンパク、特に CD204 の発現強度が細胞質面積と正の相関関係にあることも示された。興味深いことに、CD204 は上清添加前のマクロファージの一部でも発現が認められた。CD204 はマクロファージの成熟段階で CD163 より早期から活性化され、TAM へ分化した後も活性が保たれている可能性が示された。この手法は種々の蛍光免疫染色画像に

応用可能と考えられるが、再現性のあるデータを得るには染色や標本保管、撮影の条件を厳しく固定する必要があった。

結語

本実験系は食道癌微小環境モデルにおけるマクロファージの TAM 様形態変化の客観的解釈と定量評価を可能とし、ヒト食道癌組織中でマクロファージが TAM となる機序を解明するモデルの一つとして有用とみなされた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2568 号	氏 名	西 尾 真 理
論文題目 Title of Dissertation	Software-assisted morphometric and phenotype analyses of human peripheral blood monocyte-derived macrophages induced by a microenvironment model of human esophageal squamous cell carcinoma 蛍光画像解析ソフトウェアを用いた ヒト食道扁平上皮癌微小環境モデル誘導 ヒト末梢血単球由来マクロファージの形態計測と表現型解析		
審査委員 Examiner	主 査 林 祥 剛 Chief Examiner 副 査 掛 地 吉 弘 Vice-examiner 副 査 伊 藤 智 雄 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

癌組織内に浸潤するマクロファージは癌の進展に関与し、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) と呼ばれる。マクロファージは炎症促進的な M1 型と炎症抑制的な M2 型に大別され、TAM は M2 様の形質を示す。CD163 や CD204 は M2 型マクロファージマーカーとして幅広く利用されている。申請者らは以前に食道扁平上皮癌臨床検体において、CD204 陽性 TAM の浸潤数が多いほど予後が悪くなることを示した。さらに、ヒト末梢血単球由来 M-CSF 誘導マクロファージに食道扁平上皮癌培養上清を添加して食道癌微小環境における TAM モデルを作成し、mRNA レベルで M2-TAM 様の形質を示すことを確認した。またこれに先立ち、ヒト白血病細胞株 THP-1 由来マクロファージに食道扁平上皮癌培養上清を添加した際、容器の底に接着して仮足を伸ばすことを指摘した。これらのことから、マクロファージが食道扁平上皮癌モデル中で形態と機能の両面で TAM としての形質を獲得しているのではないかと考え、その形態変化を詳細に定量評価する必要があると考えた。申請者らの観察の結果、末梢血単球由来マクロファージは容器の底に接着して仮足を伸ばす。これに IL-4 または TE 細胞株培養上清を加えて培養すると細胞質が大きくなる。透過光の画像で仮足を含めた細胞長を計測したところ、M-CSF を添加した時点で細胞長の増加を認めた。さらに IL-4 または TE 細胞株培養上清を加えると細胞長の増加を認めた。マクロファージに TE 細胞株培養上清を添加し、CD163 と CD204 の蛍光免疫染色画像を撮影・解析したところ、上清の添加によって個々の細胞の蛍光強度の平均値が増加した。個々の細胞の CD163 陽性率はマクロファージで 5%未満、上清添加後は 18-72%となった。CD204 陽性率はマクロファージで 7-13%、上清添加後は 23-69%となった。上清添加後の TAM モデル細胞につき、各細胞の細胞質面積と M2 マーカー蛍光強度の相関関係を検討したところ、CD163 ではほぼ無相関ないしごく弱い～弱い正の相関を認めた。CD204 では弱い～中等度の正の相関を認めた。分化の各段階における細胞質と核の長径、短径、面積の平均値につき、3名のボランティアから各2サンプルを採取し検討した。末梢血単球に M-CSF を添加して2日後と、マクロファージとなった6日後を比較すると、細胞質長径は短径と比しても有意に増加し、細胞質の伸長が示された。上清添加後の TAM モデルでは細胞質面積は増加し、細胞質長径、短径も増加していた。核の長径、短径、面積は M-CSF 添加にても著変なかったが、上清添加後は増加した。個々の細胞の細胞質縦横比 (短径/長径) の平均値は末梢血単球に M-CSF を添加して2日後からマクロファージとなった6日後にかけ約 0.5 まで低下し、上清添加後には約 0.6 まで緩やかに回復した。核胞体比は長径比、面積比と

もに分化の各段階で低下した。今回の実験で、*in vitro* 平面培養細胞の蛍光免疫染色画像を解析することにより、末梢血単球に M-CSF を添加したマクロファージモデル細胞で細胞質が伸長し、さらに食道扁平上皮癌細胞株培養上清を添加した TAM モデル細胞で核と細胞質の面積が大きくなり、これらが細胞質の縦横比と核胞体比に反映されることが明らかとなった。分化の各段階に応じて個々の細胞に発現する M2 マーカータンパク、特に CD204 の発現強度が細胞質面積と正の相関関係にあることも示された。興味深いことに、CD204 は上清添加前のマクロファージの一部でも発現が認められた。CD204 はマクロファージの成熟段階で CD163 より早期から活性化され、TAM へ分化した後も活性が保たれている可能性が示された。この手法は種々の蛍光免疫染色画像に応用可能と考えられるが、再現性のあるデータを得るには染色や標本保管、撮影の条件を厳しく固定する必要がある。本実験系は食道癌微小環境モデルにおけるマクロファージの TAM 様形態変化の客観的解釈と定量評価を可能とし、ヒト食道癌組織中でマクロファージが TAM となる機序を解明するモデルの一つとして有用とみなされた。

本研究は、食道癌微小環境モデルについて、そのマクロファージが TAM になる機序について研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった TAM 様形態変化の客観的解釈と定量評価について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）学位を得る資格があると認める。