

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14950

研究課題名(和文) 神経ペプチドCGRPによる免疫系を介した癌微小環境制御軸の提唱

研究課題名(英文) Advocacy of cancer microenvironment control axis via immune system by CGRP

研究代表者

辻川 和丈 (TSUJIKAWA, KAZUTAKE)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10207376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：CGRPは37アミノ酸からなり、CGRPとCGRPの2つのアイソフォームが存在する神経ペプチドである。その受容体はRAMP1とCLRのヘテロ2量体で構成される。CGRP受容体はマクロファージなど免疫細胞にも発現していることが明らかになっている。そこで本研究では、CGRPを介した神経系による免疫系の制御が腫瘍形成にかかわる機能を解析することとした。その結果、CGRPがマクロファージの遊走やIL-12産生を抑制し、腫瘍形成にかかわっていることを明らかとした。これらの結果は、CGRPを介した神経免疫-腫瘍微小環境制御軸の存在を提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：Calcitonin gene-related peptide (CGRP), a 37-amino acid neuropeptide, is one of the potent modulators connecting the nervous and immune systems. There are two isoforms of CGRP: α and β . Both CGRP isoforms bind to a specific receptor composed of receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) and calcitonin receptor-like receptor (CLR). CGRP receptors are expressed on immune cells, and CGRP modulates immune responses through its receptor binding. In this study, regulation of tumor formation through the immune system by CGRP was examined. CGRP was found to regulate macrophage functions such as migration and IL-12 production, resulting to suppression of tumor formation. These results indicate the existence of regulation axis of cancer-immune system-nervous system.

研究分野：生物系薬学

キーワード：CGRP受容体 CGRP RAMP1 癌 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の発生は免疫系により抑制され、その免疫系の認識から回避できた癌細胞が癌組織を構築できる。よって免疫系を活性化し、癌細胞の認識と排除を促進できれば癌は治療可能となる。現在これらの研究が世界的に展開され、抗体医薬をはじめペプチドワクチン等の癌治療薬も開発されている。一方、免疫系は独立した統御系ではなく、神経系、特に知覚神経系の神経ペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド CGRP によって巧妙に制御されていることを申請者は明らかにしてきた。例えば CGRP がヘルパー T(Th)細胞やマクロファージに発現する CGRP 受容体を介して、Th 細胞を Th1 から Th2 へ偏倚させ、制御性 T 細胞(Treg)の機能を促進し、Th17 細胞を活性化させ、マクロファージを向腫瘍性の M2 型へと分化させることを報告した。また一方、癌の本態解明を目指した研究も行い、既に癌臨床検体を用いた遺伝子発現と機能解析、その創薬応用研究なども進めている。この癌研究において固形癌細胞に CGRP 受容体 mRNA の存在を認めた。これらの研究基盤から、神経系 免疫系を介して癌組織は微小環境を構成しており、それらの詳細な解析研究が癌の発症や悪性化機序の解明、さらには新たな癌治療戦略において着すべき挑戦的萌芽課題であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

癌はわが国における死亡者数のトップを占める疾患である。この癌の発症や悪性化機序の解明、さらには癌治療戦略において、免疫担当細胞の機能や活性の制御機構解明が重要である。一方、免疫系は神経系と巧妙にクロストークしている証拠が蓄積されてきた。よって、癌の発症や悪性化機序の解明、さらには癌治療戦略において、神経系 免疫系を介した癌微小環境の統合的解析研究を進めることが必須と考えた。そこで本研究は、申請者がこれまで蓄積してきた、神経ペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) による免疫系制御、癌臨床検体を用いた遺伝子の発現とその機能の解析、遺伝子改変動物の作製と応用、の成果と技術を統合させることにより、CGRP 免疫系癌微小環境制御軸の存在を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス肺がん細胞 3LL の皮下移植モデル

6-10 週齢雄性的野生型マウス (WT)、CGRP 受容体単体ユニットである receptor activity-modifying protein-1 (RAMP1) KO マウス (KO) にマウス肺がん細胞 3LL を 3.0×10^4 cells イソフルラン麻酔下で背部皮下移植し、この日を Day 0 とした。Day 0、3、6、9、12、15、18 にマウスの体重と腫

瘍体積を測定した。腫瘍体積は (腫瘍の長径 (mm)) * (腫瘍の短径 (mm)) * (腫瘍の高さ (mm)) * 0.5236 にて算出した。また、移植後 15 日目または 18 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。

(2) 腫瘍組織へ浸潤したマクロファージのフローサイトメトリー解析

腫瘍組織を RPMI1640-2%FCS で満たした 6 well plate に摘出した。腫瘍重量を測定した後、コラゲナーゼを加え、37 にて 30 分間攪拌した。コラゲナーゼ処理溶液をメッシュ (42 μ m) に通し、溶血操作後セルカウントを行った。その後マウス IgG 抗体に懸濁し Fc γ 受容体のブロッキングを行った。洗浄後、ビオチン化抗 F4/80 抗体 (1:400) に懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。再び洗浄後、Allophycocyanin (APC) 標識 streptavidine (1:400)、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 mouse CD11b 抗体 (1:400)、Phycoerythrin (PE) 標識 mouse CD11c 抗体 (1:400) に懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。反応後メッシュ (42 μ m) に通して、FACS Aria II (Becton Dickinson 社製) でマクロファージのポピュレーションを解析した。

(3) Born Marrow-derived Macrophages (BMMs) の分化誘導

マウスの下肢体から骨髓細胞を回収した。その骨髓細胞を 10 ng/mL mouse M-MCS を添加した培地で培養し、3 日後に 10 ng/mL mouse M-MCS を添加した培地を追加し、6 日目の細胞集団を BMM として以後の実験に使用した。なお、フローサイトメーターにより、マクロファージのマーカー分子である F4/80 と CD11b を 90%以上発現していることを確認した。

(4) BMM の Transwell による遊走アッセイ

Transwell インサートに 2×10^5 cells / well となるように BMM を播種した。17 時間、CO₂ インキュベーターにて静置後、インサートを 4%パラホルムアルデヒド処理し、メタノール固定した。0.1% クリスタルバイオレット溶液で染色後、顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE) にてハイブリットセルカウントを行った。

(5) Born Marrow-derived Dendritic Cells (BMDCs) の分化誘導

マウス大腿骨と脛骨から骨髓細胞を回収し、5% GM-CSF を添加した培地中で、37、5% CO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始 3 日目に 5% GM-CSF を添加し、6、8 日目に 5% GM-CSF を添加した培地を交換した。10 日目の細胞集団を BMDC として実験に使用した。なおフローサイトメーターにより、樹状細胞と M1 マクロファージのマーカー

一分子である CD11c を 70%以上発現していることを確認した。

(6) BMDC 培養上清の IL-12 の測定 (ELISA)

前日に 96well ELISA プレートに Coating Buffer で調製した一次抗体 80 μ L (1:500) をコートした。翌日洗浄後、standard として mouse IL-12 recombinant の原液を 2 段階希釈したもの、また sample をそれぞれ 80 μ L/well で添加し、90 分間湿箱内でインキュベートした。ビオチン化二次抗体 80 μ L (1:500) を添加してインキュベート後、horseradish peroxidase 標識 Streptavidine を添加しインキュベートした。ABTS peroxidase substrate system を用いて室温で発色させ、OD450nm の吸光度を測定した。

(7) 統計処理

有意差検定は Student's t-test を用いて行い、有意水準は 5%とした。

4. 研究成果

CGRP の受容体は RAMP1 と Calcitonin receptor-like receptor (CLR) のヘテロ 2 量体で構成されている。そこで CGRP の作用を検討するために、CGRP 受容体特異的サブユニットである RAMP1 欠損マウスを使用した。

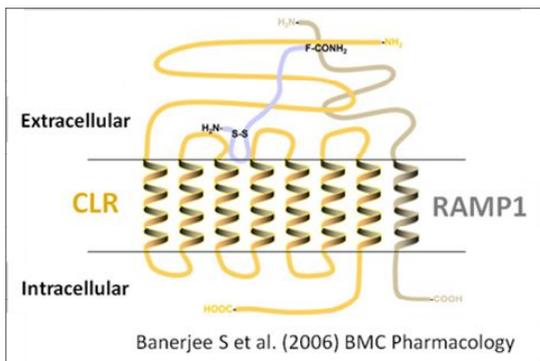


図 1 . CGRP 受容体の模式図

(1) 野生型マウスと RAMP1 欠損マウスにおける腫瘍形成能の比較検討

マウス肺がん細胞 3LL を皮下移植した際の腫瘍形成能を野生型マウスと RAMP1 欠損マウスで比較検討した。3LL 細胞移植 15 日目

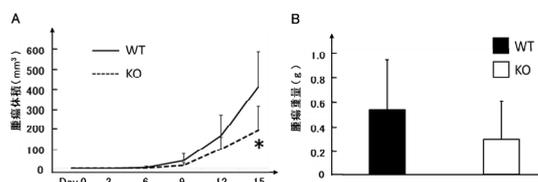


図 2 . 野生型 (WT) マウスと RAMP1 マウスの 3LL 細胞腫瘍形成の比較

A: 経時的な腫瘍体積 (mm³) の変化

B: 移植後 15 日目における腫瘍重量 (g)

Data show means \pm S. D, n = 6, *p < 0.05 vs. WT

に、RAMP1 欠損マウスにおいて腫瘍体積増加の有意な抑制が見られた。また腫瘍重量についても RAMP1 欠損マウスにおいて減少傾向が見られた (図 2)。これらの結果は腫瘍形成に CGRP が RAMP1 と CLR から構成される CGRP 受容体を介して何らかの作用を持っていることが考えられる。

(2) BMM の CCL2 による遊走に対する CGRP の作用

担癌 RAMP1 KO マウスではマクロファージのバランスが M1 型に偏倚し、腫瘍へのマクロファージの浸潤が亢進している傾向が見出されている。M1 マクロファージは抗腫瘍免疫に重要であり、M1 マクロファージの腫瘍への浸潤が亢進しているほど腫瘍形成は抑制されることが知られている。このマクロファージのポピュレーションの変化が、RAMP1 KO マウスにおける腫瘍体積増加の抑制につながっているのではないかと考えた。そこで、マクロファージの腫瘍への浸潤、または浸潤した炎症性マクロファージの機能に対する CGRP の作用を検討した。

まず CGRP の BMM の CCL2 による遊走に対する作用を検討した。その結果、 β CGRP の添加により BMM の CCL2 による遊走が有意に抑制された (図 3)。データには示さないが、RAMP1 KO マウスの腫瘍内へのマクロファージの遊走が抑制されていることから、RAMP1 KO マウスのマクロファージにおいては CCL2-CCR2 経路の抑制が関与している可能性が示唆された。またここで、 α CGRP と β CGRP で異なる作用が見られたが、先行研究における CCR2 発現抑制が β CGRP でわずかに強いことが起因している可能性が考えられた。

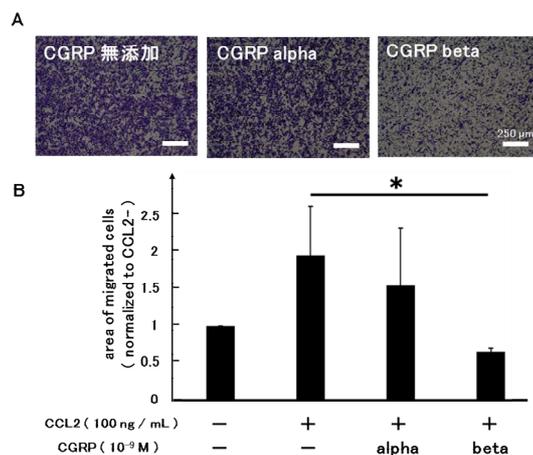


図 3 . BMM の CCL2 による遊走に対する CGRP の作用

A: Transwell のインサートの顕微鏡写真

B: 遊走した BMM を CV 染色した際の面積のコントロールに対する相対値

Data show means \pm S. D. n = 3, *p < 0.05 vs.

(3) 炎症性マクロファージの IL-12 産生に

対する CGRP の作用

炎症性マクロファージである M1 マクロファージの腫瘍内への浸潤が亢進している傾向にあったことから、浸潤してきたマクロファージの状態が野生型と RAMP1 KO マウスとで異なっているのかを調べるため、マクロファージの機能に対する CGRP の作用を検討した。ここでは M1 マクロファージの *in vitro* モデルである BMDC の IL-12 産生に対する CGRP の作用を検討した。

その結果、BMDC の IL-12 産生は CGRP、CGRP のいずれを添加した際にも有意に抑制された(図 4)。また RAMP1 KO マウス由来の BMDC ではその IL-12 産生の抑制の回復が見られたことから CGRP は RAMP1 受容体を介して BMDC の IL-12 産生を抑制したことが示唆された。

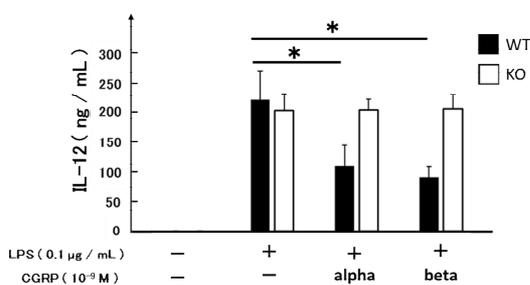


図 4 . BMDC の IL-12 産生に対する CGRP の作用

Data show means ± S.D. n = 3, *p < 0.05 vs. CGRP control .

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

谷 春佳 野村 加奈子 大川 勝也 上田 裕子 長谷 拓明 深田 宗一郎 辻川 和文
CGRP を介した神経 - 免疫系 - 癌制御系の検証

日本薬学会第 137 年会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[https://sites . google . com/site/xibaoshengli/home](https://sites.google.com/site/xibaoshengli/home)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻川 和文 (TSUJIKAWA Kazutake)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号 : 10207376