

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18406

研究課題名(和文) CCL3-CCR5を介したがん微小環境制御による、がん悪性化進展治療へ向けた研究

研究課題名(英文) A possible novel anti-cancer treatment targeting CCL3-CCR5 interaction

研究代表者

佐々木 宗一郎 (Sasaki, Soichiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：50583473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性ケモカインCCL3を介して腫瘍部位に集積したCCR5発現線維芽細胞が、増殖因子を産生し、大腸がん発症進展過程に重要な役割を果たしていることをこれまでに明らかとしてきた。この結果に基づき、CCR5を標的分子とした大腸がん治療法の可能性を検討した。マウス大腸がん細胞株またはヒト大腸がん細胞株をマウス盲腸壁への同所接種後に、CCR5阻害剤であるマラビロックを投与すると、腫瘍部位への線維芽細胞の集積ならびに線維芽細胞による上皮増殖因子(EGF)の発現の減弱とともに、腫瘍形成が抑制された。以上の結果から、CCL3-CCR5系を標的とした大腸がん治療法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that locally-produced CCL3 induce the intra-tumoral accumulation of cancer-associated fibroblast (CAFs), which express CCR5, a specific receptor for CCL3. Based on these observations, we examined the effect of a CCR5 antagonist, maraviroc, on tumor growth arising from intra-cecal injection of either a mouse or a human colon cancer cell line. Oral administration of maraviroc after tumor injection decreased tumor sizes with reductions in numbers of CAFs and epidermal growth factor (EGF) expression by CAFs, but with few effects on leukocyte infiltration. Consistently, CCL3 in vitro induced fibroblasts to migrate and to express EGF, and maraviroc reduced these in vitro effects of CCL3 on fibroblasts. These observations would indicate the potential of maraviroc or other CCR5 inhibitors as a novel therapeutic modality for colon cancer, by targeting the CCL3-CCR5 interaction.

研究分野：がん微小環境

キーワード：大腸がん CCR5 マラビロック

1. 研究開始当初の背景

マウスに発がん剤であるアゾキシメタン (AOM) を投与後にデキストラン硫酸 (DSS) 溶液を反復飲用させると、重度の腸炎を発症後に多発性の大腸腫瘍が発症することから、慢性腸炎関連大腸発がん実験モデルとして汎用されている。この AOM/DSS モデルの発がん過程で、大腸組織へ浸潤する炎症細胞の重要性について我々は明らかとしてきた。(J Clin Invest., 2008; 118(2): 560-70, Cancer Res., 2009; 69(19): 7884-92)。

大腸組織で産生亢進しているケモカイン CCL3 が、炎症細胞以外に、CCL3 受容体である CCR5 を発現している線維芽細胞の大腸組織への集積を誘導するとともに、線維芽細胞による増殖因子であるヘパリン結合性上皮増殖因子 (HB-EGF) の産生を誘導することで、大腸がん発症に関与していることを明らかとした (Int. J Cancer, 135: 1297-1306, 2014)。すなわち、CCL3-CCR5 系による腫瘍関連性線維芽細胞 (CAF) の集積・活性化が大腸がんの進展過程に関与しており、CCL3-CCR5 が大腸がんの治療標的分子となりうる可能性を示唆している。

ヒト大腸がんとは異なり、AOM/DSS モデルでは、発症したがん浸潤は生じない。そこで、浸潤過程での CCL3-CCR5 系の役割を解明するために、マウス大腸がん細胞株 colon26 を盲腸壁に直接接種する実験を行った。その結果、CCR5 を欠損したマウスでは、野生型マウスと比較して、腫瘍内への線維芽細胞の集積減少とともに腫瘍容量が減弱した。したがって、局所浸潤をとまなう進行大腸がんの増殖過程においても、CCL3-CCR5 系が CAF の動員を制御することで、腫瘍の増殖・浸潤過程に関与している可能性が示唆された。

しかし、白血球・血管内皮細胞などの他の細胞の関与、CAF の動態については詳細な解析はなされていない。がん微小環境の重要な構成成分である CAF の起源、がん組織への動員機構、さらにはがん組織での活性化機構については、従来の研究からは不明な点が多かった。

以上の点を踏まえて、CCL3-CCR5 系による CAF の制御という自身の成果に基づき、CCL3-CCR5 系を切り口に、CAF の動員・活性化のメカニズムを詳細に解明することで、新たな抗がん治療戦略の基盤を得ることを目指して、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、炎症関連大腸がん発症モデルにおいて、これまでに我々が報告してきたケモカイン CCL3 とそのレセプター CCR5 を介した線維芽細胞の集積過程に着目し、大腸がん治療における分子標的としての CCL3-CCR5 系の可能性の検討を目的とした。さらに腫瘍内に集積している線維芽細胞に

についても解析を進め、がんの悪性進展・転移過程における CAF の亜集団の役割を解析し、がん病態成立過程における CAF の役割を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

- (1) マウス大腸がん細胞株 colon26 の盲腸内同所接種モデルによる、腫瘍形成モデルにおける腫瘍形成に対する CCL3-CCR5 系の関与の詳細な検討

野生型マウス・CCR5 欠損マウスにおける、腫瘍接種後の腫瘍形成能を比較するとともに、白血球や血管内皮細胞などの腫瘍内の構成細胞について免疫組織学的方法とフローサイトメトリー解析により検討した。

経時的に採取した腫瘍より mRNA を抽出し、腫瘍成長因子や、浸潤白血球または線維芽細胞関連分子を中心に qRT-PCR 法によって解析を行った。

- (2) 腫瘍形成過程に CCL3-CCR5 によって集積する線維芽細胞の解析

野生型マウス・CCR5 欠損マウスに腫瘍を接種し、形成された腫瘍内の線維芽細胞 (CAF) の亜集団を免疫組織学的方法とフローサイトメトリー法による解析により検討した。

腫瘍細胞に対し CCL3 を *in vitro* で添加し、その有無による腫瘍細胞の浸潤能を検討した。さらに、腫瘍組織から分取した CAF に対し CCL3 を添加し、CCL3 の EGF 産生能への影響を検討した。

- (3) CCR5 抑制による、腫瘍形成過程に対する効果の検討

野生型マウスに腫瘍接種後、CCR5 受容体の拮抗分子であるマラビロックを経口投与し、腫瘍形成能と白血球浸潤や、血管内皮細胞などに対する影響を中心に検討した。

ヒト大腸がん細胞株 (KM12C) を免疫不全マウスに腫瘍接種後、CCR5 受容体の拮抗分子であるマラビロックを経口投与し、腫瘍形成能と白血球浸潤や、血管内皮細胞などに対する影響を中心に検討した。

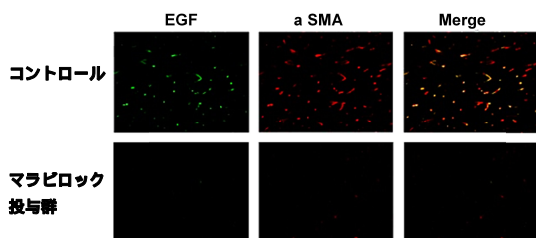
4. 研究成果

(1) マウス大腸がん細胞株 colon26 を野生型マウスの盲腸内に同所接種後に形成された腫瘍では、CCL3 ならびにその受容体である CCR5 の発現が上昇していた。腫瘍接種 15 日目における腫瘍の容量は、野生型マウスと比較して、CCR5 欠損マウスでは顕著に減少していた。さらに、野生型マウスにおいては、腫瘍の増大とともに、腫瘍内への好中球とマクロファージの浸潤が増加した一方で、T 細胞の浸潤はほとんど変化しなかった。フローサイトメトリー法による解析の結果、CCL3 の主要な産生細胞は浸潤した好中球とマクロファージであり、CCR5 は主に α -smooth muscle actin (SMA) 陽性の線維芽細胞(CAF)に発現していることが明らかになった。この結果に合致し、CCL3 の発現に伴って腫瘍内への線維芽細胞の集積増加がみられ、CCR5 欠損マウスではその増加が減弱していた。以上の結果より、同所接種モデルでは、腫瘍内に浸潤した白血球から産生される CCL3 が CCR5 を発現した線維芽細胞を腫瘍内に集積させることが、腫瘍の増加と密接に関連している可能性が示唆された。

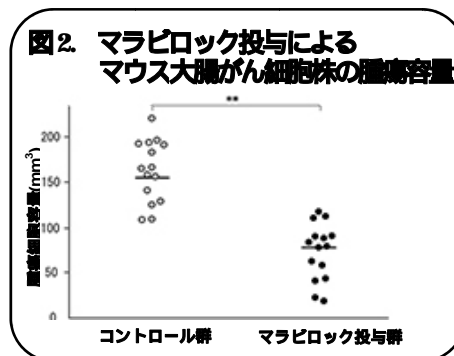
(2) 二重蛍光免疫染色の結果、形成された腫瘍組織に集積している CAF マーカーである α SMA を発現した線維芽細胞は、選択的に EGF を発現していることが明らかとなった(図 1)。さらに CCL3 は、in vitro において線維芽細胞の遊走ならびに EGF 産生能を亢進させた。CCL3-CCR5 系を介した線維芽細胞が動員されるといふ我々の以前の報告(J Immunol. 2008; 181:6384-93)とも一致することから、同所接種モデルにおいても CCL3-CCR5 系は CAF の動員・活性化に密接に関連している可能性が示唆された。

さらに、野生型マウスと CCR5 欠損マウスを用いて腫瘍内の CAF について既報の CAF マーカーの発現解析を行った。しかし、特定の CAF の亜集団の増減は確認されず、本モデルに関連している CAF の亜集団の特定には至らなかった。

図 1. 腫瘍内の EGF 発現細胞の同定



(3) マウス大腸がん細胞株 colon26 を同所接種後の野生型マウスに CCR5 阻害剤であるマラビロックを投与すると、線維芽細胞の集積・EGF 発現が軽減されるとともに、腫瘍容量が減少した(図 2)。しかし、好中球やマクロファージなどの炎症性細胞数、制御性 T 細胞数、血管新生には変化が認められなかった。この結果より、マラビロックによる腫瘍抑制効果は炎症性細胞の浸潤抑制によるものではなく、線維芽細胞の集積減少に伴う EGF 産生の発現減少に依存したものである可能性が示唆された。



免疫不全マウスにヒト大腸がん細胞株 KM12C を盲腸内に同所接種後に、マラビロックを投与すると、マウス大腸がん細胞株使用時と同様に、線維芽細胞の集積減少、EGF 産生の発現減少に伴い、腫瘍容量も有意に減弱した。この結果から、ヒト大腸がん細胞株接種時においても、マウス大腸がん細胞株接種時と同様に、CCL3-CCR5 系を介した CAF の大腸がんの増殖促進機構への関与とともに、CCL3-CCR5 系を標的とした大腸がん治療法の可能性が示唆された。

以上の結果は、Oncotarget 誌にすでに報告した(発表論文 1)。本論文は、腫瘍形成において炎症性細胞の浸潤のみならず線維芽細胞の集積が必須であることを、ヒト細胞株を用いて証明した論文として世界的に注目されている。本研究成果は、腫瘍細胞を直接的な標的とせず、がん微小環境の構成成分である線維芽細胞を標的とする、我々が提唱した新しい抗がん治療概念がヒトでも応用可能であることを証明したものである。

我々が今回使用したマラビロックは HIV の治療薬としてすでに臨床応用されている。今回証明した CCR5 阻害剤であるマラビロックを始めとする既存の薬剤を用いた新たな治療法の発見は、新規薬剤開発に生じる時間的なロスなしに新たながん治療法の開発につながる可能性が期待される。

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5件)

Tanabe Y, Sasaki S, Mukaida N, Baba T.
Blockade of the chemokine receptor,
CCR5, reduces the growth of
orthotopically injected colon cancer cells
via limiting cancer-associated fibroblast
accumulation.
Oncotarget. 2016 Jul
26;7(30):48335-48345. 査読有 doi:
10.18632/oncotarget.10227.

Sasaki S, Baba T, Nishimura T,
Hayakawa Y, Hashimoto S, Gotoh N,
Mukaida N.
Essential roles of the interaction between
cancer cell-derived chemokine, CCL4,
and intra-bone CCR5-expressing
fibroblasts in breast cancer bone
metastasis.
Cancer Lett. 2016 Aug 1; 378(1): 23-32.
査読有 doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.005.

〔学会発表〕(計10件)

佐々木宗一郎、馬場智久、向田直史
乳癌骨転移における腫瘍由来 CCL4 と骨
内 CCR5 発現線維芽細胞の相互作用
2016年11月11日、第19回癌と骨病変
研究会(東京)

Tanabe Y, Sasaki S, Baba T, and
Mukaida N.
Blockade of a chemokine receptor, CCR5,
reduces colon cancer growth by
inhibiting cancer-associated fibroblast.
2016年10月7日、第75回日本免疫学会、
パシフィコ横浜(神奈川)

Sasaki S, Baba T, and Mukaida N.
Breast cancer cells derived
inflammatory chemokine, CCL4, drive
the bone metastasis in a paracrine
manner.
2016年10月7日、第75回日本免疫学会、
パシフィコ横浜(神奈川)

向田直史、田辺和、佐々木宗一郎
がん関連線維芽細胞(CAF)を標的とする
治療法の可能性。
2016年5月31日、第20回日本がん分子
標的学会学術集会(別府)

〔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

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/bunseisetai/JapContent.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 宗一郎 (SASAKI SOICHIRO)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 50583473

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし