

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09374

研究課題名(和文)大腸癌における腫瘍関連マクロファージの発現解析と治療への応用

研究課題名(英文) Expression analysis of tumor-associated macrophages and application of treatment for colorectal cancer

研究代表者

稲垣 聡子 (Inagaki, Satoko)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：00768781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、大腸癌の微小環境における腫瘍関連マクロファージ(TAM)の発現プロファイル解析により、TAMの腫瘍の増殖、浸潤への関与を解明することであった。しかし、大腸癌組織からTAMを分離する過程に困難が生じた。そのため、従来切除、保存されていた大腸癌、大腸前癌病変の標本を用いて、免疫組織化学による蛋白発現の解析を行った。TAMの腫瘍への浸潤様式と臨床病理学的特徴との関連について予備的検討を行ったが、相関は得られなかった。副次的に、まれな前癌病変の一つである大腸鋸歯状腺腫において、高頻度にカテニンの核内集積が確認され、鋸歯状腺腫の形成におけるWntシグナル経路の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的である、腫瘍関連マクロファージの大腸癌の増殖、浸潤に果たす役割の解明を果たすことはできなかった。しかし、副次的に、大腸鋸歯状腺腫において高頻度にカテニンの核内集積が確認され、Wntシグナル経路の亢進が発癌に寄与している可能性が示された。本研究の結果から、従来提唱されてきた管状腺腫、無茎性鋸歯状腺腫を前癌病変とする発癌経路とは異なる第3の大腸発癌経路の存在が示された。本研究の結果は、大腸鋸歯状腺腫を前癌病変とする大腸癌に対する、Wntシグナル経路を標的とした新たな分子標的治療の開発に資することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the involvement of tumor-associated macrophages (TAM) in the microenvironment of colorectal cancer by analyzing these expression profiles. However, dissociation of TAM from colorectal cancer tissue was unsuccessful. Instead, protein expression study was performed in advanced colorectal cancer and colorectal premalignant lesions by immunohistochemistry. However, association between invasion of TAM and clinicopathological factors was not shown. Alternatively, the prevalence of abnormal nuclear -catenin accumulation was shown to be significantly higher in traditional serrated adenomas (TSAs) than sessile serrated adenomas by immunohistochemistry, indicating the significance of Wnt signaling pathway activation in the carcinogenesis of TSAs.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍細胞だけでなく、その周囲の間質が腫瘍細胞との相互作用により腫瘍増殖に関与する、癌微小環境が注目されてきた。腫瘍の間質は癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast, CAF)、筋線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞やマクロファージを含む炎症細胞からなる。中でも、マクロファージは腫瘍の微小環境において最も豊富な免疫細胞であり、特に、腫瘍の内部に浸潤したマクロファージは、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophages, TAM) と呼ばれ、注目されている。マクロファージは、炎症促進性の古典的活性化型 (M1) と炎症抑制性のオルタナティブ活性化型 (M2) に大別されるが、TAM は一般に M2 マクロファージの性格を示し、さまざまなサイトカインを産生することにより腫瘍の増殖、浸潤、血管新生、転移に重要な役割を果たす「悪玉マクロファージ」として腫瘍の進展に寄与している。

一方、大腸癌の発現プロファイリングにより、治療抵抗性で予後不良なサブタイプを特定できるという報告がなされ (Sadanandam A, *et al. Nat Med*, 2013)、その予後不良な大腸癌の前癌病変は大腸鋸歯状病変である可能性が報告された (De Sousa E Melo F, *et al. Nat Med*, 2013)。その後の検討の結果、その遺伝子発現のプロファイルには、上皮の腫瘍細胞の発現よりも間質細胞の発現プロファイルが強く反映されており、間質のプロファイルが予後と関連することが分かってきた (Isella C, *et al. Nat Genet*, 2015)。また、CAF の腫瘍形成作用に TGF- β が関与しており、その阻害薬により癌の進行が抑えられることが明らかになった (Calon A, *et al. Nat Genet*, 2015)。これらの研究では CAF、血管内皮細胞、白血球の発現解析がなされているが、TAM に関しての解析は行われていない。

また、近年、TAM を標的とした治療が試みられており、核酸を用いる方法、DNA ワクチンを用いる方法、シグナル伝達経路を遮断する方法、光線力学療法などが検討されている。そこで、我々は臨床検体を用いて TAM の発現プロファイリングを行い、大腸癌の治療に応用することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、現在まで明らかにされてこなかった大腸癌における TAM の発現プロファイルの解析により、TAM が微小環境において腫瘍の増殖、浸潤に寄与するメカニズムを明らかにすることであった。大腸癌の臨床検体由来の TAM の発現プロファイルの解析を行い、臨床病理学的特徴と比較することで、進展や転移のバイオマーカーの同定を行い得る可能性がある。さらに、TAM において遺伝子発現が上昇している遺伝子、もしくは活性化されたシグナル伝達経路が同定されれば、それらの阻害薬の開発の基盤となり得るため、TAM を標的とする新規治療法の開発につながる可能性があると考えた。また、現在、分化誘導療法、抗体療法、チロシンキナーゼ阻害薬などの TAM を標的としたさまざまな治療が研究されているが、TAM の発現プロファイルによって、治療法を選択できる (テーラーメイド医療に応用できる) 基盤となると可能性があると考えた。

3. 研究の方法

当初の研究実施計画は、大腸癌の手術検体から TAM の分離を行い、DNA マイクロアレイを用いて網羅的発現解析を行うこととしていた。そして、得られた発現プロファイルと、データベースに登録されている大腸癌の発現プロファイルを比較し、発現が変化している特定の遺伝子群を抽出することにより、TAM が腫瘍増殖、浸潤に寄与する機序を同定し、進展や予後予測のバイオマーカーを明らかにする予定であった。しかし、当初の計画に反して、大腸癌組織から上皮細胞と TAM を分離する過程に困難が生じたため、網羅的な発現解析を行う体制を構築し得なかった。

そのため、従来切除され、保存されていた大腸進行癌、前癌病変のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いて、免疫組織化学による蛋白発現の解析を行った。近年、肝細胞癌において、TAM と Wnt シグナル経路の関連と癌進展への関与が報告された。同報告では、腫瘍細胞由来の Wnt 受容体に結合するリガンドが Wnt/ β カテニンシグナルを介して M2 マクロファージへの分化を引き起こし、肝細胞癌の増大、遊走、転移、免疫抑制をきたすと報告された (Yang Y, *et al. Cell Death Dis*, 2018)。

それらの関連を、大腸癌において調べる目的で、大腸進行癌において、Wnt シグナル経路の重要な転写促進因子である β カテニンと TAM のマーカーとされている CD206 抗体の免疫組織化学を行った。その後、進行癌において TAM の腫瘍への浸潤様式と腫瘍の転移様式、化学療法への反応性、予後などの臨床病理学的特徴との関連の有無に関して予備的検討を行ったが、相関は得られなかった。

そのため、対象を、高悪性度大腸癌の前癌病変とされる大腸鋸歯状病変に変更して解析を行った。大腸鋸歯状病変には、無茎性鋸歯状腺腫 (sessile serrated adenoma, SSA)、鋸歯状腺腫 (traditional serrated adenoma, TSA)、過形成性ポリープ (microvesicular type hyperplastic polyp, MVHP) が含まれる。研究代表者らは、大腸鋸歯状病変 88 病変を対象に、APC, CTNNB1, RNF43 などの Wnt シグナル経路関連遺伝子を含む 39 の癌関連遺伝子の変異解析とゲノムワイドなメチル化である CpG island methylator phenotype (CIMP) のマーカーを含む DNA メチル化解析を行なった。その追加の解析として、39 検体において、Wnt シグナル経路の亢進を反映するとされる β カテニンと CD206 抗体の免疫組織化学による検討を行った。

4. 研究成果

免疫組織化学による解析は、大腸鋸歯状病変 39 病変 (TSA 14 病変、SSA 13 病変、MVHP 12 病変) において行い得た。CD206 抗体の免疫組織化学に関しては、大腸鋸歯状病変においても臨床病理学的因子との関連は得られなかった。しかし、 β カテニン染色では、全 39 病変中 12 病変 (31%) で核内集積がみられた (図に代表的な免疫組織化学の結果を示す)。病理組織別にみると、TSA の 14 例中 8 例 (57%)、SSA の 13 例中 1 例 (8%)、MVHP の 12 例中 3 例 (25%) に核内集積がみられ (表参照)。水色が変異陽性、黄色が β カテニンの核内集積陽性を示す)、SSA と比較して、TSA で高頻度であった (57% vs 8%, $P = 0.01$)。

また、全 39 病変で、 β カテニンの核内集積は、*RNF43* 変異を伴う病変において、伴わない病変と比較してより高頻度にみられた (83% vs 21%, $P < 0.01$)。

TSA のみに注目すると、 β カテニンの核内集積は *KRAS* 遺伝子変異を伴う病変と比較して、*BRAF* 遺伝子変異を伴う病変に高頻度であった (88% vs 20%, $P = 0.01$)。

これらの結果により、TSA において、Wnt シグナル関連分子、特に *RNF43* 遺伝子の変異が、実際に経路の亢進に関連しており、発癌に寄与している可能性が示された。

まとめると、副次的な結果ではあるが、従来提唱されてきた、管状腺腫を前癌病変とする adenoma-carcinoma sequence、SSA を前癌病変とする serrated-neoplasia pathway とは異なる、TSA を前癌病変とする第 3 の大腸発癌経路の存在が示された。また、第 3 の発癌経路においても、*KRAS* 遺伝子変異が関与する経路、*BRAF* 遺伝子変異が関与する経路が存在する可能性も示唆された。

本研究の結果、特に TSA が前癌病変として想定される予後不良大腸癌に関して、Wnt シグナル経路を標的とした新たな分子標的治療が有効である可能性が示唆された。

図. 無茎性鋸歯状腺腫(上段)、鋸歯状腺腫(下段)のH-E染色(左)と β カテニン染色(右)

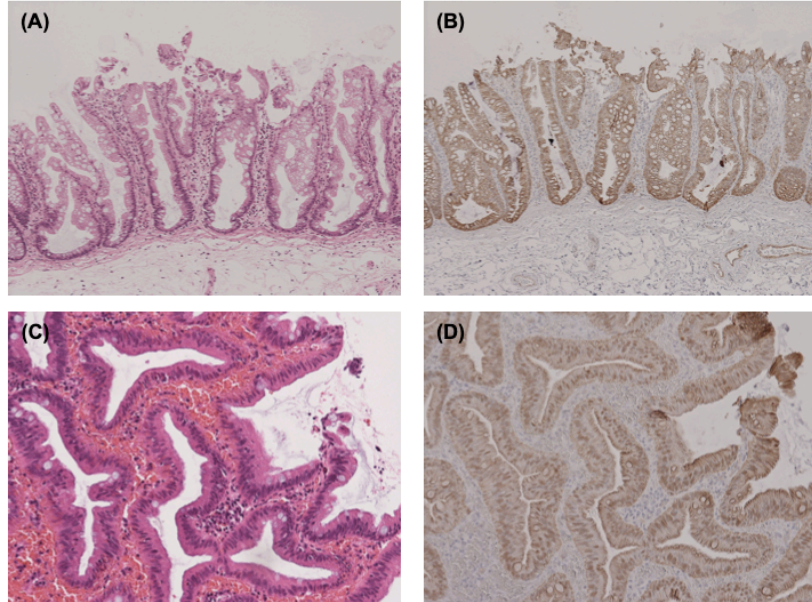


表. 大腸鋸歯状病変における、遺伝子変異と核内 β カテニン発現の関連

症例	病理	RNF43	APC	CTNNB1	BRAF	KRAS	GNAS	β -catenin
1	SSA				p.Val600Glu			
2	SSA				p.Val600Glu			
3	SSA				p.Val600Glu			
4	TSA		p.Glu1209Ter			p.Gly12Asp	p.Arg201His	
5	SSA					p.Gln61His		
6	TSA		p.Arg302Ter		p.Val600Glu			
7	TSA		p.Arg283Ter			p.Gly12Val		
8	MVHP							
9	TSA				p.Val600Glu			
10	MVHP							
11	MVHP					p.Gly12Asp		
12	TSA				p.Val600Glu			
13	TSA+TVA		p.Glu1573Ter		p.Val600Glu			
14	TSA							
15	TSA			p.Ser45Phe		p.Gly12Val		
16	TSA	p.Phe25fs			p.Val600Glu			
17	MVHP							
18	MVHP		p.Asn276His	p.Lys158Arg				
19	SSA	p.His410Tyr			p.Val600Glu			
20	SSA				p.Val600Glu			
21	SSA				p.Val600Glu			
22	SSA				p.Val600Glu			
23	SSA							
24	MVHP				p.Val600Glu			
25	SSA				p.Val600Glu			
26	SSA							
27	TSA	p.Leu30fs	p.Asn1070Ser		p.Val600Glu			
28	MVHP					p.Gln61Lys,	p.Val334Gly	
29	MVHP				p.Val600Glu			
30	TSA	p.Leu82fs			p.Val600Glu			
31	SSA				p.Val600Glu			
32	TSA		p.Arg1450Ter/R1158fs			p.Gly12Asp,		
60	TSA				p.Asn581Ser	p.Gln61His		
62	MVHP	p.Arg337Ter			p.Val600Glu			
63	SSA				p.Val600Glu			
65	MVHP				p.Val600Glu			
66	MVHP				p.Val600Glu			
73	MVHP				p.Val600Glu			
77	TSA	p.His86fs			p.Val600Glu			

SSA, sessile serrated adenoma; TSA, traditional serrated adenoma; MVHP, microvesicular hyperplastic polyp;

TVA, tubulovillous adenoma

Nuclear β -catenin expression was positive when more than 10% of nuclear staining was detected.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0229262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sawada T, Nakanishi H, Kaizaki Y, Sasaki Y, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Takahashi N, Hasatani K, Kubota E, Kataoka H, Ota R, Yanase Y, Inagaki S, Yamada S, Minamoto T, Suzuki H, Sugai T.
2. 発表標題 Integrative analysis of gene mutations and DNA methylation in colorectal serrated lesions.
3. 学会等名 United European Gastroenterology Week 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西宏佳、澤田 武、海崎泰治、佐々木泰史、山本英一郎、青木敬則、永塚 真、高橋直樹、波佐谷兼慶、久保田英嗣、片岡洋望、太田亮介、稲垣聡子、山田真也、源 利成、鈴木 拓、菅井 有。
2. 発表標題 大腸锯齿状病変における遺伝子変異、メチル化の統合解析。
3. 学会等名 第60回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保田 英嗣 (Eiji Kubota) (30405188)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	澤田 武 (Sawada Takeshi) (60345626)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	