

令和元年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16540

研究課題名(和文)ケモカインを用いた大腸癌治療における新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of novel biomarkers in colorectal cancer treatment using chemokines

研究代表者

稲本 将 (Inamoto, Susumu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60794683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SMAD4欠損マウス大腸癌転移モデルを作成し、SMAD4欠損大腸癌細胞株でのケモカインCXCL1、CXCL8の発現上昇が、固有のケモカイン受容体CXCR2を発現する骨髄球(腫瘍関連好中球)を腫瘍周囲に集積させることを確認した。また、ヒト原発大腸癌切除標本にて同様の現象を検証。さらに腫瘍浸好中球自身もCXCL1とCXCL8を高発現していた。患者血液サンプルの検証ではCXCL8高濃度群は予後不良であり、新規バイオマーカーの可能性が示唆された。これらのデータをまとめ、当教室よりClinical Cancer Research誌に投稿した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は腫瘍免疫に焦点を当てている。元来の抗がん剤ではなく、自己の免疫細胞が腫瘍からのケモカインシグナルにより、腫瘍促進を手伝う存在に陥っている。逆にこの点を注目し、新規バイオマーカーとして、癌の早期発見や再発確認に有用であるだけでなく、PD1などと強調して、抗腫瘍薬の開発にも繋げることが可能と考える。さらなる研究を進め、より多くの癌患者の助けになると期待している。

研究成果の概要(英文)：Using SMAD4 knockdown colorectal cancer metastasis model, we confirmed that the in the SMAD4 knockdown group, elevated expression of the chemokine CXCL1 and CXCL8 accumulated CXCR2 positive neutrophils around colorectal cancer tumor.

In addition, we verified the same phenomenon in human primary colorectal cancer specimens. Furthermore, the tumor infiltrating neutrophils themselves also highly expressed CXCL1 and CXCL8. Examination of patient blood samples showed that the CXCL8 high concentration group had a poor prognosis, suggesting the possibility of a novel biomarker. We finally, summarized these data and submitted it to "Clinical Cancer Research".

研究分野：消化管外科

キーワード：ケモカイン 大腸癌 腫瘍関連好中球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌を始めとする様々な癌腫に対する各種治療の進歩は目覚ましいものの、癌に対する早期発見、治療効果判定、再発予測など、癌の病勢を予測する指標は依然として限られている。近年、癌の早期発見や病勢評価、予後予測を目的とした癌バイオマーカーの研究が盛んに行われており、miRNA やペプチド、サイトカインなどが候補と成りうる報告が発表されており注目されている。

ケモカインはサイトカインの一種で炎症や損傷、腫瘍部において分泌されるタンパク質である。ケモカインに対する特異的な受容体を発現する白血球などが、炎症部において分泌されたケモカインに呼応して濃度依存性に集積し、さまざまな作用を引き起こす。このケモカイン-ケモカイン受容体シグナルと癌の関連は近年注目されており、炎症の誘導や局所の宿主免疫抑制により腫瘍の浸潤・転移に寄与すると考えられている。

申請者らは、これまでに大腸癌におけるケモカイン CCL15 とその受容体である CCR1 の役割について検討してきた。ヒト大腸癌原発巣・肝転移巣・肺転移巣において、大腸癌における癌抑制遺伝子 SMAD4 欠損によりケモカイン CCL15 が発現誘導され、その結果 CCL15 と親和性のあるケモカイン受容体 CCR1 を発現する未分化骨髄球が腫瘍周囲に集積して、宿主の免疫抑制・血管新生を促し、癌の浸潤・転移に寄与することが明らかとなった。臨床組織検体を用いた免疫組織染色では肝転移、肺転移症例において CCL15 発現陽性症例は陰性症例に比べ無再発生存が有意に悪く ($P < 0.05$)、原発巣の検討でも Stage / では無病生存率が悪い傾向にあり ($P = 0.15$)、大腸癌における CCL15 発現と患者予後との間には関連性があることが明らかとなった。

さらに SMAD4 発現に関連した他のケモカイン・シグナルのスクリーニングのため、SMAD4 発現が正常な大腸癌細胞株 (SW837 および Caco2) に対し SMAD4 発現を shRNA 法にて発現抑制した安定細胞株を樹立し網羅的なケモカイン・アレイで検討したところ、SMAD4 のノックダウンにより 2~4 倍以上に発現が増加するケモカインとして CXCL1 と CXCL8 があることを preliminary data として申請者らは既に見出している。

2. 研究の目的

CXCL1、CXCL8 の発現が上昇した SMAD4 ノックダウン大腸癌細胞株 (SW837, Caco2) を用いて大腸癌マウスモデルにおける CXCL1、CXCL8 の役割について検討するとともに、固有のケモカイン受容体 CXCR2 を発現する骨髄球の腫瘍周囲への集積程度を蛍光組織染色にて検討。

CXCL1、CXCL8 のヒト大腸癌 (原発巣および転移巣) での発現を検証を行い、新規大腸癌バイオマーカーとしての可能性を探索する。

3. 研究の方法

SMAD4 ノックダウン大腸癌細胞株 xenograft マウスモデルでの CXCL1/8 発現

CXCL1、CXCL8 の発現上昇が見られた SMAD4 ノックダウン大腸癌細胞株 (SW837, Caco2) をヌードマウスに接種して、マウスモデル (原発巣モデル、転移モデル) で腫瘍増大能や転移能が促進されるかどうか検討する。また腫瘍組織における CXCL1、CXCL8 の発現及びこれらに固有のケモカイン受容体 CXCR2 陽性骨髄球の腫瘍周囲集積程度を免疫組織染色にて検討し、コントロール群との間に差異があるかを検証。

マウスモデルについては、細胞株注入 1 週、3 週、5 週で各群 5~10 匹で検討し、腫瘍径・重量を測定する。さらに蛍光タンパク発現遺伝子を導入した Luc 発現細胞を用いて in vivo 蛍光イメージングを用いて定量評価も行う。腫

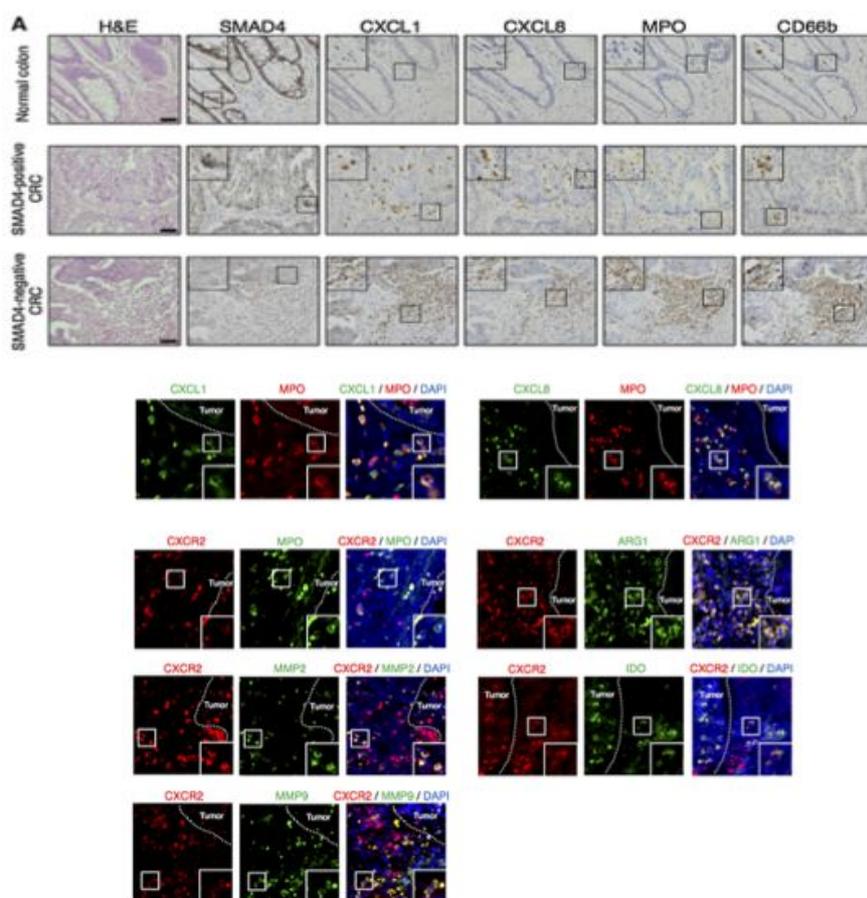
瘍組織はホルマリン固定・パラフィン包埋し免疫組織染色、蛍光組織染色を行う。免疫組織染色にて CXCL1、CXCL8 の発現を検討するとともに、腫瘍周囲に集積する骨髄球が固有のケモカイン受容体 CXCR2 を発現するかも検討する。

ヒト大腸癌組織切片での CXCL1 および CXCL8 発現、CXCR2 陽性骨髄球集積の検証

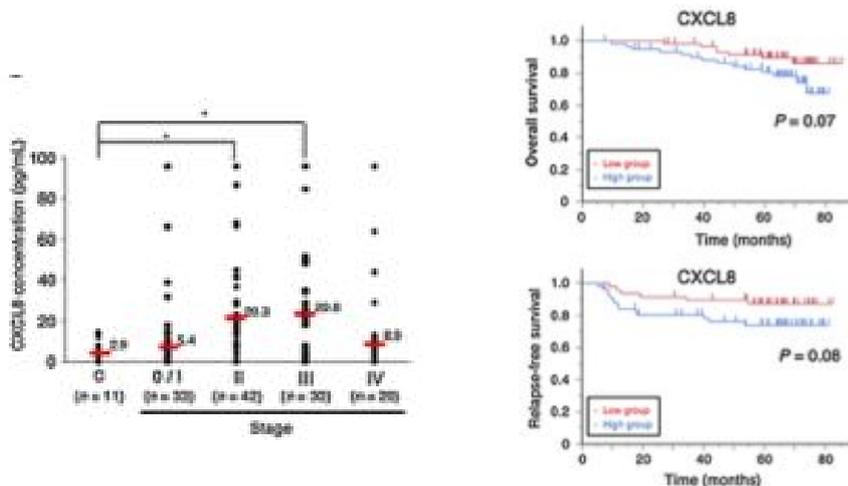
ヒト原発大腸癌切除標本を用いて CXCL1 および CXCL8 の腫瘍における発現を免疫組織染色にて検討する。腫瘍に集積する骨髄球の CXCR2 発現、CXCR2 陽性骨髄球の集積程度を定量評価する。また、大腸癌患者血液サンプルにおいてこれらケモカイン発現量と患者予後との関係を検証する。

4. 研究成果

SMAD4 欠損マウス大腸癌転移モデルを作成し、SMAD4 欠損大腸癌細胞株でのケモカイン CXCL1、CXCL8 の発現上昇が、固有のケモカイン受容体 CXCR2 を発現する骨髄球(腫瘍関連好中球)を腫瘍周囲に集積させることを確認した。



また、ヒト原発大腸癌切除標本にて同様の現象を検証。さらに腫瘍浸好中球自身も CXCL1 と CXCL8 を高発現していた。患者血液サンプルの検証では CXCL8 高濃度群は予後不良であり、新規バイオマーカーの可能性が示唆された。これらのデータをまとめ、当教室より Clinical Cancer Research 誌に投稿した。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ryotaro Ogawa, Takamasa Yamamoto, Hideyo Hirai, Keita Hanada, Yoshiyuki Kiyasu, Gen Nishikawa, Rei Mizuno, Susumu Inamoto, Yoshiro Itatani, Yoshiharu Sakai, and Kenji Kawada,

Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8–CXCR2 Axis

Clin Cancer Res. 2019 May 1;25(9):2887-2899. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3684. Epub 2019 Jan 31.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：河田 健二

ローマ字氏名：Kawada Kenji

研究協力者氏名：尾川 諒太郎

ローマ字氏名：Ogawa Ryotaro

研究協力者氏名：山本 高正

ローマ字氏名：Yamamoto Takamasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。