

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16558

研究課題名(和文) 大腸癌における接着因子NCAMと腫瘍関連マクロファージとの相互作用解析機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Interaction Analysis between Adhesion Factor NCAM and Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Cancer

研究代表者

高瀬 信尚 (Takase, Nobuhisa)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50647758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌と平行して研究を行っている、食道癌(ESCC)の進行にはTAM由来のS100A8/A9の発現が関与していることが明らかになった。また、CAFsも重要な働きをしており、NCAMを介したTAMに関連し、癌の進展に関連していることが分かった。また、大腸癌腹膜播種モデルを作成し、MDSCやマクロファージを標的にすることで腹腔内癌微小環境の変化がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌において、接着因子NCAMの発現は不良な予後と相関することが先行研究により明らかとされている。その一方で、癌微小環境下におけるTAMで発現増強される接着因子と腫瘍との相互作用に関する報告は認めない。TAMと癌細胞が形成する微小環境の変化に伴い、病状が進行していくメカニズムについて明らかにすることにより、予後不良な免疫抑制環境に関する情報を集積することで、難治性大腸癌に関する新たなアプローチとなりうるものである。

研究成果の概要(英文)：In a parallel study to colorectal cancer, we found that TAM-derived S100A8/A9 expression is involved in the progression of esophageal cancer (ESCC). CAFs were also found to play an important role and are associated with NCAM-mediated TAMs and related to cancer progression. In addition, colorectal cancer peritoneal seeding model was created, suggesting that there may be alterations in the intraperitoneal cancer microenvironment by targeting MDSCs and macrophages.

研究分野：人体病理学

キーワード：大腸癌 癌微小環境 腫瘍関連マクロファージ 癌関連線維芽細胞 NCAM マウス治療モデル

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは線維芽細胞や血管内皮細胞などとともに、癌の微小環境を形成する主要な構成要素の1つである。マクロファージ中でも腫瘍と会合するマクロファージは、腫瘍関連マクロファージ(TAM)と定義され、様々な種類の癌の進展に関与することが報告されている。食道扁平上皮癌では腫瘍促進的に作用するM2マクロファージマーカーであるCD204陽性TAMの浸潤が著明なほど、予後不良であることが明らかとなっている。それに加えて、申請者は食道扁平上皮癌微小環境におけるTAMでのfibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1)経路のリガンドとして知られている神経接着分子neural cell adhesion molecule (NCAM)発現は、TAM自身のFGFR1発現及び活性化を制御するとともに、fibroblast growth factor-2 (FGF-2)を介したFGFR1シグナルの活性化によってもTAM及び癌細胞の生存・遊走かが促進されることを明らかとした。大腸癌領域においては所属リンパ節のCD169陽性マクロファージはCD8陽性Tリンパ球の腫瘍組織内浸潤に関与し、良好な予後と相関するとされる。接着因子NCAM発現に関する先行研究としては、大腸癌の約40%にNCAMの発現が認められるとともに、腫瘍自身におけるNCAMの発現は不良な予後と相関することが明らかになっている。その一方で、大腸癌微小環境下におけるTAMとNCAMの相互作用に関する報告は見られない。

実際に臨床応用に関する研究は、NCAM関連遺伝子における臨床応用については、2015年2月13日に米国食品医薬品局(FDA)より局所再発又は転移性、進行性、放射性ヨウ素治療抵抗性分化型甲状腺癌に対してNCAMのレセプターであるFGFR等を阻害することにより抗腫瘍効果を得る分子標的薬(レンバチニブメシル酸塩)が承認された。申請者は、食道扁平上皮癌において、接着分子NCAMは、ともに誘導されるFGFR1と細胞膜上で会合し、食道癌細胞からのFGF-2のシグナルを調節してTAMの生存・運動を促進することを明らかとしてきた。しかしながら、In vivoにおける食道癌微小環境に発現するNCAM発現は比較的弱く微小環境下NCAM発現による臨床病理学的解析は困難で、実際のところは、臨床応用への課題が山積している。その一方で、大腸癌においては約40%に腫瘍そのもののNCAMの発現が認められると共に、腫瘍そのものにおけるNCAMの発現は不良な予後と相関することが明らかとされている。それゆえNCAM発現が比較的高頻度に認められる大腸癌においては、TAMとの相互作用が腫瘍促進的に作用している可能性が高いために、解析を促進し、結果的に、臨床応用高いと判断した。我々は、TAMで発現誘導がなされる接着因子NCAMならびにNCAM関連遺伝子(FGF, FGFR等)をin vitroで解析することにより、腫瘍ならびに癌微小環境下における接着因子を主体とした腫瘍進展(抑制)メカニズムを明らかとし、癌の新規分子標的治療および新規の予後予測バイオマーカー開発の足がかりを提供したい。

2. 研究の目的

本研究は、大腸癌に対するマクロファージを標的とした新規分子標的治療及び新規の予後予測バイオマーカーの開発を視野に入れ、接着因子NCAMとマクロファージ・腫瘍間の細胞間相互作用について培養細胞系や臨床検体を用いた解析を行い、大腸癌におけるTAMの役割を明らかにすることである。大腸癌において、接着因子とマクロファージ・腫瘍間の細胞間相互作用について詳細な検討を行った研究は見当たらない。本研究では、癌細胞とマクロファージの共培養実験系をはじめとする研究手法を用いて、癌微小環境におけるTAMに発現誘導された接着因子NCAMならびにNCAM関連遺伝子の相互作用についての解析を行う。また、M2マクロファージ浸潤数とNCAMならびにNCAM関連遺伝子発現との関連についても、ヒト大腸腺癌の臨床検体・M2マクロファージマーカー(CD204, CD163)等を用いて評価を行う。特にM2マクロファージにおけるがん微小環境の増悪機転は治療標的として魅力があるため、これをもとに治療開発に展開したい。

3. 研究の方法

本研究では大腸癌微小環境における腫瘍ならびにTAMにおける接着因子発現の役割、及びその関連遺伝子との相互作用を含めて解析を行い、大腸癌におけるTAMの役割を明らかにする

a) ヒト大腸腺癌細胞株とマクロファージとの共培養実験系の確立、b) ヒト大腸腺癌細胞株とマクロファージとの細胞間相互作用において媒介する接着因子(NCAM等)発現誘導の解析

c) 接着因子と相互作用のある受容体やそのリガンド(NCAM-FGF-2/FGFR1 axis)の発現の解析ならびに関連遺伝子ノックダウンに伴う細胞内シグナル・phenotypeの解析、d) ヒト大腸腺癌の臨床検体を用いた上記で同定された分子群の発現解析である。研究a)として、ヒト食道扁平上皮癌細胞株とマクロファージとの共培養実験系の確立を行う。ヒト大腸癌由来株化癌細胞(SW480, DLD-1等)を購入し、継代維持を行う。ヒト末梢血由来マクロファージは先行研究で確立した方法にて作成する。自動細胞分離装置を用いて単離したCD14陽性単球をマクロファージコロニー刺激因子で6日間刺激することでマクロファージを作成し、マクロファージ様細胞に50%大腸癌細胞培養上清を48時間培養させ、これをTAMとして、研究を進める。研究b)では、NCAMおよびNCAM関連遺伝子のTAMにおける発現誘導ならびに腫瘍自身でのNCAM発現を解析を

行う。また、TAMの分化とNCAMの発現誘導ならびにNCAM関連遺伝子を定量的RT-PCRやwestern blot法、ELISA法、フローサイトメトリー法、蛍光免疫染色にて確認する。また腫瘍自身でのNCAM発現も解析を行う。研究c)では、ヒト大腸癌の臨床検体を用いた上記で同定された分子の発現解析を行う。当院にて切除された大腸癌の臨床検体(病理組織標本)を用い、抽出した分子(NCAM等)の免疫組織化学的解析を行う。腫瘍細胞のみならず、腫瘍周囲のM2マクロファージの指標となるCD163やCD204陽性マクロファージ細胞浸潤比率を含めた解析を進めてin vitroで得られた結果の妥当性を証明する。次に、研究d)として、ヒト大腸癌細胞株とマクロファージとの細胞間相互作用において媒介する接着分子とそのリガンド・レセプターとの相互作用についての解析を行う。また、実際のin vivoの研究として、マウスの大腸癌マウスモデルを用いて標的分子の中和抗体や阻害剤を投与することで接着因子の阻害により発癌を抑制(増殖)することが可能かを検討する。

4. 研究成果

大腸癌研究の進行は共培養系の確立に時間を要しており、現在の継続中である。同時に変更して行っていたTAMに関する研究成果を報告する。まず、食道扁平上皮癌(ESCC)細胞とマクロファージの直接共培養アッセイにより、ESCC細胞の遊走能と浸潤能、Aktとp38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)のリン酸化レベルが上昇し、S100A8/A9の発現と放出が増強されることが示された。S100A8/A9はAktおよびp38 MAPKシグナル伝達経路を介してESCCの進行を促進すると考えられ、S100A8/A9の発現量が多いESCC患者は無病生存期間および原因特異的生存期間が有意に短いことが示された。ここでもTAMは癌の進展に関連し、病態の進行に関与していることを明らかにした。また、がん関連線維芽細胞(CAF)が食道扁平上皮がん(ESCC)の進行に関与していることが分かった。共培養MSCをCAF様細胞として定義し、cDNAマイクロアレイ解析を行った結果、PAI-1/LRP1軸が食道扁平上皮癌のみならず、TAMに作用することで、ESCCの進行に寄与していることが示唆され、治療のターゲットとなる可能性があることを示した。別の実験系として、マウス治療モデル作成を含めて、大腸癌腹膜播種モデルを作成した。MC38マウス大腸癌脂肪株を用いて、条件付けを行い、同時に異系統のマウスでもモデルを作成した。腹膜播種はMDSCの増加と共に病態が増悪することが確認されたが、腹腔内マクロファージでも、著明な上昇を認め、Monocytic-MDSCとの関連が示唆された。マクロファージやMDSCを標的にすることにより、腹膜播種による腹腔内癌微小環境の変化がある可能性が示唆された。大腸癌細胞株の培養系とヒト単球由来のTAM作成については継続して研究を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa Hiroshi, Matsuda Takeru, Arimoto Akira, Yamashita Kimihiro, Nishi Masayasu, Takase Nobuhisa, Hosono Masayoshi, Nakamura Tetsu, Suzuki Satoshi, Kakeji Yoshihiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Does anastomotic leakage after rectal cancer resection worsen long-term oncologic outcome?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 1243 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-020-03577-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanigawa Kohei, Tsukamoto Shuichi, Koma Yu-ichiro, Kitamura Yu, Urakami Satoshi, Shimizu Masaki, Fujikawa Masataka, Kodama Takayuki, Nishio Mari, Shigeoka Manabu, Kakeji Yoshihiro, Yokozaki Hiroshi	4. 巻 192
2. 論文標題 S100A8/A9 Induced by Interaction with Macrophages in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Promotes the Migration and Invasion of Cancer Cells via Akt and p38 MAPK Pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 536 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Hiroki, Koma Yu-ichiro, Higashino Nobuhide, Kodama Takayuki, Tanigawa Kohei, Shimizu Masaki, Fujikawa Masataka, Nishio Mari, Shigeoka Manabu, Kakeji Yoshihiro, Yokozaki Hiroshi	4. 巻 101
2. 論文標題 PAI-1 derived from cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma promotes the invasion of cancer cells and the migration of macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 353 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00512-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugita Yutaka, Yamashita Kimihiro, Fujita Mitsugu, Saito Masafumi, Yamada Kota, Agawa Kyosuke, Watanabe Akihiro, Fukuoka Eiji, Hasegawa Hiroshi, Kanaji Shingo, Oshikiri Taro, Matsuda Takeru, Nakamura Tetsu, Suzuki Satoshi, Kakeji Yoshihiro	4. 巻 45
2. 論文標題 CD244 ⁺ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells reflect the status of peritoneal dissemination in a colon cancer mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.8057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------