

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17057

研究課題名(和文)大腸SMがん浸潤先進部における腫瘍関連好中球の役割の解明と治療層別化への応用

研究課題名(英文)Analysis of tumor-associated neutrophils at the invasive front of submucosal invasive colorectal cancer

研究代表者

須藤 豪太(Sudo, Gota)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：60830130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんの粘膜下層(SM)への浸潤・転移は、早期がんの治療方針を決定する上で重要な問題であり、正確な予測マーカーや新規治療標的の同定が必要である。SM浸潤に関わる分子を同定するため、申請者らは大腸がん臨床検体のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、大腸SMがん浸潤先進部領域の低分化成分・簇出においてSAA1 (serum amyloid A1)が高発現し、かつその周囲にマクロファージと好中球が有意に集簇していることを見いだした。マクロファージ由来のIL-1 β が、大腸がん細胞のSAA1発現を誘導すること、さらにSAA1がマクロファージや好中球のMMP9発現を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸粘膜下層浸潤がん(SMがん)の約90%はリンパ節転移がなく、低侵襲な内視鏡治療により根治切除が可能である。しかし、現行の転移リスク層別化基準に従って、内視鏡治療後に追加外科手術を行ったSMがん症例の約90%が過剰な外科治療となっている。我々は浸潤先進部の低分化成分・簇出において、SAA1が特異的に高発現することを見いだした。さらに免疫組織染色解析から結果、SAA1高発現領域の周囲にマクロファージと好中球が有意に集簇すること、これらがSSA1刺激によりMMP9を産生することを明らかにした。本研究から、SAA1が浸潤・転移予測マーカーや治療標的として有用性である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Submucosal invasion and lymph node metastasis are important issues affecting treatment options for early colorectal cancer (CRC). We identified that serum amyloid A1 (SAA1) was specifically expressed in poorly differentiated regions (PORs) at the invasive front of T1 CRCs. Upregulation of SAA1 in CRC cells promoted cell migration and invasion. Co-culture experiments suggested that interleukin 1 β (IL-1 β) produced by macrophages induces SAA1 expression in CRC cells. These findings were supported by immunohistochemical analysis of primary T1 CRCs showing accumulation of macrophages and neutrophils at SAA1-positive invasive front regions. SAA1 produced by CRC cells stimulated upregulation of MMP9 in macrophages and neutrophils. Our data suggest that tumor-associated macrophages at the invasive front of early CRCs promote cancer cell migration and invasion through induction of SAA1, and that SAA1 may be a predictive biomarker and a therapeutic target.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸がん 粘膜下層浸潤 腫瘍微小環境 サイトカイン MMP9

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは早期発見により低侵襲な内視鏡治療で根治切除が可能である。近年、内視鏡治療の発展により、早期大腸がんの多くは大きさや部位によらず一括切除が可能となった。早期大腸がんの中でも粘膜下層浸潤がん (T1 大腸がん) は約 10% にリンパ節転移を伴うため、内視鏡治療後の病理結果に基づいてリンパ節郭清を伴う追加外科切除を検討する。しかし、現行の転移リスク層別化基準に従って内視鏡治療後に追加外科手術を行った T1 大腸がん症例の多くが過剰な外科治療となっており、より正確な層別化マーカーの開発が望まれている。

大腸がんは癌遺伝子、癌抑制遺伝子などのジェネティック、エピジェネティックな変化の蓄積により発生、進展すると考えられている。近年の大規模なトランスクリプトーム解析の結果、大腸がんはいくつかの分子サブタイプに分類され、臨床的な予後と相関することが明らかとなった。しかし、大腸がんの分子プロファイル解析の多くは進行大腸がんを対象としており、既に多数の染色体異常や遺伝子変異が蓄積していることから、早期大腸がんの浸潤に与える分子異常を同定することは困難であった。

2. 研究の目的

今回我々は、低分化成分 (poorly differentiated region, POR) に着目して早期大腸がんの分子解析を行い、新たな治療層別化マーカーや、浸潤・転移を予防する治療標的を同定することを目的とした。さらに大腸がん細胞が、マクロファージや好中球に与える影響を解析し、その機能的・臨床的意義を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

T1 大腸がんの臨床検体から POR と正常成分をレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションで分離し、RNA シークエンス法 (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を行った。Serum amyloid A1 (SAA1) およびマクロファージマーカーの発現を、免疫組織染色と定量 RT-PCR で解析した。また、早期大腸がんの臨床検体 97 例における SAA1 の発現と臨床病理学的特徴を検討した。大腸がん細胞における SAA1 の機能を、Cell viability assay、Boyden chamber assay、三次元培養システムを用いて解析した。THP-1 細胞をマクロファージへ分化誘導し、大腸がん細胞とマクロファージの相互作用を共培養実験により解析した。また、前骨髄球性白血病細胞 HL-60 を好中球へ分化誘導し、大腸がん細胞との共培養実験を行った。

4. 研究成果

RNA-seq により、POR における SAA1 の有意な発現上昇が明らかになり、免疫組織染色により、T1 大腸がんの浸潤先進部の POR で SAA1 が特異的に高発現していることが確認された。大腸がん細胞における SAA1 の過剰発現は、細胞の遊走・浸潤を促進することが明らかとなった。共培養実験により、マクロファージが産生するインターロイキン 1 β (IL-1 β) が大腸がん細胞の SAA1 の発現を誘導することが示唆された。マクロファージによる大腸がん細胞の遊走・浸潤の促進は、SAA1、IL-1 β を阻害することで抑制された。この結果は、T1 大腸がんの臨床検体を用いた免疫組織染色解析により、SAA1 陽性の浸潤先進部に M1/M2 マクロファージが集積していることから裏付けられた。さらに、大腸がん細胞が産生する SAA1 は、マクロファージの MMP9 の発現を促進した。

さらに我々は、SAA1 陽性の浸潤先進部における好中球の集簇を見出した。MMP9 の免疫染色の結果、SAA1 陽性の浸潤先進部において、マクロファージと好中球の両方が MMP9 陽性であった。HL-60 細胞を好中球様細胞に分化させ、大腸がん細胞との共培養や、リコンビナント SAA1 を用いた解析の結果、SAA1 が好中球の MMP9 発現を誘導することを見出した。

SAA1 は肝細胞で産生される炎症マーカーとして有名だが、がんとの関わりも明らかにされつつある。がん患者血清中の SAA1 上昇は以前から知られており、また大腸がん細胞株や大腸がん組織における SAA1 の発現上昇も報告がある (Br J Cancer, 2000; J Histochem Cytochem, 2006)。がんにおける SAA1 の機能は長年不明であったが、近年、マウスがん細胞において SAA1 が NF- κ B シグナルによって誘導され、浸潤・転移を促進することや (Oncogene, 2015)、肺がんモデルマウスで SAA1 が転移を促進すること (Cancer Res, 2017)、NF- κ B シグナルを介した IL-1 誘導性の SAA1 が、トリプルネガティブ乳癌の進行度や死亡率と相関すること (Oncotarget, 2019) が報告されている。更に本研究の結果から、浸潤先進部における SAA1 の高発現が早期大腸がんの浸潤に与えることが強く示唆された。

IL-1 β は大腸の炎症、発がん、浸潤に関連することが知られている。IL-1 β による大腸がんの浸潤促進は、ZEB1 の発現上昇や間質の COX-2 シグナルの活性化など、複数の機序を介することが報告されている。加えて本研究の結果は、IL-1 β が SAA1 を介して大腸がん細胞の遊走、浸潤を促進することを明らかとした。

がん微小環境において、腫瘍関連マクロファージ (TAM) は IL-1 β の重要な供給源である。マクロファージは、classically activated (M1 または proinflammatory) タイプと alternatively activated

(M2 または anti-inflammatory) タイプに分類されることが知られている。多くの研究で TAM は M2 マクロファージに類似すると報告されているが、近年では腫瘍の進展に伴い M1 から M2 へ変化するとも考えられている。最近、大腸がん細胞由来の conditioned medium で THP-1 細胞を分化させると、M1 マクロファージと M2 マクロファージが混在した集団に分化することが報告された。大腸がんにおける TAM の臨床的意義については多くの研究が行われ、がんの発生初期には腫瘍免疫を担い腫瘍抑制的に機能し、一旦がんが形成されると腫瘍促進的に機能すると考えられている。本研究では、早期大腸がんの浸潤先進部において M1 マクロファージが腫瘍促進的に機能している可能性が示唆された。

本研究の結果、SAA1 は早期大腸がんのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、臨床的な有用性や、予後との関連などについては不明である。本研究では SAA1 が大腸がん細胞の遊走、浸潤を促進することを示したが、その分子メカニズムは十分には解明されていない。また、SAA1 の発現と大腸がんの分化度が強く相関することを明らかとしたが、そのメカニズムは不明である。これらを明らかとするため、今後は多数例の臨床検体および動物モデルを用いて、更なる研究が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sudo Gota, Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, Takasawa Akira, Niinuma Takeshi, Yoshido Ayano, Kitajima Hiroshi, Yorozu Akira, Kubo Toshiyuki, Harada Taku, Ishiguro Kazuya, Kai Masahiro, Katanuma Akio, Yamano Hiro o, Osanai Makoto, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 112
2. 論文標題 Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an interleukin 1 serum amyloid A1 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4151 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15080	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 -

1. 著者名 Sudo Gota, Takagi Hideyasu, Goto Akira, Nakahara Seiya, Hinoda Yuji, Nakase Hiroshi	4. 巻 116
2. 論文標題 Retrograde Colonic Intussusception Caused by a Pedunculated Adenoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1822 ~ 1822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14309/ajg.0000000000001173	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 NIINUMA TAKESHI, KITAJIMA HIROSHI, YAMAMOTO EIICHIRO, MARUYAMA REO, AOKI HIRONORI, HARADA TAKU, ISHIGURO KAZUYA, SUDO GOTA, TOYOTA MUTSUMI, YOSHIDO AYANO, KAI MASAHIRO, NAKASE HIROSHI, SUGAI TAMOTSU, SUZUKI HIROMU	4. 巻 41
2. 論文標題 An Integrated Epigenome and Transcriptome Analysis to Clarify the Effect of Epigenetic Inhibitors on GIST	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15062	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 Sudo Gota, Takagi Hideyasu, Nakase Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Lower gastrointestinal bleeding from Dieulafoy's lesion in the transverse colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 :e56-e57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13936	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 Ishiguro Kazuya, Kitajima Hiroshi, Niinuma Takeshi, Maruyama Reo, Nishiyama Naotaka, Ohtani Hitoshi, Sudo Gota, Toyota Mutsumi, Sasaki Hajime, Yamamoto Eiichiro, Kai Masahiro, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 7
2. 論文標題 Dual EZH2 and G9a inhibition suppresses multiple myeloma cell proliferation by regulating the interferon signal and IRF4-MYC axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-020-00400-0	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 -

1. 著者名 Sudo Gota, Takagi Hideyasu, Nakase Hiroshi	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Lower gastrointestinal bleeding from Dieulafoy's lesion in the transverse colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13936	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須藤豪太, 山本英一郎, 青木敬則, 高澤啓, 新沼猛, 久保俊之, 萬頭, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 鈴木拓.
2. 発表標題 活性化マクロファージはIL-1 -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉戸文乃, 須藤豪太, 北嶋洋志, 新沼猛, 甲斐正広, 原田拓, 佐々木基, 久保俊之, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓.
2. 発表標題 エピジェネティック阻害剤のGIST細胞におけるエピゲノム修飾, 遺伝子発現への影響の統合解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本英一郎, 吉戸文乃, 須藤豪太, 三橋慧, 北嶋洋志, 新沼猛, 甲斐正広, 原田拓, 佐々木基, 久保俊之, 山野泰穂, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓.
2. 発表標題 Helicobacter pylori除菌後胃がんと背景胃粘膜におけるDNAメチローム解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木拓, 須藤豪太, 青木敬則, 山本英一郎, 高澤啓, 新沼猛, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 久保俊之, 原田拓, 小山内誠, 仲瀬裕志.
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージはIL-1 β -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する.
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤豪太, 山本英一郎, 青木敬則, 高澤啓, 新沼猛, 久保俊之, 萬頭, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 鈴木拓
2. 発表標題 早期大腸がん浸潤先進部の分子解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本英一郎, 萬頭, 新沼猛, 北嶋洋志, 須藤豪太, 甲斐正広, 高野賢一, 仲瀬裕志, 鈴木拓
2. 発表標題 AEBP1の発現上昇は大腸がんの腫瘍血管新生を促進する
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤豪太, 山本英一郎, 三橋慧, 久保俊之, 山野泰穂, 鈴木拓, 仲瀬裕志
2. 発表標題 新規大腸がん間質関連遺伝子の同定とがん微小環境における機能の解明
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------