

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590937

研究課題名(和文) Gas6による自然免疫制御が大腸癌に及ぼす影響

研究課題名(英文) Inhibitory role of Gas6-mediated innate immunity in intestinal tumorigenesis

研究代表者

妹尾 浩 (SENO, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90335266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：腸管常在菌叢と自然免疫応答は、生体の恒常性維持に重要である。Growth arrest specific gene 6 (Gas6)は、NFκBの活性化を抑制して自然免疫を制御する。AOM/DSSを投与したGas6ノックアウト(KO)マウス、およびGas6 KO; ApcMinマウスでは、間質の炎症が亢進し、腸腫瘍が多かった。その結果、Gas6をKOした腸腫瘍モデルマウスの生存期間は野生型マウスよりも短縮していた。ヒト大腸癌組織で、Gas6の発現と炎症細胞浸潤は逆相関し、Gas6の低発現群では生存期間が短縮していた。本研究で自然免疫応答の制御による大腸癌治療へ向けた基礎的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Commensal microbiota affects on the maintenance of systemic homeostasis by the interaction with innate immune cells. Growth arrest specific gene 6 (Gas6) regulates innate immune responses through Stat1/3 signaling. Genetic deletion of Gas6 ameliorated inflammation and tumor formation in the mouse intestines caused by AOM/DSS treatment or insertion of Apc gene mutation. Gas6 knockout mice with intestinal tumors showed significantly shorter survival compared to wild type littermates. As well, colorectal cancer patients with lower Gas6 expression showed shorter survival. These data suggested the importance of innate immunity in the treatment of colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸 腸炎 腫瘍 マウス マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は世界の癌死の上位を占める。進行大腸癌の治療成績は、近年の集学的治療の進歩により向上しつつあるが、未だ満足出来るものではない。したがって大腸癌の病態解明や治療法の開発は重要な課題である。

腸管には、膨大な数(100兆個/個体)の常在菌叢が存在し、宿主との間で複雑な免疫応答が存在する。生理的状态では腸管の恒常性を維持するために腸管上皮は過剰な自然・獲得免疫応答を抑制するメカニズムを備えている。しかし、腸炎や腸腫瘍などの病的状態では、免疫応答の一部が破綻して病態の増悪に寄与する。これらの過程では、腫瘍間質に浸潤するマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が重要な役割を果たす。これらの腸内常在菌叢やそれに対する免疫応答の腫瘍への影響は、進行癌だけでなく、早期癌やその前段階である良性腫瘍でも同様に認められると考えられている。

Protein S と相同性をもつ Gla 蛋白である Growth arrest specific gene 6 (Gas6) は、哺乳類の全身組織でユビキタスに存在するが、癌細胞での高発現が報告されている。研究代表者は胃癌培養細胞で、Gas6 がビタミン K の存在下で活性化され、Akt を活性化して細胞増殖を促進することを報告した。また、消化管以外の培養癌細胞で、Gas6 受容体の発現が Akt や Stat3 経路を活性化して、癌細胞の増殖・浸潤能を促進させることもこれまでに報告されてきた。一方、近年の自然免疫研究の進歩により、Gas6 受容体 (TAM) はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞において Toll-like 受容体 (TLR) を介した NFkB の活性化を抑制し、過剰な自然免疫応答を抑制することが報告された。重要なことに、マウス実験では免疫細胞を含む腫瘍間質における TLR や NFkappaB の活性化抑制は、腸腫瘍の退縮をもたらす。また、腸炎の持続期間・強弱は、マウスでもヒトでも炎症性腸発

癌を規定する重要な因子である。以上より、Gas6 による腫瘍間質における自然免疫応答の抑制は、腸腫瘍の抑制につながる可能性が考えられる。

このように、Gas6 は腫瘍上皮細胞と間質の細胞で、相反する作用を持つ可能性があるが、これまでに腸上皮・免疫細胞の相互作用に着目し、Gas6 の生体腸管での役割を解析した検討は無かった。研究代表者は、これまでに腸腫瘍の発育・進展に及ぼす腫瘍間質の影響を種々の遺伝子改変モデルマウスを用いて検討してきた。今回の申請に先立って、研究代表者は Gas6 ノックアウトマウス (以下 Gas6 KO マウス) に対して dextran sulfate sodium (DSS) 投与を行い、DSS 腸炎の重篤度を検討した。その結果、Gas6 KO マウスでは腸炎が重篤化し、間質に浸潤するマクロファージの NFkappaB が活性化していた。すなわち、Gas6 がマウス腸管組織においても免疫応答を制御することが示された。そこで今回の研究で申請者は、培養細胞の検討では上皮細胞の増殖を促進する Gas6 が、生体腸管においては過剰な免疫応答を抑制することによって、最終的に腸発癌を抑制する可能性を考えた。

2. 研究の目的

(1) Gas6 を介した自然免疫応答制御が、腸腫瘍形成に及ぼす影響をマウスモデルで明らかにする。まず Gas6 KO マウスを用いた腸多段階発癌および炎症性発癌モデルを作出する。その解析を通じて、Gas6 が腸内の常在菌叢と間質の免疫細胞による自然免疫応答を如何に調節し、腸腫瘍形成にどのような影響を及ぼすかを検討する。同時に、複数種類のヒト大腸癌培養細胞を用いて、培養細胞での Gas6 の作用を検討する。マウス腸管と培養細胞における Gas6 の作用の差異を比較し、Gas6 を介した常在菌叢および免疫担当細胞の腸腫瘍形成過程における影響を明らかにする。

(2) Gas6 を利用した腸腫瘍治療へ向けての

基礎的知見を得る。上記(1)の検討により明らかにされた Gas6 の役割に応じて、ApcMin/+マウスやマウス炎症性腸腫瘍モデルを材料として、Gas6 の活性化または阻害による腸腫瘍治療を試みる。これにより、将来の臨床応用を目指した基礎的知見の蓄積を図る。

(3) ヒト大腸癌患者における Gas6 発現の意義を明らかにする。ヒト大腸癌患者検体において Gas6 の発現と、臨床病期・5年生存率との相関を検討する。これにより、本研究の臨床的意義を再確認する。同時に Gas6 の大腸癌バイオマーカーの役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) Gas6 KO マウスに azoxymethane (AOM) および dextran sulfate sodium (DSS) 投与を行い、炎症性腸腫瘍を形成させる。さらに Gas6 KO; ApcMin/+マウスを作出する。これらのモデルを用いて、マウス腸発癌モデルにおける Gas6 の役割を、マクロファージなどの免疫細胞の活性化状態の変化を含め検討する。これにより、生体腸管と細胞培養系での Gas6 の働きの差を明らかにする。

(2) マウスモデルと培養細胞系で Gas6 の投与・阻害を行い、Gas6 を利用した腸腫瘍治療への基礎的知見を得る。

(3) ヒト大腸癌臨床検体で、Gas6 発現と病期・予後の相関を検討する。これにより、本研究の臨床的意義を確認する。同時に、Gas6 の大腸癌バイオマーカーとしての役割を検討する。

4. 研究成果

(1) マウス腸発癌モデルにおける Gas6 の役割検討

研究代表者らは予備実験で Gas6 KO マウスでは DSS 投与によって WT マウスよりも腸炎が増悪することを確認していた。そこで、Gas6 欠損下におけるより強い炎症下で、腸腫瘍形成がいかに変化するかを検討した。Gas6

KO マウスへ AOM/DSS を投与して、炎症性腸発癌を作成して腸腫瘍の数・サイズを検討したところ、Gas6 KO マウスでは、コントロール・マウスに較べて腸腫瘍の数が多かった。また、Gas6 KO マウス腸腫瘍から単離したマクロファージは、Socs1/3 の発現が低下し、IL-1beta, 6, 10, 12, 17, 22, 23, TNF-alpha などの炎症性サイトカイン、および CXCL1, CCL2, CCL17 などの炎症性ケモカインを多く分泌していた。Gas6 KO マウスへ AOM/DSS を投与して形成された腸腫瘍において、間質への浸潤細胞における Socs3 は低下し、NFkappaB シグナルは亢進していることを確認した。これにより、Gas6 が腫瘍局所に浸潤するマクロファージの活性化状態を抑制することを確認した。さらに、Gas6 KO; ApcMin マウスの腸腫瘍の数、サイズ等を組織学的に検討した。その結果、同マウスでは、腸腫瘍の数とサイズが増加することが確認された。そして、AOM/DSS を投与した Gas6 KO マウスの場合と同様に、Gas6 KO; ApcMin マウスでも間質への炎症細胞浸潤および炎症性サイトカインの発現が野生型マウスよりも亢進していた。重要なことに、これら Gas6 を KO した腸腫瘍モデルマウスの生存期間は野生型マウスよりも有意に短縮していた。

(2) 大腸癌培養細胞での Gas6 の役割検討

研究代表者らは、過去に胃癌培養細胞を用いて、Gas6 の発現が *in vitro* では癌細胞の増殖を促すことを示した。大腸癌培養細胞でも同様の傾向が得られるか否かを、リコンビナント Gas6 の投与、Gas6 受容体デコイを用いた阻害実験等を通じて検討した。まず、リコンビナント Gas6 を投与すると、LPS で刺激したマウス、およびヒトマクロファージ細胞株 THP-1 から、IL-1beta, 6, 10, 12, 17, 22, 23, TNF-alpha などの炎症性サイトカイン、および CXCL1, CCL2, CCL17 などの炎症性ケモカインが多く分泌された。重要なことに、リコンビナント Gas6 は、大腸癌培養細胞株の

増殖に非常に弱い促進効果しか示さなかった。上記(1)のマウス生体を用いた結果と総合すると、Gas6は癌細胞の増殖に直接効果をもたず、腸管間質等における炎症を抑制して二次的に癌進展を抑制することが示唆された。

(3) ヒト大腸癌臨床検体の集積および Gas6 の役割検討

上記(1)(2)で得られた知見をヒト大腸癌で確認する必要がある。そのため、まずヒト大腸癌組織で Gas6 の発現が亢進しているか否かを検討した。京都大学医学部附属病院における大腸癌患者手術標本を用いて、定量的 RT-PCR および免疫染色による検討を行うとともに、患者血清での Gas6 濃度を ELISA 法で測定した。その上で、Gas6 の発現と臨床病期や 5 年生存率との関連を統計解析した。その結果、非常に興味深いことに、癌上皮における Gas6 の発現と間質の炎症細胞浸潤は逆相関しており、Gas6 の高発現群では有意に生存期間が短縮していた。これは上記(1)(2)で得られた基礎的実験の結果と合致するものであった。

これらの検討を通じて、腸内常在菌叢の解析や上皮・間質のクロストークを考慮しなければ、腸管という特殊な臓器において、in vitro で得られたデータをそのまま外挿することの危険性が示された。また、ヒト大腸癌でも Gas6 が病態の進展や予後に影響を及ぼす可能性が示されたことから、自然免疫応答の制御による大腸癌治療へ向けた基礎的知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Akitake-Kawano R, Seno H, Nakatsuji M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Kanda K, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Chiba T: Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 査読有, 34:1567-1574:2013, doi:10.1093/carcin/bg

t069.

2. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T: Dc1k1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nature Genet*, 査読有, 45:98-103:2013, doi:10.1038/ng.2481.

3. Ueo T, Imayoshi T, Kobayashi T, Ohtsuka T, Seno H, Nakae H, Chiba T, Kageyama R: The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development* 査読有, 139:1071-1082:2012, doi:10.1242/dev.069070.

4. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi U, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohono M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T: Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF. *EMBO Mol Med*, 査読有, 4:396-411:2012, doi:10.1002/emmm.201200216.

5. Nakanishi Y, Nakatsuji M, Seno H, Ishizu S, Akitake-Kawano R, Kanda K, Ueo T, Komekado H, Kawada M, Minami M, Chiba T. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. *Carcinogenesis*, 査読有, 2011 Sep;32(9):1333-9, doi:10.1093/carcin/bgr128.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 妹尾 浩、中西 祐貴、千葉 勉: Dc1k1 discriminates between tumor and normal stem cells in the intestine. シンポジウ

ム がん幹細胞研究に基づく新たながん治療戦略 第 36 回日本分子生物学会年会 2013.12.04 神戸 神戸国際会議場

2. 中西 祐貴、上尾 太郎、妹尾 浩: 腸腫瘍幹細胞特異的マーカーDclk1 の同定. International Sessions がん幹細胞 第 72 回日本癌学会総会 2013.10.04 横浜 パシフィコ横浜

3. Nakanishi Y, Seno H, Chiba T: Intestinal tumors are continuously renewed by Dclk1-positive tumor stem cells. American Association of Cancer Research, Annual Meeting 2013, 2013.4.10 Washington DC, USA, Walter E. Washington Convention Center

4. 中西 祐貴、妹尾 浩、上尾 太郎: 正常腸管および腸腫瘍における Dclk1/Lgr5 陽性細胞の役割. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013.03.23 鹿児島 かがしま県民交流センター

5. Nakanishi Y, Seno H, Ueo T, Chiba T: The role of Dclk1-positive cells in the intestinal homeostasis. 2012 James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology. 2012.8.27 Chicago, USA, Intercontinental Hotel Chicago

6. Seno H: Dclk1 discriminates between tumor and normal stem cells in the intestine. GI Research Academy 2012, 2012.6.15 Tokyo, Japan, Keidanren Hall

7. 中西 祐貴、上尾 太郎、妹尾 浩: 腸腫瘍幹細胞特異的マーカーDcamk11 の同定. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.04.20 東京 京王プラザホテル

8. 上尾 太郎、妹尾 浩、仲瀬 裕志: Hes1 は大腸上皮細胞の位置を規定し、ニッチ由来の Wnt や BMP シグナルによる分化制御に關与する. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.04.19 東京 京王プラザホテル

〔図書〕(計 1 件)

Nakamura S, Seno H, Chiba T. Proton pump inhibitors and gastrointestinal side effects. Chiba T, Malfertheiner P, Satoh H (eds): Proton Pump Inhibitors: A Balanced View. Front Gastrointest Res. Basel, Karger, Vol.32, 92-101, 2013

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妹尾 浩 (SENO, Hiroshi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 90335266

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし