

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830091

研究課題名(和文)大腸がんの発生・進展における免疫-神経系の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of nervous and immune system interactions in development of colon cancer

研究代表者

梶野 リエ (Kajino, Rie)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・研究員

研究者番号：20633184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腸管ポリープを自然発症するApc変異を含む複合変異マウスを用いて、大腸がんの発生・進展における免疫-神経系の関与について検討した。タモキシフェン投与により複合変異マウスの腸上皮特異的にMyD88欠失を誘導したところ、腸管腫瘍数の減少がみられた。次に、神経系因子のうち5つのneuropeptidesについては、サイトカイン刺激により発現が変動し、腸管腫瘍形成への寄与が期待される結果が得られた。これらの結果は、免疫-神経系が大腸がんの発生・進展に関与する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of nervous and immune system interactions in development of colon cancer using a mouse model for colorectal and intestinal cancer. MyD88 plays a central role in innate immunity. Loss of MyD88 function in intestinal epithelial cells, induced by tamoxifen administration, led to a reduction of the number of intestinal tumors in MyD88FL/FL; Apc; Villin-CreERT2 compound mutant mice. In addition, we found that several neuropeptide levels were changed in tumors developed in Apc mutant mice. Among them, expressions of five neuropeptides were affected by stimulation of mouse intestinal organoids with several cytokines. These results suggest that the possible involvement of nervous and immune system interactions in development of colon cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 免疫 神経

1. 研究開始当初の背景

免疫系は生体防御システムであり、我々の体が病原菌などの異物に感染した場合、まず自然免疫応答により炎症を引き起こして感染から身を守ろうとする。しかし一方で、慢性的な炎症は重大な健康傷害を引き起こす。

近年、自然免疫応答の調節に神経系が関与することが明らかになってきた。病原性微生物にさらされる皮膚や腸管には多数の免疫細胞や神経細胞が存在している。ヒトでは腸管神経系の神経細胞総数は数億個ともいわれており、脳からの指令がなくても基本的な機能を遂行することから第二の脳と呼ばれている。最近、マウスにおいて、皮下投与された黄色ブドウ球菌が感覚神経によって直接感知されること、続いてこの感覚神経が neuropeptides を放出して炎症応答を調節していることが示された (Chiu IM., et al., Nature, 2013)。このことから免疫系と神経系が GPCRs と neuropeptides という役者を介して密接に関わり合っている可能性が示唆される。GPCRs は 7 回膜貫通型受容体であり、匂い/感覚受容体 (odorant/sensory GPCRs) と、それ以外の受容体 (nonodorant GPCRs) に分類できる (Regard JB., et al., Cell, 2008)。Nonodorant GPCRs は免疫機能、メタボリズム、恒常性維持等の生理学的機能の制御に関与していると考えられており、ヒトやマウスには約 370 個存在するが、その役割が明らかになっているものはまだ一部である。一方、neuropeptides の遺伝子数は約 90 個であるが、こちらも詳細な機能が明らかになっていないものがある。

がんの発生・進展過程にはがん抑制遺伝子などのがん関連遺伝子の体細胞変異、あるいはエピジェネティックな変化が関与することが知られている。これに加え、近年、がん組織の微小環境における腫瘍間質 (免疫細胞や線維芽細胞を含む) が、がんの発生・進展に影響することが明らかになってきた。実際、

大腸がんにおいて、自己免疫疾患の一つである炎症性腸疾患 (慢性炎症) は炎症発がんの要因として知られている。このことは、発がん及び、がんの浸潤・転移における免疫系の関与を示唆している。また、家族性大腸腺腫症および散発性大腸がん発生初期段階のマウスモデルである $Apc^{+/A716}$ (以下 *Apc*) 変異マウスの腸管上皮では、*Apc* 遺伝子の欠損による Wnt 経路の活性化だけでは微小腺腫しか形成されず、その後の進展には腫瘍間質での COX-2 の発現誘導を伴う炎症応答が必要であることが明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では、*Apc* 変異マウスを用いて、大腸がんの発生・進展における免疫-神経系の関与について検討を行う (図 1)。

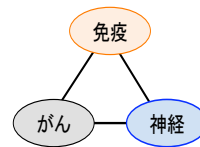


図 1

がんの発生・進展過程には免疫系が関与するが、その詳細な分子メカニズムには不明な点が多く残されている。これまでに申請者は、自然免疫応答を誘導する受容体 TLR のアダプター分子 MyD88 の腸上皮特異的ノックアウトマウスと *Apc* 変異マウスの複合変異マウスの作出を進めてきた。この複合変異マウスでは、炎症応答の中心的転写因子である NF- κ B が活性化されず、自然免疫応答が低下すると考えられる。本研究では、この複合変異マウスの解析を行い、自然免疫応答の異常による大腸がんの発生・進展への影響並びに腸管腫瘍における神経系関連因子への影響を検討する。

先述のように、免疫系と神経系は互いに作用しあうことから、神経系もがんの発生・進展過程に関与する可能性が考えられる。実際、前立腺がんマウスモデルにおいて、自律神経系ががんの進展を制御することを示唆するデータも報告されているが (Magnon C., et

al., Science, 2013)、大腸がんの発生・進展における神経系の関与は不明である。

これまでに申請者は、マイクロアレイにより大腸がんの発生・進展に関与する候補因子の探索を行った。その結果、野生型マウスの回腸部位と比較して、*Apc* 変異マウスの回腸腫瘍部位においていくつかの neuropeptides や GPCRs の発現が変動していた。このうち、例えば GPR110 は肺がんや前立腺がんにおいて過剰発現していることが報告されており (Lum AM., et al., BMC Cancer, 2010)、GPCR5B は炎症応答に関与することが明らかになっている (Kim Y-J., et al., Science Signaling, 2012)。本研究では、免疫系と neuropeptides の大腸がんの発生・進展への関与を検討した。

3. 研究の方法

MyD88 は自然免疫応答の重要なアダプター因子である。腸上皮細胞の自然免疫応答に異常が生じた場合の腸管腫瘍形成への影響を調べるため、タモキシフェン誘導性の *MyD88* 腸上皮特異的ノックアウトマウスと *Apc* 変異マウスとの複合変異マウスである *MyD88^{FL/FL};Apc;Villin-CreERT2* 複合変異マウスを作成した。このマウスを用いて、*MyD88* 欠失により腫瘍の数および大きさに影響がみられるか調べた。

マイクロアレイ解析において *Apc* 変異マウスの腸管ポリープ部位における発現変動がみられた GPCRs や neuropeptides については、まず qRT-PCR 法により発現変動の再現性を確認し、大腸がんの発生・進展への関与が期待される候補因子のしぼりこみを行った。qRT-PCR の結果しぼりこまれた候補因子については、免疫組織化学染色により発現細胞種の同定を試みた。また、腸管正常陰窩および *Apc* 変異マウスの腸管ポリープ由来オルガノイド培養を作製した。オルガノイド培養では腸上皮細胞が選択的に培養され、間質の細胞がのぞかれる。これを用いて、免疫系と

neuropeptide の関連を検討するため、炎症性サイトカイン刺激により neuropeptides の発現変動がみられるか調べた。

4. 研究成果

(1) *MyD88^{FL/FL};Apc;Villin-CreERT2* 複合変異マウスの解析

この複合変異マウスでは、LOHによる*Apc*の機能消失により腸管にポリープが形成される。また、タモキシフェン投与によりMyD88欠失を誘導した場合、腸上皮特異的に自然免疫応答が低下すると期待される。5週齢でMyD88の欠失を誘導し、9週間後の14週齢の時点における腫瘍形成を調べたところ、非投与群と比較して投与群では腫瘍数の減少傾向がみられ、それに伴い脾腫の改善もみられた。同様の傾向

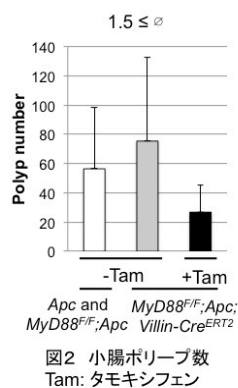


図2 小腸ポリープ数
Tam: タモキシフェン

は、8週齢で *MyD88* の欠失を誘導した場合にも見られた (図2)。次に、この複合変異マウスにおいて形成された腸管腫瘍の性質について免

疫組織化学染色により調べたところ、*Apc* 変異マウスの腫瘍で見られる cJun のリン酸化の亢進や COX-2 の発現増加に顕著な変化はみられなかった。*MyD88* 欠失による腫瘍数減少の原因についてさらなる検討を進めている。

(2) Neuropeptides の解析

神経系因子として GPCRs と neuropeptides に着目しているが、まず neuropeptides の解析を進めた。マイクロアレイ解析において *Apc* 変異マウスの腸管ポリープにおける発現が増加していた neuropeptides について、qRT-PCR 法により発現増加の再現性を確認したところ、neuropeptide Y (NPY) を含む 5 つの

neuropeptidesで再現性が認められた。次に、免疫化学組織染色により各neuropeptideの発現部位を調べた。NPYは神経叢および腫瘍間質で強い発現が認められたが、腫瘍上皮でも若干発現しているようにみえた。そこで、野生型マウスの腸管とApc変異マウスの腸管ポリ

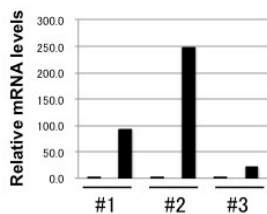


図3 オルガノイド培養におけるNPYの発現
白:野生型由来 黒:ポリープ由来

現を調べた結果、ポリープ由来のオルガノイドで発現が増加していた

(図3)。このことは、NPYの発現が腫瘍上皮でも増加していることを示唆する。また、他のneuropeptidesについても、NPYと同様に腸管腫瘍形成への寄与が期待される結果を得た。

(3) 免疫-神経系の腫瘍形成への関与について

免疫-神経系の関与を検討するため、野生型マウスの腸管とApc変異マウスの腸管腫瘍から作製したオルガノイド培養を、Apc変異マウスの腸管ポリープで発現が増加していた数種のサイトカインで刺激したところ、neuropeptidesの発現変動が認められた。図4に、検討したneuropeptidesの1つである

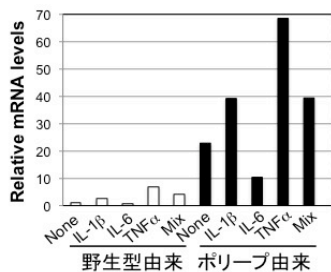


図4 サイトカイン刺激したオルガノイド培養におけるPthlhの発現変動

Pthlhの結果を示す。用いたサイトカインは自然免疫応答で誘導される因子であ

り、検討したneuropeptidesは4. 研究成果の(2)において腸管腫瘍形成への寄与が期待

されたものである。この結果は、免疫系がneuropeptidesの発現調節に関与すること、免疫-神経系が大腸がんの発生・進展に関与する可能性を示唆する。

がんの発症・進展における神経系の働きについては殆ど明らかになっていない。本研究で検討した5つのneuropeptidesは、マウスの腸管ポリープで発現が増加していたものである。さらなる解析によりこれらの作用機序が明らかになれば、大腸がん発生・進展に免疫-神経系がどのように寄与しているのか明らかになると期待される。今後は実験に用いる検体にヒト大腸がん検体も加え、ヒト大腸がんの病態解明と治療を視野に入れた検討を進めていく必要がある。また、がんの進展には、腫瘍間質が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。変異が起きやすいがん細胞よりも間質を標的とする方が薬剤耐性が出現しにくいと言われているので、間質において機能する免疫系因子、神経系因子が同定できれば、将来的に薬剤耐性が出現しにくい分子標的治療薬の確立につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

① 梶野リエ、Analysis of the role of nervous and immune system interactions in development of colon cancer、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶野 リエ (Kajino, Rie)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・研究員

研究者番号: 20633184