

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10537

研究課題名(和文) 癌微小環境における骨髄由来細胞をターゲットとした新たな大腸癌治療戦略

研究課題名(英文) Novel strategy focusing on bone marrow-derived cells in the tumor microenvironment

研究代表者

河田 健二 (KAWADA, KENJI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90322651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルにおいて、大腸癌細胞のSMAD4を発現抑制するとCCL15が発現誘導され肺転移巣周囲にCCR1陽性骨髄球が集簇して肺転移が促進された。臨床検体をもちいた検討では、CCL15陽性肺転移巣ではCCR1陽性骨髄球が多く集簇し、無病生存期間の増悪に関連していた。マウスモデルにおいて、間葉系幹細胞から分泌されたCCL3/CCL4/CCL5は大腸癌細胞に発現しているCCR5を介して腫瘍増殖が促進された。臨床検体をもちいた検討では、大腸癌原発巣でのCCR5高発現は予後不良であり、とくにStage III/IV症例ではその傾向が著明であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌肺転移では、SMAD4の欠損によりCCL15の発現が誘導されCCR1陽性好中球が転移巣周囲に集積し、肺転移が促進されることが示唆された。肺転移巣周囲に集積するCCR1陽性好中球は大腸癌肺転移にたいする新規の治療ターゲットとなり得る。

CCR5発現は病期の進んだ大腸癌症例において予後不良因子であり、またそのリガンドであるCCL3、CCL4の血清高値は予後不良のバイオマーカーになりえる。大腸癌においてCCR5が新たな治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model, CCL15 secreted from SMAD4-deficient colorectal cancer cells recruited CCR1+ cells, promoting their metastatic activities to the lung. Immunohistochemical analysis of clinical samples revealed that CCL15 expression was significantly correlated with loss of SMAD4, and that CCL15-positive lung metastases recruited more numbers of CCR1+ cells than CCL15-negative metastases. Importantly, CCL15 expression was an independent predictor of shorter relapse-free survival.

We found that CCR5 ligands (i.e., CCL3/4/5) were highly produced from mesenchymal stem cells (MSCs) using a chemokine array screening. The xenografts in which CCR5-overexpressing HCT116 cells were highly promoted in vivo by a mixture with MSCs. Notably, the CCR5 inhibitor significantly abolished the MSC-induced tumor growth in vivo. In human clinical specimens, CCR5 expression was associated with patients' prognosis. Especially, stage III/IV patients exhibited a significantly poorer prognosis.

研究分野：小腸大腸肛門外科学

キーワード：ケモカイン 大腸癌 転移 骨髄由来細胞

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年では癌微小環境における間質細胞の癌浸潤・転移に与える役割が注目されており、骨髄由来細胞である骨髄球(ミエロイド細胞)や間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell:MSC)などがある。

(2) ケモカインとその受容体については炎症、アレルギー、感染などばかりでなく、癌浸潤・転移にも関与していることが近年明らかとなってきた。

(3) 申請者らは今までに、大腸癌原発巣や肝転移において大腸癌細胞で癌抑制遺伝子 SMAD4 が欠損するとケモカイン CCL15 が発現誘導され、その結果として癌細胞周囲に CCR1 陽性骨髄球が集簇しマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP2, MMP9)などを分泌して癌浸潤促進、転移巣増大に繋がること、癌組織中の CCL15 発現は術後の無病生存期間の増悪と相関があり、また血中 CCL15 濃度は大腸癌治療の新規バイオマーカーになりえること、を報告してきた。

(4) MSC は癌の悪性化を促進する線維芽細胞としての作用のみならず、上皮間葉転換、腫瘍免疫、癌幹細胞性獲得のニッチ形成などにも関与すると考えられている。MSC と癌細胞との間のケモカイン・シグナルについては、乳癌における CCL5-CCR5 シグナル、CXCL12-CXCR4 シグナル、CXCL10-CXCR3 シグナルなどが報告されている。

2. 研究の目的

(1) 大腸癌の遠隔転移の頻度では肝臓に次ぐ転移先である肺での検討は臨床的意義が高い。そこで大腸癌肺転移における SMAD4 欠損と CCR1 陽性骨髄球との関係について解析を進め、CCL15-CCR1 シグナルの抑制が大腸癌の新規治療ターゲットに結びつくかを検討する。

(2) 大腸癌微小環境における MSC の役割に焦点を当てて解析を進め、大腸癌と MSC との間に作用するケモカイン・シグナルの抑制が大腸癌の新規治療ターゲットに結びつくかを検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス肺転移モデルをもちいて、大腸癌細胞における SMAD4 欠損と CCL15 発現、CCR1 陽性骨髄球の集簇との関係が肺転移促進に関与するかを検証する。

(2) 2006～2013年に当院で大腸癌肺転移に対して肺切除を施行した 81 症例(107 転移巣)の臨床検体をもちいて、肺転移巣周囲への CCR1 陽性骨髄球の集積程度、CCL15 発現や患者予後との相関について検討する。

(3) 肺転移巣周囲に集簇する CCR1 陽性骨髄球についての特性評価を行うため、切除標本を用いて細胞表面マーカーとの蛍光二重免疫染色法を行って検討する。

(4) ヒト MSC やヒト大腸癌細胞の細胞培養液をもちいたケモカイン・アレイを行い、大腸癌細胞と MSC との間でどのようなケモカイン・シグナルが作用しているかをスクリーニングする。そこで抽出された候補について、in vitro 実験および in vivo 実験を行って、そのシグナルの作用機序についての解析を進める。

(5) 2008年に当院で大腸癌原発巣切除を施行した 89 症例の臨床検体をもちいて、免疫組織染色でケモカイン受容体の発現を評価し、患者予後(全生存率(OS)、疾患特異的生存率(CSS)、無病生存率(RFS))との関連性について検討する。

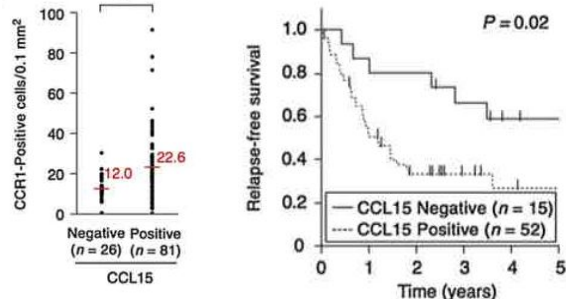
(6) 2011～2014年に当院で手術を施行した 114 症例について、術前の血清サンプルをもちいて ELISA 法にて血液中のケモカイン濃度を測定し、患者予後(OS、CSS、RFS)との関連性について検討する。

4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼを発現させたヒト大腸癌細胞株(HCT116、HT29)を免疫不全マウス(ヌードマウス)の尾静脈に注入して bioluminescent imaging で肺転移巣の増大を経時的に評価したところ、SMAD4 をノックダウンした癌細胞では肺転移が促進され、SMAD4 を強制発現させた癌細胞ではそれが抑制された。免疫組織染色の検討では SMAD4 欠損大腸癌では CCL15 の発現が増加し、肺転移巣周囲に集簇する CCR1 陽性骨髄球が有意に増加していることが確認された。さらに CCR1 阻害剤

(J-113863)をマウスに投与すると、CCR1 陽性骨髄球の集簇が抑制され、肺転移巣も有意に抑制された($P < 0.05$)。

(2)ヒト臨床検体をもちいて SMAD4, CCL15, CCR1 について免疫染色を行って検討したところ、CCL15 発現は SMAD4 陰性と有意に相関し、また CCL15 陽性転移巣では陰性転移巣にくらべ CCR1 陽性骨髄球が約 1.9 倍多く集積していた(12.0 vs.22.6)。CCL15 陽性転移巣では陰性転移巣に比べ無病生存期間(RFS)が有意に亢進しており($P = 0.02$)、また無病生存期間(RFS)に関連する因子の多変量解析にて CCL15 発現は有意な予後因子であることも明らかとなった。



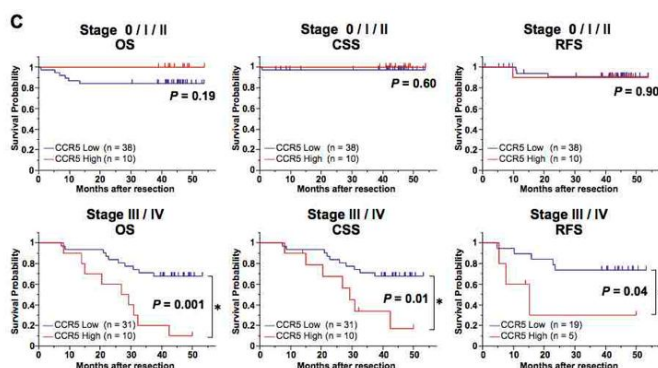
(3)ヒト臨床検体をもちいて CCR1 陽性骨髄球の特性解析を蛍光二重免疫染色法で検討したところ、その多くは MPO(+), CD11b(+), CD15(+), CD16(+), CD33(-), HLA-DR(-)であったことから、腫瘍関連好中球(Tumor-associated neutrophils)であることが明らかとなった。また CCR1 陽性細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ、(MMP2, MMP9)や免疫抑制酵素(ARG1, IDO)らを発現していることが確認された。

(4)ヒト骨髄由来MSCを無血清培地で培養し、その培養上清を用いてケモカイン・アレイを行ったところ、ケモカイン受容体 CCR5 のリガンドである CCL3, CCL4, CCL5 が多量に MSC より分泌されていることが明らかとなった。一方、CCR5 はフローサイトメトリーにより大腸癌細胞株の細胞質内に高発現していることが分かった。免疫不全マウス(ヌードマウス)に MSC と大腸癌細胞株を共接種したところ、検証した3細胞株(SW480, HT29, HCT116)すべてにおいて大腸癌細胞株単独を接種した場合に比べ腫瘍増殖が有意に促進された。

(5)HCT116 細胞に CCR5 を強制発現させた株(HCT116-CCR5)を作成し、CCR5 を介した大腸癌細胞株への影響を *in vitro* 実験で検討した。CCR5 リガンド(CCL5)刺激で HCT116 細胞、HCT116-CCR5 細胞いずれも細胞増殖の亢進を認めるものの CCR5 強制発現による影響はなく、CCR5 非依存性と考えられた。一方、Transwell migration assay においては HCT116-CCR5 細胞でのみ有意な細胞遊走能の亢進が確認された。次に、MSC と大腸癌細胞株との相互作用における CCR5 の役割について検討するため、MSC と CCR5 強制発現株(HCT116-CCR5)とを免疫不全マウス(ヌードマウス)に共接種したところ、CCR5 を強制発現させることで MSC による大腸癌細胞の腫瘍増殖効果が著しく促進されること($P < 0.05$)が明らかとなった。

(6)CCR5 は CXCR4 と共に HIV ウイルスの免疫細胞への細胞侵入時に利用される受容体で、その阻害剤(Maravi roc)はすでに HIV 治療薬として臨床応用されている。CCR5 阻害が様々な癌種に対する新たな治療法として近年注目されており、大腸癌においても phase I study で臨床応用が近年報告された。そこで MSC と CCR5 強制発現株(HCT116-CCR5)とを共接種させて形成されたマウス皮下腫瘍に対して Maravi roc を継続投与したところ、CCR5 強制発現により得られた腫瘍増殖促進効果が著しく抑制され($P < 0.05$)、Maravi roc による抗腫瘍効果が確認された。

(7)大腸癌原発巣での CCR5 発現を免疫組織染色にて評価したところ、CCR5 高発現群(20 例)は低発現群(69 例)に比べ OS, CSS, RFS すべてにおいて予後が悪い傾向が認められた($P = 0.08$, $P = 0.07$, $P = 0.22$)。病期ごとのサブグループ解析では、Stage I/II 症例では予後の差は認められなかったが、Stage III/IV 症例では CCR5 高発現群が有意に予後不良であった($P = 0.001$, $P = 0.01$, $P = 0.04$)。



(8)CCR5 リガンド(CCL3, CCL4, CCL5)の血清値をELISAにて測定し中央値で二群に分け予後を検討したところ、CCL3,CCL4では高値群で有意にOS,CSSで予後不良であったが、CCL5はOS, CSS, RFSへの影響は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Yamamoto T, Kawada K, Itatani Y, Inamoto S, Okamura R, Iwamoto M, Miyamoto E, Chen-Yoshikawa T, Hirai H, Hasegawa S, Date H, Taketo MM, Sakai Y.
Loss of SMAD4 Promotes Lung Metastasis of Colorectal Cancer by Accumulation of CCR1+ Tumor-associated Neutrophils through CCL15-CCR1 Axis.
Clin Cancer Res. 査読有. 23(3):833-844.2017.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0520.

Mizuno R, Kawada K, Itatani Y, Ogawa R, Kiyasu Y, Sakai Y.
The role of tumor-associated neutrophils in colorectal cancer.
Int J Mol Sci. 査読有. 20(3).pii:E529.2019.
doi: 10.3390/ijms20030529.

Nishikawa G, Kawada K, Nakagawa J, Toda K, Ogawa R, Inamoto S, Mizuno R, Itatani Y, Sakai Y.
Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression via CCR5.
Cell Death Dis. 査読有. 10(4):264.2019.
doi: 10.1038/s41419-019-1508-2.

[学会発表](計 1 件)

Nishikawa G, Kawada K, Sakai Y.
Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression via CCR5.
2019 ASCRS (American Society of Colon & Rectal Surgeons) Annual Meeting.
2019/6/3.
Cleveland, OH, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://gisurg.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

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: 武藤誠
ローマ字氏名: TAKETO, makoto

研究協力者氏名: 平位秀世
ローマ字氏名: HIRAI, hideyo

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。