

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07196

研究課題名(和文) 腫瘍微小環境における好中球をターゲットとした新規大腸がん治療戦略の構築

研究課題名(英文) New therapeutic strategy against neutrophil in the tumor microenvironment of colon cancer

研究代表者

板谷 喜朗 (Itatani, Yoshiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80814029

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)：本研究では、大腸癌のモデルマウスを用いて大腸癌の腫瘍微小環境における好中球の腫瘍促進能の解明を試みた。好中球は感染防御の観点から必須な宿主細胞である一方、担癌患者においては、腫瘍を促進する方向に働くことが知られている。好中球の感染防御機能を維持しつつ、腫瘍促進能のみを抑制することで、副作用の少ない治療法の確率につながると考えた。大腸癌の分類のなかで、CMS4と呼ばれる予後が悪く抗VEGF抗体が効きにくいものでは、腫瘍周囲に好中球が多く集積し、好中球由来の血管新生因子Bv8が分泌されていた。抗VEGF抗体治療に加えて、抗Bv8抗体治療も追加することで、CMS4型のマウス大腸癌の進行が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CMS4大腸癌は予後不良で、大腸癌治療のキードラッグの抗VEGF治療に抵抗性を示すことが知られている。今回我々の研究では、CMS4大腸癌の抗VEGF治療耐性に好中球が深く関与すること、好中球由来の血管新生因子Bv8をVEGFとともに阻害することで、抗VEGF治療耐性が解除されることを、自然発生大腸癌マウスモデルを用いることで、より実臨床に近い環境で解明した。本邦において、大腸癌はがん死亡数では肺癌に次ぐ2番目の死亡数で、最新がん統計によると2019年は約5万人が大腸癌で死亡したとされる。本研究結果が臨床応用されれば、これらの患者の治療に有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reveal tumor promotive function of neutrophils in the tumor microenvironment of colon cancer, using mouse models of colon cancer. Neutrophil is one of the important host immune cells. However, it is also known that neutrophils promote tumor progression in the tumor microenvironment. It becomes an attractive therapeutic strategy to suppress only tumor promotive function of the neutrophils without affecting protective function against infection. CMS4 colon cancer shows poor prognosis, with resistance to anti-VEGF treatment. We found that neutrophils accumulated in the tumor microenvironment of CMS4 mouse colon cancer, secreting Bv8 angiogenic factor. When treating anti-Bv8 antibody in addition to anti-VEGF antibody, tumor formation of CMS4 mouse colon cancer was suppressed.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌 腫瘍微小環境 好中球 血管新生 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

腫瘍微小環境においては、免疫細胞が複雑にネットワークを形成し癌浸潤を抑制または促進することが知られている。免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitor, ICI, 抗 PD-L1/PD-1 抗体など) は腫瘍微小環境の免疫細胞をターゲットにした抗がん剤の代表であり、近年広く実臨床で応用されている。すなわち、癌細胞が T 細胞からの攻撃を回避する経路を遮断することで、癌腫によっては著明な効果を示す。大腸癌においても癌組織への T 細胞の浸潤が予後と相関することが報告されており (Immune Score, *Calon_Science*2006)、ICI の効果が期待されたが、実際はマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability, MSI) を示す一部の癌を除いて効果が乏しいという結果であった (Le_NEngJMed2015)。したがって、大半の大腸癌の腫瘍微小環境では、T 細胞による PD-L1/PD-1 経路などでの癌免疫抑制以外に、別の免疫系の細胞 (例えば好中球など) が主に関与する未解明の機序が存在することが示唆される。

昨今の網羅的な分子レベルでの解明により、大腸癌においては 4 種類の分子サブタイプに分類されることがわかってきた (consensus molecular subtyping, CMS)。CMS1 は MSI を有する、免疫反応が強く再発すると予後が悪いが、ICI 治療による効果の高いサブタイプ、CMS2 は従来型、CMS3 は KRAS 変異を有する代謝型、CMS4 は間質型と呼称される、間質への強い炎症細胞浸潤と TGF β シグナルの亢進、血管新生を認め、抗がん剤が効きにくく予後の悪いサブタイプである。間質型の CMS4 は腫瘍微小環境での強い炎症反応の亢進は、抗がん剤耐性や予後不良の観点で、臨床上非常に重要な分子サブタイプであることがわかる。

免疫細胞の中でも過半数を占める好中球は、感染症の際の免疫応答で重要な役割を果たし、特に担癌患者の化学療法中に見られる好中球減少症は時に致命的な感染症をきたしうる。しかし、血中の好中球/リンパ球の割合 (neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR) が高い担癌患者は予後が悪いことが知られており、好中球は癌の進展を促進する方向に働くと考えられている。

申請者らは、これまで大腸癌において高頻度に見られる癌抑制因子 SMAD4 の欠損により、ケモカイン CCL15 が癌細胞から分泌され、CCR1 陽性の好中球系の骨髄由来細胞 [granulocytic myeloid-derived suppressor cells (g-MDSC) や tumor-associated neutrophil (TAN)] が腫瘍周囲に集積し、癌の浸潤、転移を促進することを報告してきた。また、大腸癌細胞での SMAD4 の欠損や CCL15 の発現上昇、腫瘍周囲への CCR1 陽性細胞の集積数は、癌の進行度や患者の予後と相関が見られることを報告した (Itatani_Gastroenterology2013、Inamoto_ClinCancerRes2016、Yamamoto_ClinCancerRes2017)。しかし、好中球系の骨髄由来細胞が局所で癌浸潤を促進するメカニズムはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌の腫瘍微小環境において、好中球がどのように癌浸潤を促進するのかを解明し、好中球の感染防御能を保持したまま、癌進展の補助能を抑制する治療ターゲットを模索することにある。癌の進展には腫瘍微小環境が重要であり、好中球系の細胞は癌の進展や抗がん剤耐性に深く関与することが示唆されているが、その機能はほとんど解明されておらず、実際に腫瘍微小環境中の好中球をターゲットとした薬剤は臨床応用されていない。

本研究では、腫瘍微小環境への好中球浸潤を促進する因子を同定し、好中球浸潤による抗がん剤の効果に対する影響を検証する。さらに、好中球浸潤促進因子による担癌患者での好中球の変化を観察し、好中球の正常感染防御能を保持しつつ、腫瘍微小環境での癌促進能を抑制する新規の治療ターゲットを模索する。

3. 研究の方法

家族性大腸腺腫症のモデルマウス (*Apc* マウス) は小腸に多発腫瘍を形成する。この *Apc* マウスに化学的に大腸炎を引き起こす薬剤 dextran sulfate sodium (DSS) を服用させると (DSS-*Apc* マウス)、大腸に多発腫瘍を形成する。我々は、この DSS-*Apc* マウスにおいては、DSS 未投与でも発生する小腸腫瘍の腫瘍微小環境には好中球をほとんど認めないが、DSS 投与で大腸炎をきたした後に発生する大腸腫瘍の腫瘍微小環境では強い好中球浸潤を認めることを見出した。

Apc マウスは腺腫のモデルではあるが、大腸癌のモデルではない。そこで、我々は *Apc* 変異に *Smad4* の欠損を加えた、CMS2 類似の従来型の大腸癌モデルマウス (*Apc/Smad4* マウス) や、さらに *Kras* (*G12D*) 変異を加えた CMS3 の代謝型の大腸癌モデルマウス (*Apc/Smad4/Kras* マウス) に DSS を服用させて、強い間質反応を伴う CMS4 類似の大腸癌モデルマウス (DSS-*Apc/Smad4* マウスと DSS-*Apc/Smad4/Kras* マウス) を用いて腫瘍微小環境における好中球の機能解明を行うこととした。

Apc/Smad4 マウスには、全身で *Apc* (+/ Δ 716) 変異と *Smad4* (+/-) 変異を有するマウス

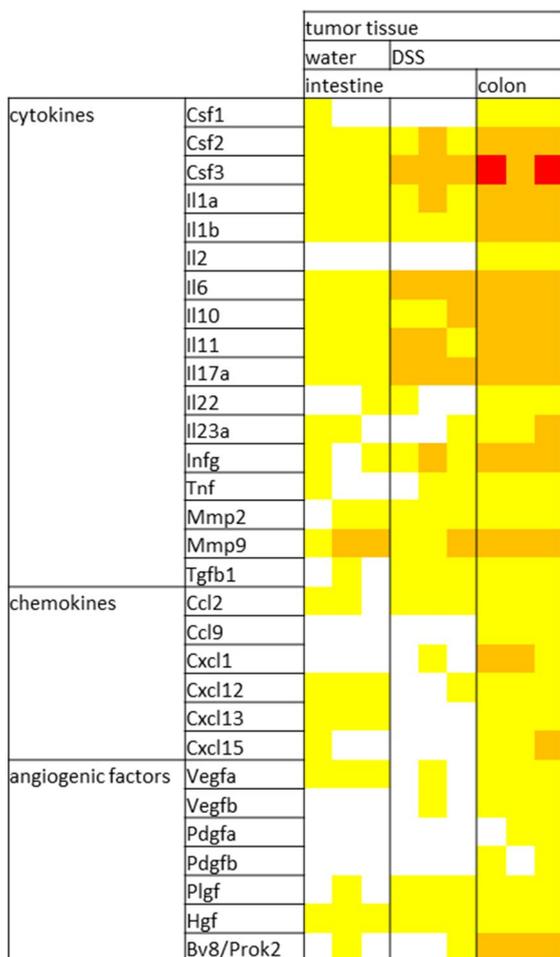
を使用した。*Apc* 遺伝子と *Smad4* 遺伝子はマウスでは同一染色体上に存在するため、cis 変異 [*Apc(delta716)*変異と *Smad4(-)*が同一アレルに配列する]では腸管(主に小腸、時に大腸)上皮で loss of heterozygosity (LOH)を生じる事により、部分的に腸管上皮に *Apc*変異と *Smad4*欠損が同時におこり、同部位の腸管上皮の腫瘍化・癌化を引き起こす。さらに *Kras(G12D)*変異を加える際には、小腸と大腸の上皮特異的に発現する *Villin*プロモーター下で Cre を発現するマウスや[胎生期より腸管上皮で *Kras(G12D)*変異を有する]、大腸上皮特異的に発現する *CDX2*プロモーター下で Cre-ErT2 を発現するマウス[DSS 投与前にタモキシフェンを投与し、大腸上皮のみに *Kras(G12D)*変異を発現させておく]を組み合わせることで、腸管上皮において *Apc/Smad4/Kras*変異をきたすことを達成した。

マウスの小腸癌や大腸癌の定量的解析には、Keyence の BZ-X700 顕微鏡を用いて、小腸と大腸の全体の写真を保存後に Image J ソフトを用いて再現性を担保できるように行った。

マウスからの腫瘍細胞の単離では、既報(Miyoshi_NatProtocol2013)に準じて Matrigel 内で三次元培養を行った。癌上皮細胞が単層に管腔様の sphere を形成することから、これを spheroid と呼称している。

4. 研究成果

DSS-*Apc/Smad4* マウスで DSS 投与により発生した大腸癌では、DSS 未投与の *Apc/Smad4* マウスや DSS- *Apc/Smad4* マウスでも元々から観察される小腸癌と比較すると、腫瘍内で血管新生因子や TGF の発現亢進を認め、CMS4 類似の大腸癌が形成されることがわかった(図1)。さらにこの DSS-*Apc/Smad4* マウスの大腸癌では、小腸癌に比べて腫瘍間質に強い好中球浸潤を認めた。ヒト大腸癌では、CMS4 は血管新生と TGF の亢進を認め、抗がん剤に耐性が強く予後が悪く、また、NLR の高い大腸癌も予後が悪いことから、我々が作出した DSS-*Apc/Smad4* マウスの CMS4 類似の大腸癌は臨床上重要となる大腸癌のモデルとなりうると考えられた。

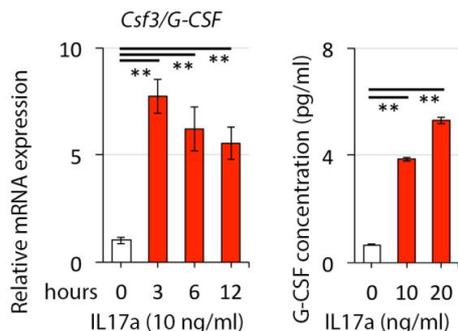


(図1)

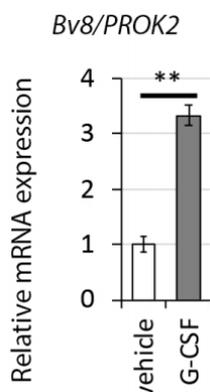
CMS4 大腸癌では血管新生が亢進し、進行大腸癌治療におけるキードラッグである抗 VEGF 抗体に抵抗性を示すことが知られている。我々は *Apc/Smad4* マウスと DSS-*Apc/Smad4* マウスを、抗 VEGF 抗体を用いて治療したところ、CMS2 類似の小腸癌は著明な縮小効果を認めたのに対して、CMS4 類似の大腸癌では抗 VEGF 抗体治療に抵抗性を示した。ここで抗 VEGF 抗体治療が有効な *Apc/Smad4* マウスと無効な DSS-*Apc/Smad4* マウスの血漿を用いてサイトカインアレイで炎症性サイトカインの発現量を網羅的に比較すると、抗 VEGF 抗体治療抵抗性の DSS-*Apc/Smad4*

マウスでは血漿 G-CSF が異常高値を示した。これは、同一 DSS-*Apc/Smad4* マウスにおいても、抗 VEGF 抗体治療が有効な小腸癌と無効な大腸癌との癌組織中の発現量の比較においても、大腸癌で G-CSF の発現が亢進し、強い好中球浸潤を伴っていることから、腫瘍由来と考えられた。

そこで我々は DSS-*Apc/Smad4* マウスの大腸癌から腫瘍細胞のみを単離し、三次元 spheroid 培養を行い、*ex vivo* での解析を行った。この spheroid に G-CSF の上流の因子として知られる IL17 を添加すると G-CSF の発現上昇が見られた (図 2)。実際に DSS-*Apc/Smad4* マウスの大腸癌の腫瘍組織中の IL17 の発現も亢進していた。さらに *Apc/Smad4* マウスの血液から好中球を単離し、G-CSF で刺激すると、好中球由来の血管新生因子 Bv8 の発現上昇を認めた (図 3)。実際に DSS-*Apc/Smad4* マウスの大腸癌の腫瘍組織中の Bv8 の発現も亢進していた。



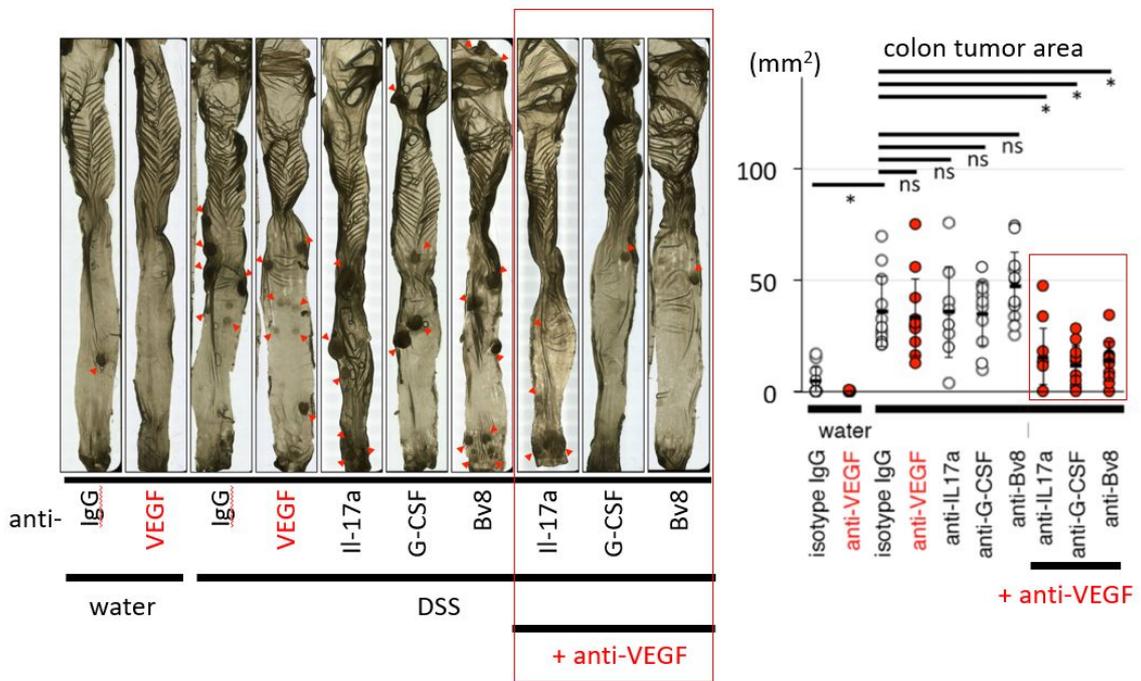
(図 2)



(図 3)

以上をまとめると、DSS-*Apc/Smad4* マウスにおいて、炎症により惹起された IL17 の発現が癌細胞の G-CSF 発現を亢進させ、腫瘍組織中に好中球を誘導し、さらに誘導された好中球は G-CSF の刺激で血管新生因子 Bv8 を発現させるため、DSS-*Apc/Smad4* マウスでは抗 VEGF 抗体抵抗性の大腸癌が生じると考えられた。

さらに本現象を *in vivo* で検証するため、DSS-*Apc/Smad4* マウスを抗 VEGF 抗体に加え、抗 IL17 抗体、抗 G-CSF 抗体や抗 Bv8 抗体で治療した。各抗体治療は単独では抗腫瘍効果を認めなかった。次に抗 VEGF 抗体に抗 IL17 抗体、または抗 G-CSF 抗体、または抗 Bv8 抗体を組み合わせると、抗腫瘍効果を認めた (図 4)。以上より、抗 VEGF 抗体治療抵抗性は腫瘍微小環境中の好中球が担っており、好中球浸潤そのものを抑制するか (抗 IL17 抗体または抗 G-CSF 抗体) または腫瘍微小環境中の好中球の機能を抑制するか (抗 Bv8 抗体) で抗 VEGF 抗体治療抵抗性を打ち消すことができると考えられた。本現象は DSS-*Apc/Smad4/Kras* マウスにおいても同様であった。



(図 4)
 以上の結果は PNAS 誌に 2020 年に報告した。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Itatani Y, Yamamoto T, Zhong C, Molinoro AA, Ruppel J, Hegde P, Taketo MM, Ferrara N	4. 巻 117
2. 論文標題 Suppressing neutrophil-dependent angiogenesis abrogates resistance to anti-VEGF antibody in a genetic model of colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 21598-21608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2008112117	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 該当する
1. 著者名 Itatani Y, Kawada K, Sakai Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Transforming Growth Factor- Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E5822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20235822	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 Mizuno Rei, Kawada Kenji, Itatani Yoshiro, Ogawa Ryotaro, Kiyasu Yoshiyuki, Sakai Yoshiharu	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 529 ~ 529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20030529	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 Itatani Yoshiro, Kawada Kenji, Yamamoto Takamasa, Sakai Yoshiharu	4. 巻 19
2. 論文標題 Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer?Alterations to Anti-VEGF Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1232 ~ 1232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19041232	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 板谷喜朗
2. 発表標題 実臨床を模した大腸癌マウスモデルの作出 自然発生大腸癌の薬剤耐性モデルや肝転移モデルの作成と癌治療のネクストステージ
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板谷喜朗
2. 発表標題 大腸癌腫瘍微小環境でのサイトカイン/ケモカインネットワークと腫瘍免疫
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2019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
---------	---------