

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09170

研究課題名(和文) 大腸癌微小環境におけるケモカイン・シグナルを標的とした治療戦略

研究課題名(英文) targeting strategy for chemokine signaling in colorectal cancer microenvironment

研究代表者

河田 健二 (Kawada, Kenji)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90322651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CCR1+骨髄球をターゲットにしたCCR1シグナルについては、放射線照射後の骨髄移植マウスモデルにおいてCCR1ノックアウトマウスの骨髄を移植すると皮下腫瘍モデルや肝転移モデルにおいて腫瘍増大や肝転移が有意に抑制された。また我々が開発した抗CCR1抗体を投与したモデルでも抗CCR1抗体投与群は腫瘍増大や肝転移が有意に抑制された。

CXCL1/8-CXCR2シグナルについては、臨床検体や細胞株を用いた検討により大腸癌におけるSMAD4抑制がケモカインCXCL1、CXCL8の分泌を促進し、その結果としてCXCR2+好中球が集簇することで大腸癌の腫瘍促進に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸癌において癌抑制遺伝子SMAD4欠損を起因とするTGF-betaシグナル異常が癌微小環境における骨髄球集簇にどのように関与するかに焦点を当て、CCR1+骨髄球をターゲットにしたCCL15-CCR1シグナル、CXCR2+好中球をターゲットとしたCXCL1/8-CXCR2シグナル、の2つのケモカイン・シグナルが大腸癌に対する新規治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In two syngeneic mouse models (MC38 transplanted tumor model and CMT93 liver metastasis model), lack of the Ccr1 gene in host mice dramatically reduced MC38 tumor growth as well as CMT93 liver metastasis. We further investigated the role of CCR1 depletion in myeloid cells using bone marrow (BM) transfer experiments, and found that mice reconstituted with Ccr1^{-/-} BM exhibited marked suppression of MC38 tumor growth and CMT93 liver metastasis. Consistent with these results, administration of a neutralizing anti-CCR1 Ab significantly suppressed MC38 tumor growth and CMT93 liver metastases.

Using clinical specimens and human colorectal cancer (CRC) cell lines, we found that loss of SMAD4 from CRC cells resulted in the secretion of CXCL1 and CXCL8 to recruit CXCR2+ neutrophils, and that, in turn, the recruited neutrophils abundantly produced CXCL1 and CXCL8, which could help to further accumulate CXCR2+ neutrophils. Serum CXCL8 levels in CRC patients were associated with patients' prognosis.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 ケモカイン 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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、なかでも骨髓由来細胞が癌細胞に及ぼす影響については注目が集まっている。

(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) TGF- β シグナルの異常は種々の癌において重要な役割を果たしているが、そのシグナルの中心となる転写因子 SMAD4 は大腸癌では癌抑制遺伝子としてその発生・進展に関与する。申請者らは今までに、大腸癌原発巣や転移巣(肝転移・肺転移)において大腸癌細胞において SMAD4 が欠損することでケモカイン CCL15 が発現誘導され、その結果 CCL15 と親和性のある CCR1⁺ 骨髓球が腫瘍周囲に集簇し、マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP2, MMP9)や ARG1, iNOS らを分泌して組織破壊、血管新生、抗がん免疫抑制が促進し、癌の浸潤転移に寄与すること、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)大腸癌の癌微小環境における SMAD4 発現と骨髓球集簇との関連性については、CCL15-CCR1 以外のケモカイン・シグナルが関与する可能性が考えられる。その仮説のもと、SMAD4 発現が正常なヒト大腸癌細胞株に shRNA 法にて SMAD4 発現を抑制した細胞株を樹立しケモカイン・アレイでスクリーニングしたところ、SMAD4 発現を抑制することで発現誘導されるケモカインとして CXCL1 と CXCL8 があることを申請者らは見出した。これらのケモカインと親和性のある受容体は CXCR2 であり、CXCR2 は好中球で発現していることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌において SMAD4 欠損を起因とする TGF- β シグナル異常が骨髓球集簇にどのように影響するかに焦点を当てて、CCL15-CCR1、CXCL1/8-CXCR2 の2つのケモカイン・シグナルが大腸癌において新規治療ターゲットになりえるかを検証することである。

3. 研究の方法

(1) 前臨床試験として同系マウスモデルを用いた *in vivo* 実験で検討する。使用する同系マウスモデルとして、マウス由来の大腸癌細胞株である MC38 細胞(皮下接種モデル)と CMT93 細胞(肝転移モデル)を用いる。実験方法としては放射線照射後の骨髓移植モデル、CCR1 阻害薬投与モデル、に大別される。は wild-type マウスに放射線照射した後に CCR1 ノックアウトマウスまたは wild-type マウスの骨髓を尾静注して骨髓細胞を置換させ、そののちに上述の Luc 導入大腸癌細胞を接種し大腸癌の増殖・転移を発光イメージングを用いて定量評価する。は臨床応用を考えて大腸癌細胞株を wild-type マウスに接種してのちに CCR1 阻害薬を投与するものであるが、申請者は CCR1 を特異的に阻害する中和抗体の作成に成功しており、それらを使用して検討する。また CCR1⁺ 骨髓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。

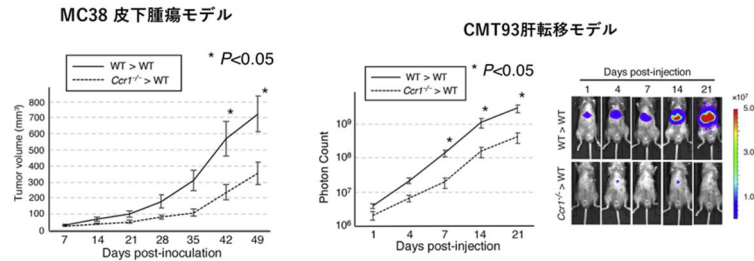
(2) SMAD4 欠損と骨髓球集簇に関与するケモカインを明らかにするため、SMAD4 を発現している大腸癌細胞株(SW837 および Caco2)に対し shRNA 法にて SMAD4 を抑制した細胞株を樹立した。そこで SMAD4 欠損細胞株の上清に対するヒト好中球の走化性を migration assay で検討したり、ヒト好中球を大腸癌細胞と共培養した際におこる形質変換についてケモカイン・アレイ、血管新生アレイ、リン酸化キナーゼアレイ等で検討し、そのシグナルの作用機序についての解析を進める。

(3) 2005~2006 年に当院で大腸癌に対して原発巣切除を施行した 99 症例の臨床検体を持ちいて、CXCR2⁺ 骨髓球の原発巣周囲への集積程度、SMAD4 発現や患者予後との相関について検討する。また CXCR2⁺ 骨髓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) 2011~2018 年に当院で手術を施行した 125 症例について、術前の血清サンプルを持ちいて ELISA 法にて血液中のケモカイン濃度(CXCL1、CXCL8)を測定し、患者予後(全生存率(OS)、無病生存率(RFS))との関連性について検討する。

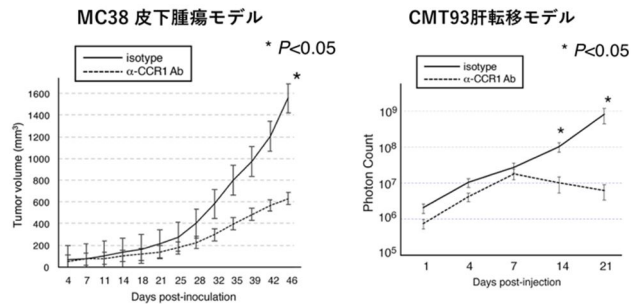
4. 研究成果

(1) 放射線照射後の骨髄移植モデルでは、CCR1 ノックアウトマウスの骨髄を移植したマウスは wild-type マウスの骨髄を移植したマウスに比べ、MC38 皮下腫瘍モデルにおいて有意に腫瘍増殖が抑制された。さらに CMT93 肝転移モデルにおいて



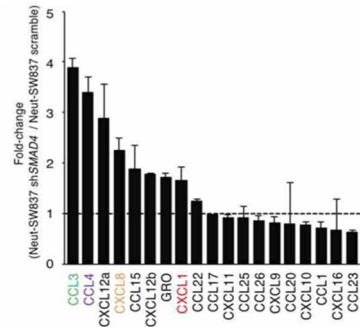
癌細胞の発現するルシフェラーゼを bioluminescent imaging で経時的に評価したところ、CCR1 ノックアウトマウスの骨髄を移植したマウスは有意に肝転移巣形成が抑制された。蛍光免疫組織染色の検討では CCR1⁺ 骨髄球はマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP2, MMP9) や免疫抑制酵素 (iNOS)、血管新生因子 (VEGF) を発現していることが確認された。

(2) CCR1 阻害薬投与モデルでは、MC38 皮下腫瘍モデルにおいて、我々の開発した抗 CCR1 抗体 (KM5908) を 2 回/週の頻度で皮下注射したところ、isotype コントロール群に比べ有意に腫瘍サイズが抑制された。さらに CMT93 肝転移モデルにおいても検討したところ、腫瘍接種後 14 日以降において有意に肝転移巣が抑制されることが明らかとなった。

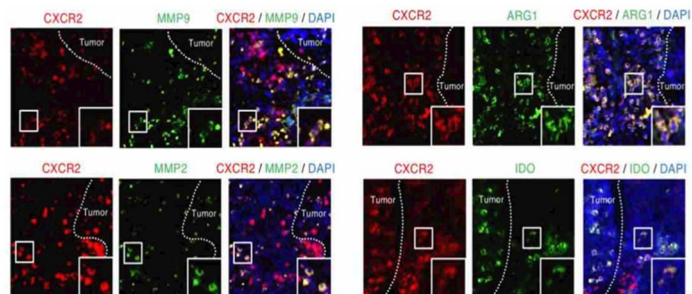


(3) SMAD4 欠損細胞株の上清に対するヒト好中球の走化性を migration assay で検討したところ、CXCL1 および CXCL8 の中和抗体はその遊走能を有意に抑制するとともに、CXCR2 阻害剤 (SB225002) では劇的に抑制された。

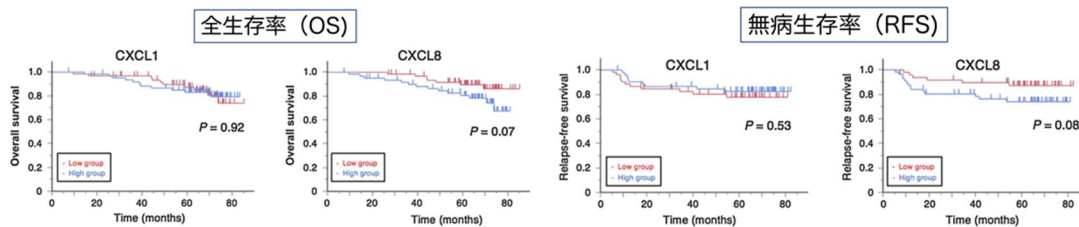
(4) 大腸癌細胞と共培養したヒト好中球をケモカイン・アレイでスクリーニングしたところ、SMAD4 陰性大腸癌細胞と共培養した際に好中球で発現誘導がかかるケモカインとして、CXCL8、CXCL1 に加え CCL3、CCL4 などがあることが明らかとなった。さらに血管新生アレイからは CXCL8、IL-1、ANGPT などが、リン酸化キナーゼアレイからは FAK、Src などが誘導されることが見出された。



(5) 実際の臨床検体の検討では大腸癌周囲に集簇している CXCR2⁺ 好中球は MMP2, MMP9, ARG1, IDO を分泌して、組織破壊、血管新生、抗がん免疫抑制等の機能をもつことが明らかとなった。また SMAD4 発現と好中球集簇 (CD66b 染色) について検討したところ、両者は有意な逆相関関係にあり、SMAD4 陰性かつ好中球高集簇は患者予後の増悪因子であることが明らかとなった。



(6) 手術を施行した 125 症例について、CXCL1 および CXCL8 の術前血清値を ELISA にて測定し中央値で二群に分け予後との関連を検討したところ、CXCL8 は高値群で OS、RFS で予後不良であった ($P=0.07$ および 0.08)。一方、CXCL1 については高値群、低値群の間にとくに予後との間に相関関係は認められなかった。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kiyasu Y, Kawada K, Hirai H, Ogawa R, Hanada K, Masui H, Nishikawa G, Yamamoto T, Mizuno R, Itatani Y, Kai M, Taketo MM, Sakai Y.	4. 巻 487
2. 論文標題 Disruption of CCR1-mediated myeloid cell accumulation suppresses colorectal cancer progression in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 53, 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2020.05.028.	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 19. Ogawa R, Yamamoto T, Hirai H, Hanada K, Kiyasu Y, Nishikawa G, Mizuno R, Inamoto S, Itatani Y, Sakai Y, Kawada K	4. 巻 25
2. 論文標題 Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via CXCL1/8-CXCR2 axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2887, 2899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-3684	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kawada K, Itatani Y, Tsunoda S, Obama K.
2. 発表標題 Blockade of CCR1+ myeloid cells suppresses rectal cancer progression in syngeneic mouse models.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------