

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599008

研究課題名(和文)

活性化マクロファージを標的とする大腸腫瘍の治療・予防の試み

研究課題名(英文)

Prevention and treatment of colorectal cancer by regulating macrophage activation.

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

研究成果の概要(和文)：大腸癌の進展には、癌細胞と間質の活性化したマクロファージの相互作用が大きく影響する。本研究では、癌の間質で発現するインターフェロン $\gamma$ が、Trem-2、Cox-2などの因子によって発現調節を受け、マクロファージを活性化させることを示した。活性化したマクロファージには抗腫瘍効果があるため、これらの諸因子を利用することによって、大腸癌治療に新たな展開が期待しうると思われた。

研究成果の概要(英文)：During colorectal cancer progression, the interaction between cancer cells and stromal macrophages plays a crucial role. In this study, we demonstrated that interferon-gamma, which was regulated Trem2 or Cox-2, altered the activation status of tumor associated macrophages. Classically activated macrophages have a potential to inhibit cancer progression. We propose a novel therapeutic strategy against colorectal cancer by using activated macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	0	1,000,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	720,000	4,120,000

研究分野：消化器内科学

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：マクロファージ、大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

世界の腫瘍死の上位を占める大腸癌では、癌細胞と癌間質の相互作用が大きな役割を果たす。特に癌間質にリクルートされ活性化したマクロファージ(tumor associated macrophage、以下 TAM)は、多くの癌で予後不良因子とされる。近年のマ

クロファージ研究の進展にともない、マクロファージの活性化状態は大きく classical activation (以下 M1) と、 alternative activation (以下 M2) 系のふたつに分類されることが明らかとなった。多くの進行癌では、ほとんどの TAM は M2 系マクロファージとされ、血管新生や腫瘍

増大に寄与する因子の分泌を通じて、癌の増大を促進する。一方、M1 マクロファージは抗腫瘍効果をもつことが推定されており、マクロファージの活性化状態を M2 から M1 へ変化させることで、抗腫瘍効果をもつことが動物実験等で示されつつあった。しかし大腸癌の進展過程で、TAM がいつ、何によってリクルートされ、どのように活性化されるのか、それまで十分には検討されていなかった。さらに大腸癌では TAM の浸潤は予後良好因子とする報告もあったため、大腸癌における TAM の独自の役割については未知の点が多く残された状況であった。

## 2. 研究の目的

過去、研究代表者は腸管局所におけるマクロファージの活性化状態を M2 から M1 へ変化させ、腸上皮細胞の増殖を抑制することに成功した。そこで研究代表者は、TAM の活性化状態を人為的に変化させることにより、大腸癌上皮細胞の増殖を抑制し、ひいては大腸癌の進展予防・治療につながる可能性を考えた。事実、他家の報告により、その可能性を支持する実験結果も示されつつあったため、本研究では、まず TAM が大腸癌にリクルートされる機序を検討することとした。次いで、種々の遺伝子改変マウスや、マウス内視鏡を利用した RNAi 投与により、TAM の活性化状態を M2 から M1 に変化させ、TAM を介した大腸癌の進展予防・治療の可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) *Apc<sup>Min/+</sup>*マウスおよびマウスから単離したマクロファージやヒト・マクロファージ細胞株を用いて、TAM のリクルートおよび活性化を行う因子を検討した。
- (2) *Apc<sup>Min/+</sup>*マウスおよび *NRDc<sup>+/-</sup>*マウスなどの遺伝子改変マウスを用いて、TAM の活性化因子を包括的に解析するとともに、それらの因子がマウス腸腫瘍の個数・サイズに及ぼす影響を検討した。

- (3) 上記の種々の遺伝子改変マウスに対して、マウス内視鏡を用いて、TAM を標的とする局所治療へ向けた予備実験を行った。

## 4. 研究成果

- (1) *Apc<sup>Min/+</sup>*マウスの腸腫瘍において、細胞外ドメイン・シェディングを介して種々のサイトカインや増殖因子の活性を調節する N-arginine dibasic convertase (NRDc) が、CCL2 などの代表的マクロファージ遊走因子の発現を制御し、マクロファージの腫瘍局所への遊走を制御することを見いだした。また、マクロファージ特異的に発現する Trem2 の有無が、マクロファージの活性化状態を M2 に変化させる上で必須であることも示した。Trem2 のノックアウトマウスでは、腸上皮細胞の増殖が抑制されうることも確認し、腸腫瘍における Trem2 の役割の解析を進めた。さらに、NRDc によって腫瘍間質における発現が制御される Cox-2 が、マクロファージの活性化を制御することを見いだした。Cox-2 によるマクロファージの活性化制御に際して最も重要なサイトカインは、腫瘍間質に浸潤する T 細胞および NK 細胞から産生される IFN-gamma であり、IFN-gamma 増加に伴って TAM の活性化状態が M2 から M1 に変化することを確認した。その結果、マウス腸腫瘍は、数・大きさも減少していた。これらのマウスにおけるマクロファージの活性化制御機構は、ヒト・マクロファージ細胞株 THP-1 およびマウス腹腔内マクロファージでも同様であることを確認した。これらの実験により、マウス腸腫瘍における種々のサイトカイン・ネットワークの役割を明らかにするとともに、その制御を行う key molecule を同定することが出来た。以上の結果をまとめた論文を作成し、現在投稿中であり、成果を公表

の予定である。

- (2) *Apc<sup>Min/+</sup>NRDc<sup>+/-</sup>*マウスを作出し、腸腫瘍形成過程におけるNRDcの影響を解析した。同マウスの腸腫瘍では、TAMの数が減少しており、腸腫瘍の数・大きさも減少していた。また、*NRDc<sup>+/-</sup>*マウスへ azoxymethane / dextran sodium sulfate (AOM/DSS) 投与を行い、炎症性発癌におけるNRDcの影響を解析した。その結果、同マウスでは、TNF-alpha および IL-6 の産生が抑制されていた。これら Th1 サイトカインの産生が減少すると同時に腸腫瘍の個数および大きさも抑制されることを確認した。以上の結果をまとめた論文を作成し、学会発表を行った。

- (3) *Apc<sup>Min/+</sup>*マウスおよびAOM/DSS投与による炎症性腸発癌マウス大腸にマウス用内視鏡を挿入し、不活化センダイウイルスを併用してEGFPレポーター・コンストラクトを直視下に大腸腫瘍に局所注入した。より効率の高い局注方法を確立するための条件検討を行った。これらの検討に基づいて、IFN-gammaをはじめとするM1マクロファージ活性化因子をマウス大腸腫瘍に対して局所投与し、腫瘍退縮効果の検証を継続中である。

以上の各実験により、NRDc、Trem2、Cox-2、IFN-gammaなど種々のTAM活性化因子の役割を明らかにした。これらの検討により、TAMの活性化を利用して大腸癌特異的な新規治療法を開発する上で、重要な基礎的知見が得られたものとする。引き続き、これらの成果・知見を発表・公表していく予定である。

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5件)

1. Nakanishi Y, Seno H, Chiba T, Yamashita Y. Multiple sexually transmitted infections. J Gastroenterol Hepatol. 2010 Apr;25(4):843. 査読有
2. Nakanishi Y, Kanda K, Akitake R, Seno H, Chiba T, Ono K, Kayahara T, Yamashita Y. Metastatic gastrointestinal stromal cell tumor mimicking gastrointestinal polyposis. Endoscopy. 2010;42 Suppl 2:E37-8. 査読有
3. 上尾太郎、妹尾 浩、千葉 勉：胃ではLgr5陽性細胞が自己再生をにない、さらにこの細胞から*in vitro*で胃腺窩を長期間構築できた：分子消化器病. 7, 185-187, 2010. 査読無
4. Akitake R, Kimura H, Sekoguchi S, Nakamura H, Seno H, Chiba T, Fujimoto S. Perivascular epithelioid cell tumor (PEComa) of the liver diagnosed by contrast-enhanced ultrasonography. Intern Med. 2009 Dec 15;48(24):2083-6. 査読有
5. 妹尾 浩、中西祐貴、秋武玲子、千葉 勉：ポリポーシス症候群の遺伝子異常はどこまで解明されたか：分子消化器病. 6, 262-267, 2009：査読無

[学会発表] (計7件)

1. 上尾太郎、妹尾 浩、仲瀬裕志：Hes1は大腸腫瘍の増殖や未分化性の維持に重要である：第52回日本消化器病学会大会 2010.10.14 横浜
2. Ueo T, Seno H, Nakase H. Hes not only regulates the proliferation and differentiation of colon stem cell but also keep stem cells at correct position. 1<sup>st</sup> International Topic

Conference. 25 September, 2010,  
Kamakura, Japan

3. 神田啓太郎、米門秀行、妹尾 浩、千葉勉、西 英一郎：ナルディライジンによるIL-6/Stat3 シグナルを介した胃癌細胞の増殖制御：第 69 回日本癌学会学術総会 2010.09.22 大阪
4. 上尾太郎、妹尾 浩、仲瀬裕志：Hes1 は、大腸上皮幹細胞の分化や増殖を制御し、さらに幹細胞の位置や陰窩の形態保持に関与している：第 96 回日本消化器病学会総会 2010.04.23 新潟
5. 上尾太郎、妹尾 浩、仲瀬裕志：消化管上皮ならび腫瘍におけるHesの役割：第 51 回日本消化器病学会大会 2009.10.15 京都
6. 秋武玲子、神田啓太郎、米門秀行、河田真由美、妹尾 浩、千葉 勉：マウス内視鏡を用いた新規大腸粘膜障害・再生モデルの検討：第 51 回日本消化器病学会大会 2009.10.15 京都
7. Seno H. Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2-dependent alternative activation of macrophages. US-Japan GI Executive Meeting. 19 June, 2009, Kyoto, Japan.

[図書] (計1件)

1. Chiba T, Marusawa H, Seno H, Watanabe N. *H. pylori* infection - The route from inflammation to cancer. Sansonetti P, ed, Infection Biology Handbook Series. Bacterial Virulence. Basic principles, models and global approaches. Willey-Blackwell: 31-41, 2010

## 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