

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08716

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞とChitinase3-like1が関与した大腸癌進展機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of colorectal cancer progression mediated by cancer-associated fibroblasts and Chitinase 3-like 1

研究代表者

渡部 かをり (Kaori, Watanabe)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：20871263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は癌関連線維芽細胞(以下CAF)から分泌されるChitinase3-like1(以下CHI3L1)が大腸癌の進展に関するメカニズムを解明することを目的とした。CHI3L1とIL-8は癌細胞よりもCAFから多く分泌され、さらにCHI3L1受容体として報告されているIL-13R 2も癌細胞よりもCAFで強く発現しており、培養上清を用いた血管新生アッセイでCAFから分泌されるCHI3L1とIL-8が血管新生に与える影響を示すことができた。これにより大腸癌微小環境でCHI3L1は主にCAFから分泌されCAF自体に作用し、それによりIL-8分泌を促進し癌血管新生を誘導することを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHI3L1の起源について既存文献の多くは癌細胞からの分泌と報告しており、本研究のようにCAFの関与を言及した上でメカニズムを解明した報告はなかった。さらにCAF自体は腫瘍の影響を受けているものの正常細胞であり、CAFの研究は発癌のメカニズムについても示唆を与える可能性がある。

本研究で得られた成果は、従来の癌そのものに作用する薬剤とは別の新たな癌治療にアプローチするのと同様に、耐性化した癌の治療に対し従来の薬剤との相乗効果を期待できる可能性がある。さらに大腸癌のみならず多種の固形癌に対しても効果が期待でき、それぞれの癌において予後改善に寄与し、非常に大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the mechanism by which Chitinase 3-like 1 (CHI3L1), secreted by cancer-associated fibroblasts (CAFs), contributes to the progression of colorectal cancer. CHI3L1 and IL-8 are secreted in greater amounts by CAFs than by cancer cells. Additionally, IL-13R 2, reported to be a receptor for CHI3L1, is more strongly expressed in CAFs than in cancer cells. Using a conditioned media angiogenesis assay, it was demonstrated that CHI3L1 and IL-8 secreted by CAFs influence angiogenesis. These findings indicate that in the colorectal cancer microenvironment, CHI3L1 is primarily secreted by CAFs and acts on the CAFs themselves, promoting IL-8 secretion and inducing cancer angiogenesis.

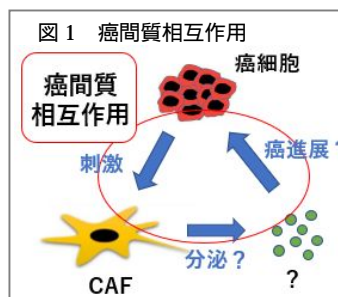
研究分野：消化器外科学

キーワード：癌関連線維芽細胞 CAF Chitinase 3-like 1 CHI3L1 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の薬物療法については現在までに多数研究が行われ、それに基づいて多くの薬剤が開発されてきた。主に癌細胞そのものに作用する、もしくは癌細胞の働きを促進する因子を阻害する薬剤であったが、これらの薬剤では長期使用による耐性出現が問題となっている。また近年発展が目覚ましい分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬についても効果は劇的とはいえない。この状況下で、癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast; 以下 CAF) が新たな癌治療の標的として注目されている。

癌組織は癌細胞のみならず血管や間質を構成する様々な細胞が混在し、癌微小環境が構成されているが、中でも間質の主成分である CAF との癌間質相互作用によって癌が進展していくことが明らかになりつつある (図 1)。当教室でも CAF から IL-6 が分泌されることにより癌における血管新生能を亢進させ、癌進展へ影響を及ぼしていることを明らかにし、報告していた (Nagasaki, et al. British J Cancer, 2014)。その他にも複数の文献で CAF がサイトカイン分泌を介して癌進展に関与していることが報告されているものの、そのメカニズムの多くが依然として不明であった。



当教室で行っていた予備実験で、細胞上清のサイトカインアレイで、癌細胞や正常線維芽細胞 (Normal fibroblast; 以下 NF) よりも CAF から Chitinase 3-like 1 (以下 CHI3L1) や IL-8 が多く分泌されていることが示された。CHI3L1 はキチナーゼ様タンパクの 1 種で細胞増殖や血管新生に影響するとされており、喘息や関節炎、また近年癌との関連についての報告がみられるが、CHI3L1 がどの細胞からどのような機序で分泌されるのか、また癌進展への作用メカニズムの全容は明らかになっていない。既存の多くの文献では、CHI3L1 の産生起源は癌細胞からと考えられている。また CHI3L1 は癌の遊走能や血管新生能に影響を及ぼすといった報告がみられる (Kawada, et al. Oncogene, 2012) (Shao R, et al. Oncogene, 2009)。中でも血管新生能への影響に言及しているものが散見されるが、その機序としては IL-8 の関与と VEGF の関与とで意見がわかれており、いまだ不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CAF から分泌される CHI3L1 が大腸癌の進展、すなわち増殖や遊走、浸潤、血管新生能にどのように関与しているのか、またそのメカニズムを解明することとした。

CHI3L1 の起源について、前述のように既存文献の多くは癌細胞からの分泌と報告しており、本研究のように CAF の関与を言及した上でメカニズムの全容を解明した報告はない。また、CAF 自体は腫瘍の影響を受けているものの正常細胞であり、CAF の研究は癌進展のみならず発癌のメカニズムについても示唆を与える可能性がある。癌微小環境において CAF からの CHI3L1 分泌がサイトカインを介して大腸癌の進展に与える影響に着目し、その産生・作用機序を解明し制御することで、CAF の癌進展作用を抑制する新たな癌治療薬の開発へとつながる可能性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株と CAF・NF における CHI3L1 発現・分泌の比較:

外科的切除された大腸癌組織から分離培養し樹立した CAF・NF と、3 つの大腸癌細胞株 HT-29・HCT116・DLD-1 を用いて、CHI3L1 の発現・分泌を RT-PCR・Western blotting・ELISA で評価し、各細胞の違いを比較した。CAF の樹立はあらかじめ倫理委員会で承認を得ており、また各患者より書面により同意を得ている。

(2) 大腸癌細胞株と CAF・NF における IL-13R₂ (CHI3L1 受容体) の発現:

CHI3L1 受容体として報告されている IL-13R₂ の発現を、RT-PCR・Western blotting で評価し、各細胞の違いを比較した。

(3) 大腸癌細胞株と CAF・NF の IL-8 発現・分泌に対する CHI3L1 の影響:

各細胞の血管新生因子 IL-8 の発現・分泌と、それに対するリコンビナント CHI3L1 投与による影響を RT-PCR・ELISA で評価し、各細胞の違いを比較した。

(4) 大腸癌細胞株と CAF・NF の VEGF-A 発現・分泌に対する CHI3L1 の影響:

各細胞の血管新生因子 VEGF-A の発現・分泌と、それに対するリコンビナント CHI3L1 投与による影響を RT-PCR・ELISA で評価し、各細胞の違いを比較した。

(5) CAF の IL-13R₂ ノックダウン後の IL-8・VEGF-A 発現に対する CHI3L1 の影響:

CHI3L1 受容体である IL-13R₂ と、血管新生因子 IL-8・VEGF-A との関係を検証するために、CAF における IL-13R₂ のノックダウン後のリコンビナント CHI3L1 投与による IL-8・

VEGF-A の発現の変化を RT-PCR で評価した .

(6) CAF の CHI3L1 ノックダウン後の IL-8・VEGF-A の変化 :

CAF での CHI3L1 ノックダウン後の血管新生因子 IL-8・VEGF-A 発現・分泌の変化についても RT-PCR・ELISA で評価し、検証した .

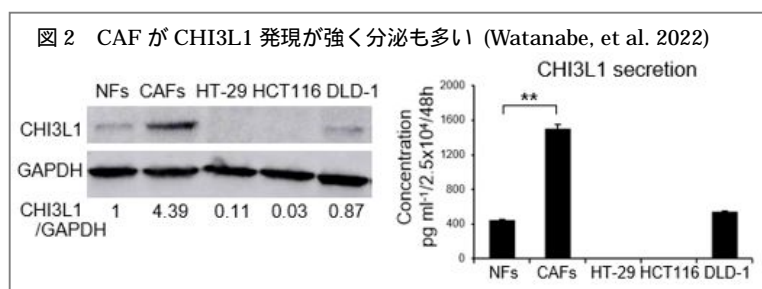
(7) 血管内皮細胞の管形成に対する CHI3L1 と IL-8・VEGF-A、CAF 培養上清の効果 :

血管新生能についての機能実験として、血管内皮細胞に対するリコンビナント CHI3L1 と IL-8・VEGF-A の直接的な影響を、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた Tube Formation Assay で比較した . さらに CAF から分泌される CHI3L1 や血管新生因子が血管新生に与える影響を評価するために、CAF など各細胞の馴化培地、抗 CHI3L1 抗体の mAY を加えた馴化培地、CHI3L1 や血管新生因子をノックダウンした CAF の馴化培地を、Tube Formation Assay で比較した .

4 . 研究成果

(1) 大腸癌細胞株と CAF・NF における CHI3L1 発現・分泌の比較 :

CAF は癌細胞や NF よりも、CHI3L1 発現が強く分泌も多いことが示され、CAF が大腸癌微小環境における CHI3L1 分泌の主な起源であると考えられた (図 2) .



(2) 大腸癌細胞株と CAF・NF における IL-13R₂ (CHI3L1 受容体) の発現 :

CAF と NF の両方が IL-13R₂ を発現し、特に CAF は NF と比較しても著明に強発現していたが、癌細胞ではほとんど発現が認められなかった .

(3) 大腸癌細胞株と CAF・NF の IL-8 発現・分泌に対する CHI3L1 の影響 :

CAF での IL-8 発現は NF や癌細胞よりも明らかに強く、さらに CHI3L1 投与により CAF における IL-8 発現は増強した . 癌細胞においては CHI3L1 投与による IL-8 発現に有意な変化はみられなかった .

(4) 大腸癌細胞株と CAF・NF の VEGF-A 発現・分泌に対する CHI3L1 の影響 :

癌細胞の VEGF-A 発現・分泌は細胞株によって異なったが、CAF と比較して特に有意に高くも低くもなかった . さらに CHI3L1 投与によってもいずれも有意な変化を引き起こさなかった .

(5) CAF の IL-13R₂ ノックダウン後の IL-8・VEGF-A 発現に対する CHI3L1 の影響 :

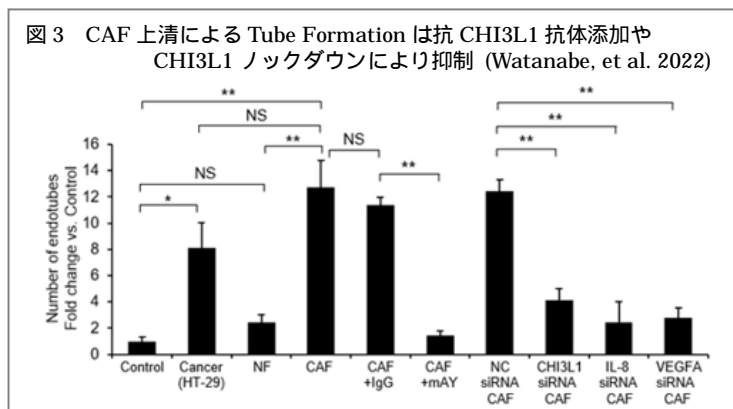
CAF の CHI3L1 受容体である IL-13R₂ をノックダウンさせることにより、CHI3L1 投与による IL-8 発現増強が抑制されることが示された . 一方で VEGF-A 発現には有意な影響を与えず、CAF における CHI3L1 と IL-8 の関係には IL-13Ra₂ が受容体として関与していると考えられた .

(6) CAF の CHI3L1 ノックダウン後の IL-8・VEGF-A の変化 :

CAF の CHI3L1 をノックダウンさせることにより、IL-8 と VEGF-A のいずれも発現・分泌が抑制されることが示された .

(7) 血管内皮細胞の管形成に対する CHI3L1 と IL-8・VEGF-A、CAF 培養上清の効果 :

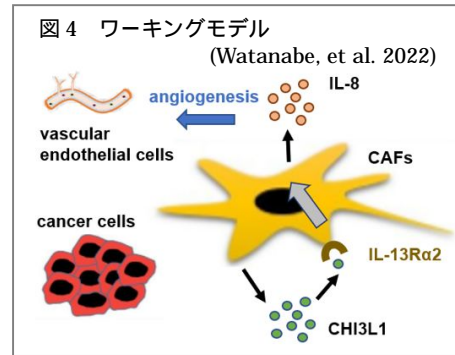
血管新生因子である IL-8・VEGF-A は Control と比較して血管内皮細胞の Tube Formation を有意に増加させたが、CHI3L1 も Tube Formation を増加させる傾向はあるも有意差は認めなかった . また CAF 上清も Control・NF 上清と比較して Tube Formation を増加させるが、これらは CHI3L1 中和抗体添加や CHI3L1 ノックダウンにより抑制されることが示された (図 3) .



(8) 結果のまとめ

CAF と癌細胞の両方が CHI3L1 と血管新生因子の起源と考えられ、CAF から分泌される CHI3L1 と血管新生因子が癌微小環境において役割を果たしていること、IL-13Rα2 が受容体として CAF による CHI3L1 からの IL-8 産生に関与していると考えられた。

これらの結果により、大腸癌の微小環境において、CHI3L1 は主に CAF から分泌され、CAF 自体に作用し、さらに IL-8 の分泌を促進し、これが癌の血管新生を誘導するというメカニズムが癌進展に寄与していると考えられた (図 4)。



(9) 今後の展望

CHI3L1 が関与する血管新生メカニズムはまだ不明な点が多く、今回も発現までのシグナル経路や VEGF-A の関与については明らかにはならなかった。これらに加え、in vivo でそれらの効果を確認するための動物実験や、CAF における CHI3L1 の発現レベルと静脈・リンパ管浸潤や転移などの臨床病理学的要因との関係なども、今後のさらなる研究で明らかにする必要がある。

しかしながら CHI3L1 関連の血管新生における CAF の役割を示したのは本研究が初めてであり、CAF と CHI3L1 が癌間質相互作用において重要な役割を果たし、CHI3L1 のノックダウンまたは抗 CHI3L1 抗体の添加が血管新生を抑制したことを示した。したがって、癌間質と CHI3L1 を標的とすることにより、大腸癌のみならず他の固形癌に対しても、従来の癌細胞そのものに作用する薬剤とは異なる新しい癌治療法を確立するのに役立つ可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Kaori, Shiga Kazuyoshi, Maeda Anri, Harata Shinnosuke, Yanagita Takeshi, Suzuki Takuya, Ushigome Hajime, Maeda Yuzo, Hirokawa Takahisa, Ogawa Ryo, Hara Masayasu, Takahashi Hiroki, Matsuo Yoichi, Mitsui Akira, Kimura Masahiro, Takiguchi Shuji	4. 巻 60
2. 論文標題 Chitinase 3-like 1 secreted from cancer-associated fibroblasts promotes tumor angiogenesis via interleukin-8 secretion in colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2021.5293	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部 かをり, 志賀 一慶, 前田 杏梨, 原田 真之資, 柳田 剛, 鈴木 卓弥, 牛込 創, 前田 祐三, 小川 了, 高橋 広城, 松尾 洋一, 瀧口 修司
2. 発表標題 大腸癌微小環境におけるChitinase 3-like 1が関与した癌血管新生メカニズムの解明
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部 かをり, 志賀 一慶, 前田 杏梨, 原田 真之資, 鈴木 卓弥, 前田 祐三, 小川 了, 高橋 広城, 松尾 洋一, 瀧口 修司
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞によるChitinase 3-like 1とIL-8が関与した大腸癌血管新生メカニズム
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部かをり, 志賀一慶, 大場杏梨, 柳田剛, 鈴木卓弥, 牛込創, 前田祐三, 廣川高久, 小川了, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞によるChitinase 3-like 1が関与した大腸癌進展メカニズムの解明
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部かをり、志賀一慶、前田杏梨、鈴木卓弥、前田祐三、廣川高久、高橋広城、小川了、松尾洋一、瀧口修司
2. 発表標題 CAF由来Chitinase 3-like 1が大腸癌の血管新生に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部かをり、志賀一慶、大場杏梨、原田真之資、柳田剛、鈴木卓弥、牛込創、前田祐三、小川了、高橋広城、松尾洋一、瀧口修司
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞によるChitinase 3-like 1の大腸癌血管新生に対する効果
3. 学会等名 第27回外科侵襲とサイトカイン研究会
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
研究 分担者	志賀 一慶 (Shiga Kazuyoshi) (20747282)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究 分担者	高橋 広城 (Takahashi Hiroki) (30381792)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究 分担者	松尾 洋一 (Matsuo Yoichi) (40381800)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	瀧口 修司 (Takiguchi Shuji) (00301268)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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