

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15784

研究課題名(和文) マウス腫瘍同所移植モデルを用いた炎症性癌微小環境の研究

研究課題名(英文) Analysis of inflammatory tumor microenvironment using the murine orthotopic transplantation model of colorectal cancer

研究代表者

林 亮平 (Hayashi, Ryohei)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：80772053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎(UC)の長期経過例では発癌リスクが上昇するが、UCに合併する癌は通常の癌とは異なる臨床的・病理学的特徴を持つことが知られている。その差異が生じるメカニズムは未だ詳細が解明されておらず、本研究では炎症が癌に与える影響を調査することを目的とした。

マウス大腸癌同所移植モデルにおいて、DSS (Dextran Sodium Sulfate) 腸炎によりリンパ節転移の増加とマウスの生存率の低下が観察された。また、腫瘍部におけるFibronectinとVimentin、TGF- $\beta$ 1の発現の増加が認められた。これらの結果から、腫瘍部において腸炎により上皮間葉転換が生じる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症による癌微小環境が腫瘍に与える影響については未だ詳細は明らかになっていない。本研究の結果から腸炎により大腸癌において上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT))が生じる可能性が推測された。ヒトにおける潰瘍性大腸炎関連腫瘍においても同様の現象が生じているのであれば、腫瘍間質反応を標的とした化学療法が有用である可能性が出てくる。

研究成果の概要(英文)：Patients with long-term ulcerative colitis (UC) have increased risk of carcinogenesis, and UC-associated colorectal cancer presents different clinical and pathological characteristics compared to those of sporadic colorectal cancer. The mechanism of these differences has not been clarified yet, and the purpose of this study was to investigate the effect of inflammation on cancer.

In the murine colorectal cancer orthotopic transplantation model, increased lymph node metastasis and decreased survival rate were observed due to DSS (Dextran Sodium Sulfate) induced colitis. Moreover, expression of fibronectin, vimentin and TGF- $\beta$ 1 was increased due to DSS induced colitis. These results suggest that colitis may cause epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the colorectal cancer.

研究分野：炎症性腸疾患

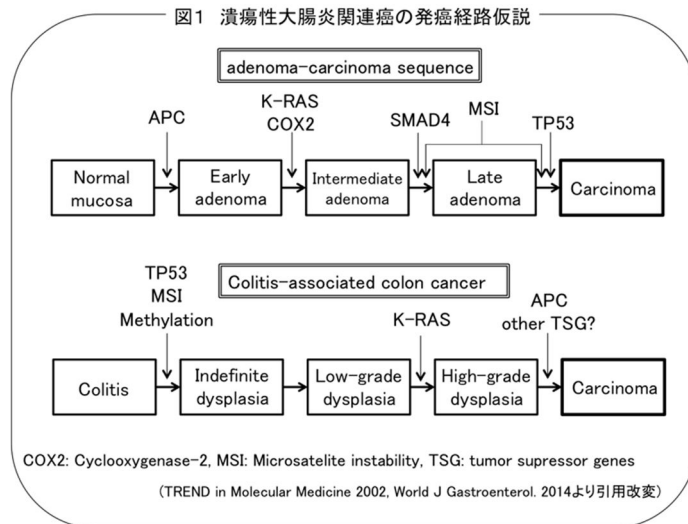
キーワード：炎症性腸疾患 炎症性発癌 癌微小環境 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦では炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎とクローン病が増加してきている。特に潰瘍性大腸炎の長期経過例では発癌リスクが上昇することが知られており、その累積発癌率は罹病期間10年で2%、20年で8%、30年で18%との報告もある[1]。この為、本邦においても潰瘍性大腸炎関連癌が増加することが危惧されている。

大腸癌の発癌経路は主に adenoma-carcinoma sequence であるが、他に de novo 発癌、serrated polyp neoplasia pathway の計三つが提唱されている。しかし、潰瘍性大腸炎関連癌はこれらとは異なる発癌経路が想定され(図1)[2,3]。炎症による癌周囲の微小環境の変化による影響が想定されているが、その詳細は明らかとなっていない。また、潰瘍性大腸炎関連癌は通常の大腸癌と異なる臨床的特徴を持ち、粘液癌や印織細胞癌といった低分化型の組織型を有し、化学療法抵抗性を示すケースが多く、その予後も不良とされる。



更に、その集学的治療に関してエビデンスの高いものはない。そのため、前述のように通常の大腸癌とは異なる発癌メカニズムが想定されているにも関わらず、通常の大腸癌に準じて行われるのが現状である。例えば、切除不能癌に対する化学療法や、術前術後補助化学療法も潰瘍性大腸炎関連癌に対する独自の治療指針は存在しない。癌の特徴に基づいた独自の化学療法レジメン作成が望まれる。その発癌メカニズムを明らかにし、新たな治療ターゲットの検索が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、マウス癌細胞株同所移植モデルを用い、炎症性癌微小環境が腫瘍組織においてどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

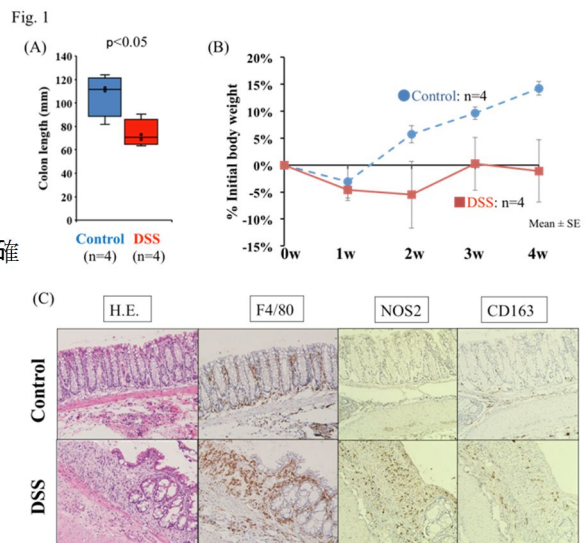
大腸癌細胞株 CT26 の BALB/c マウスへの同所移植モデルを用い、腸炎惹起により腫瘍にどのような変化が生じるかを解析するため腸炎群と非腸炎群を比較検討した。

BALB/c マウス (6週齢、雌) の盲腸に同系マウス由来の大腸癌細胞株である CT26 細胞を開腹下に  $1 \times 10^5$  個の同所移植を行い、DSS 腸炎群 (1.5%DSS; Dextran Sodium Sulfate, デキストラン硫酸) とコントロール群 (イオン交換水) に分け、3 週間自由飲水させ腫瘍変化の比較を行った。腸炎の評価として腸管長の評価、病理組織学的評価を行った。腫瘍増殖の評価としてマウス生存率、腫瘍サイズ、転移の有無の比較、腫瘍内の炎症細胞浸潤の評価、腫瘍内の上皮系・間葉系マーカーおよびサイトカインの遺伝子発現とタンパク発現の解析を行った。

4. 研究成果

(1) DSS 腸炎の評価 (Fig.1)

慢性炎症による腫瘍への影響を評価するためにはより長期に渡り DSS の投与を行う必要があったため、DSS の濃度、投与間隔を検討した。その結果、1.5% DSS 水の連日投与が最も条件が良いと判断した。1.5%DSS 腸炎群では腸管長の有意な短縮と組織学的な炎症が確認され、既報よりも低い濃度の DSS 投与であっても目的である炎症による腫瘍微小環境による腫瘍の変化の評価を行うことができた。また、組織学的にはマクロファージの浸潤が著明に増加しており、NOS2 陽性の M1 マクロファージが優位に認められた。



(2) 腫瘍サイズとマウス生存率 (Fig.2)

腫瘍重量、腫瘍体積は両群間で差は認められなかったが、DSS 腸炎群でのみリンパ節転移を認め、有意差を持って死亡率が高かった。

### (3) 腫瘍の組織学的評価 (Fig.3)

HE染色ではDSS腸炎群でのみ筋層への浸潤が認められた。Ki-67免疫染色にてDSS腸炎群において陽性細胞が増加している傾向が認められ、腫瘍増殖能が亢進している可能性が考えられたが、陽性細胞数の割合は両群で有意差は認められなかった。

DSS腸炎群の腫瘍ではコントロール群では認められない、腫瘍細胞の紡錘形細胞への変化が認められた。またDSS腸炎群では間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA およびフィブロネクチン陽性細胞の増生が免疫染色にて確認され、特に腫瘍辺縁部で顕著であった。フィブロネクチン産生細胞は主にCAF (cancer associated fibroblast) であったが、癌細胞や TAM (tumor-associated macrophage) にも発現していた。

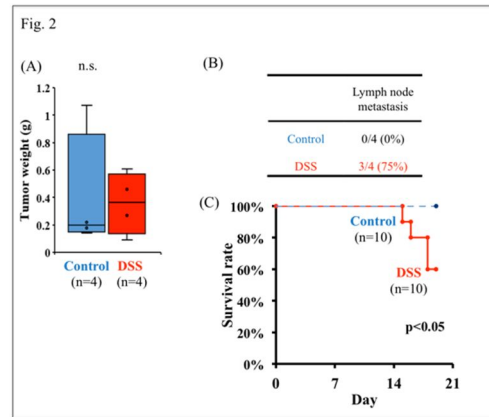
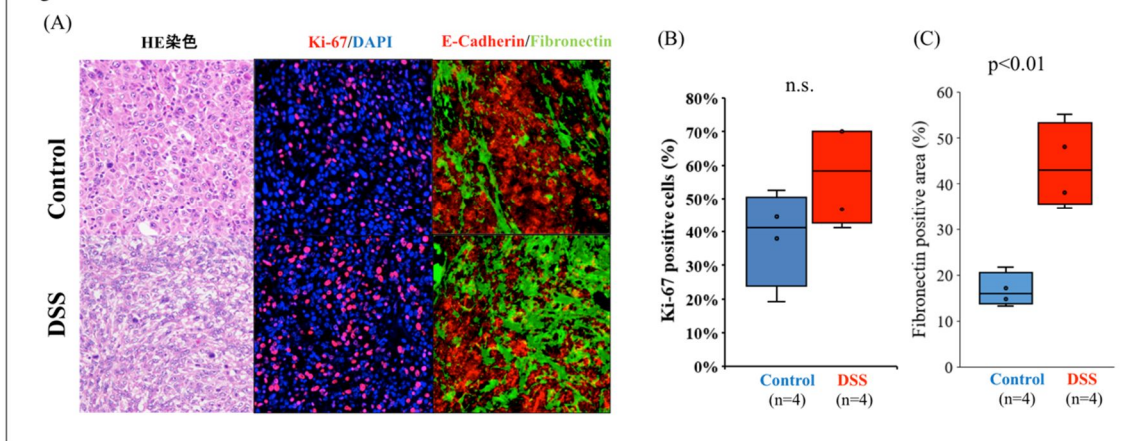


Fig. 3

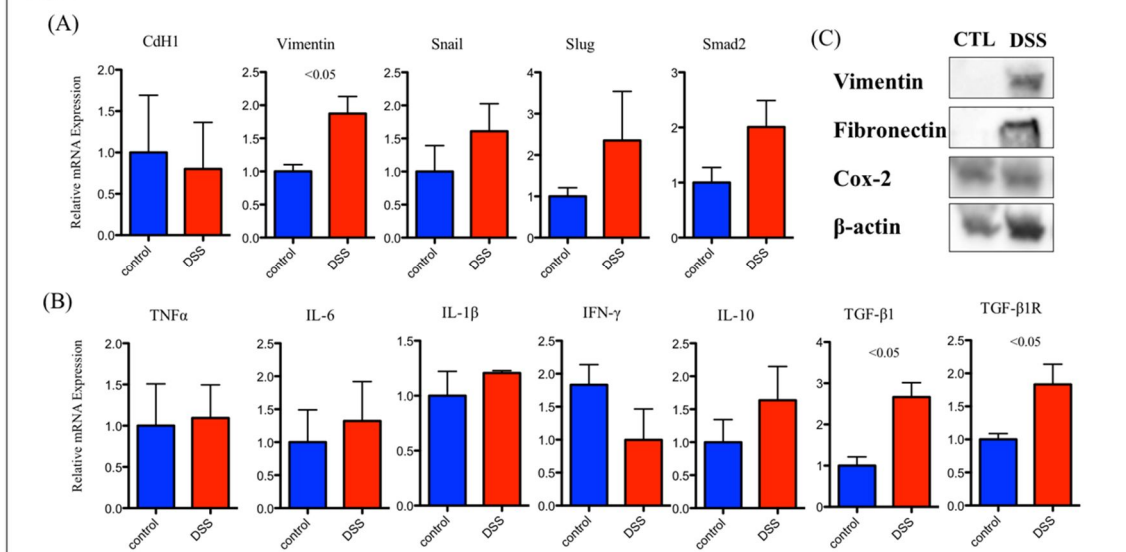


### (4) 腫瘍の遺伝子発現とタンパク発現 (Fig.4)

上皮系、間葉系タンパクの遺伝子発現を real-time PCR で評価し両群で比較検討したところ、DSS腸炎群で Vimentin 遺伝子の発現量が有意差を持って上昇していた。Western blotting では Fibronectin と Vimentin の発現量が DSS腸炎群の腫瘍において多く確認され、腫瘍増殖能の増加に腫瘍細胞の上皮間葉転換 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) が関与している可能性が示唆された。

PCR ではサイトカイン発現の差異は両群においてほとんど認めなかったが、TGF- $\beta$ 1 のみが DSS腸炎群において上昇しており、これまでの既報と併せて考察すると TGF- $\beta$ 1 が EMT に関与していることが推察された。

Fig. 4



(5) その他

腫瘍内の血管増生の評価のため CD31 免疫染色を行い血管数の評価を行った。初回の検討では有意差をもって DSS 腸炎群で血管数が多い結果であったが(中間報告書で報告)再現性確認のため再度同様の検討を別標本で行ったところ有意差を見出すことはできなかった。

また、本研究では当初、腸管特異的に遺伝子改変を行った B6 マウス (APC KO マウス、APC KO+Kras mutation KI マウス、APC KO+TGF- $\beta$ 1 KO マウス) の腫瘍より作成したオルガノイド [4] を B6 マウスの盲腸に同所移植し、上記検討と同様の手法で両群の比較検討を行う予定であった。しかしながらオルガノイドの作成には成功したものの、複数回の施行にも関わらずマウスの盲腸に生着させることができなかったため計画を中断した。

< 結論 >

以上の結果から、DSS 腸炎により腫瘍微小環境においてマクロファージの浸潤の増加により TGF- $\beta$ 1 が増加し、腫瘍部において血管増生と EMT を促進することにより癌の悪性度が上昇する可能性が示唆された。

< 考察 >

本研究の結果から腸炎により大腸癌において上皮間葉転換 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) が生じる可能性が推測された。ヒトにおける潰瘍性大腸炎関連腫瘍においても同様の現象が生じているのであれば、腫瘍間質反応を標的とした化学療法が有用である可能性が考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48:526-535.2001
- 2) Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med* 8:10-16.2002
- 3) Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: a review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 20:6774-6785.2014
- 4) Sato T, Vries RG, Snippert HJ et al. Single Lgr5 cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 469:262-265.2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 国正 昇馬、正木 智之、木本晶子、林亮平、弓削亮、田中信治、北台靖彦
2. 発表標題 腫瘍微小環境の炎症性変化は大腸癌の上皮間葉移行(EMT)を誘導する
3. 学会等名 第28回 日本がん転移学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 国正 昇馬、木本晶子、林亮平、弓削亮、田中信治、北台靖彦
2. 発表標題 炎症性微小環境による大腸癌EMT（上皮間葉移行）誘導因子の検討
3. 学会等名 第29回 日本がん転移学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	北台 靖彦  (Kitadai Yasuhiko)	県立広島大学・健康科学科・教授    (25406)	