

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08442

研究課題名(和文) CX3CR1陽性単球の大腸炎関連大腸癌発症における分子病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Molecular pathophysiological role of CX3CR1+ monocytes in the development of colitis-associated colon cancer

研究代表者

榎屋 正浩 (Masuya, Masahiro)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30281083

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)：CX3CR1 wild type (WT)および欠損マウスの骨髄細胞を放射線照射マウスに移植して骨髄キメラマウスを作成し、移植8週後からAOM/DSSによる傷害を3サイクル繰り返した。AOM投与開始から20週時点で、欠損キメラマウスはWTキメラマウスに比し、(1) 大腸腫瘍の数が少なく、(2) 大腸組織中のCX3CR1highマクロファージ数とTnfa, Il1b, Tgfb遺伝子発現が低く、(3) 血漿TNF-、IL-1、TGF- も少なかった。CX3CR1highマクロファージは炎症下において炎症性及び非炎症性サイトカインを産生し、大腸腫瘍形成に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患患者の診療で重要な課題は、慢性炎症による大腸癌の発症・進展である。骨髄由来の単球から派生するM2マクロファージなどの免疫を負に調節する細胞は癌発症・進展に関与すると考えられている。がん治療の場では免疫チェックポイント阻害剤による細胞傷害性T細胞の抗腫瘍効果増強が注目されているが、我々はケモカインCX3CL1による単球の炎症部位への動員と炎症部位で分化したマクロファージからの炎症性及び抗炎症性サイトカイン産生を制御することが大腸炎関連大腸癌の発症を抑制することを明らかにした。このことは炎症性腸疾患患者の大腸癌発症予防法開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：We prepared bone marrow (BM) chimeric mice, which were reconstituted with BM cells derived from wild-type (WT) or C-X3-C motif chemokine receptor 1 (CX3CR1)-deficient mice. Azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS) treatment started 8 weeks after BM transplantation and the DSS treatment was repeated for three cycles. At 20 weeks after the initiation of AOM, in CX3CR1-deficient BM chimeric mice compared with in WT BM chimeric mice, (1) the number of colon tumors was significantly reduced, (2) the number of CX3CR1high macrophages in the colonic lamina propria and mRNA expression level of Tnfa, Il1b, and Tgfb in the colon tissue decreased, (3) serum levels of TNF-, IL-1, and TGF- were significantly lower. Therefore, CX3CR1high macrophages derived from BM are thought to be associated with the development of colon tumors by the production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines during the colon inflammation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：単球 マクロファージ CX3CR1 大腸炎関連大腸癌 AOM/DSS

## 1. 研究開始当初の背景

我々は EGFP transgenic mice から分離した全骨髄細胞を移植して EGFP 骨髄キメラマウスを作成し、EGFP 陽性細胞の動向を追跡することにより各種臓器の線維化における骨髄由来細胞の関与について検討してきた。その結果、肝臓や脾臓の線維化にはケモカイン CCL2 が重要であり、かつ、その受容体 CCR2 を発現する骨髄由来の単球およびそれから派生した線維細胞が大きく関与することを報告してきた。同 EGFP 骨髄キメラマウスに AOM/DSS 傷害を与え、大腸炎関連大腸癌発症における骨髄由来単球ならびに線維細胞の関与を検討したところ、慢性傷害過程において type 1 collagen 沈着を伴う大腸線維化が継時的に進行し、傷害大腸組織から CCL2 が産生・放出されることを認めた。そこで、CCR2<sup>RFP/RFP</sup> マウス (CCR2 遺伝子部位に RFP 遺伝子をノックインしたマウスで、ホモ接合体では CCR2 が欠損する) の骨髄細胞を移植した CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウスを作成して、AOM/DSS 傷害を与えた。その結果、(a) AOM/DSS による慢性傷害下では CCR2 陽性の骨髄由来 Ly6C<sup>high</sup> 単球が大腸内に侵入し、そこで線維細胞に分化するとともに、CCR2 陽性単球と線維細胞が tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 を産生して collagen 分解を抑制すること、(b) CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウスでは大腸内の線維芽細胞には変化なかったが、単球と線維細胞が著明に減少して大腸線維化が有意に抑制されることが判明し、CCR2 陽性単球及び線維細胞が大腸線維化に重要であることを明らかにした (Sci Rep 2019;9:8568)。

近年、様々な炎症や癌におけるケモカイン CX3CL1 とその受容体 CX3CR1 の発現様式に関する研究がなされるようになり、大腸炎または大腸癌発症での CX3CL1/CX3CR1 axis の関与についての報告が散見されるが、いまだ炎症や発癌を促進するのか抑制するのかに関する一定の見解が得られてはいない。そこで、CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> マウス (CX3CR1 遺伝子部位に GFP 遺伝子をノックインしたマウスで、ホモ接合体では CX3CR1 が欠損する) を用いて CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスを作成し、AOM/DSS モデルを用いて骨髄由来 CX3CR1 陽性単球系細胞の大腸炎関連大腸癌発症への関与を解析することにした。

## 2. 研究の目的

CX3CL1 は他のケモカインと異なり、膜結合型蛋白として産生・分泌されるが、その後、matrix metalloproteinases により切断されて分泌型としても作用する。その受容体 CX3CR1 は単球・樹状細胞や NK 細胞といった血液細胞のみならず神経細胞や関節滑膜線維芽細胞にも発現することが知られており、CX3CL1/CX3CR1 axis は各種細胞の移動だけではなく細胞接着にも関与する。CX3CR1<sup>GFP/+</sup>ヘテロ接合体マウス (CX3CR1 機能は維持されている) の骨髄細胞を移植した CX3CR1<sup>GFP/+</sup> 骨髄キメラマウスでは、CX3CR1 の機能を有する血液細胞が GFP 陽性細胞として、フローサイトメトリーや蛍光免疫組織染色において容易に同定できる。一方、CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> ホモ接合体マウスの骨髄細胞を移植した CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスでは CX3CR1 の機能が完全に喪失した状況になるので、この両骨髄キメラマウスに AOM/DSS 傷害を与えて比較検討することで、(a) 骨髄由来単球系細胞の変化を大腸腫瘍と非腫瘍部位で解析できるとともに、(b) CX3CR1 の機能喪失により、AOM/DSS 傷害に伴う大腸線維化や腫瘍形成が減弱するのか増強するのかを明らかにすることができる。

マクロファージは炎症を進める M1 マクロファージと抑制する M2 マクロファージに分けられるが、M2 マクロファージは腫瘍免疫も抑制する。CX3CR1 の発現制御が、M1/M2 マクロファージの極性化を変化させ、大腸の線維化や発癌の予防を可能にするかもしれない。また、腫瘍関連線維芽細胞の起源の 1 つとされている単球由来線維細胞における CX3CR1 発現と機能の関連はほと

んど解析されておらず、その解明もまた大腸線維化および発癌の予防にとって意義深いものとなろう。本研究が CX3CR1/CX3CL1 axis を介した単球系細胞制御による大腸炎関連大腸癌発症予防に繋がるものと期待して研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (a) CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスと CX3CR1<sup>GRP/+</sup>骨髄キメラマウスの作成

CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> マウスは米国 Jackson-Laboratory から購入し、三重大学生命科学研究支援センター動物実験施設で繁殖させている。wild type の C57BL/6J-Ly5.2 マウスと掛け合わせすることで CX3CR1<sup>GRP/+</sup>マウスも繁殖させている。8-10 週齢のメス CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> マウスまたは CX3CR1<sup>GRP/+</sup>マウスから分離した  $5 \times 10^6$  個の骨髄細胞を 10 Gy 放射線照射した同週齢のオス C57BL/6J-Ly5.1 マウスに移植して CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスおよび CX3CR1<sup>GRP/+</sup>骨髄キメラマウスを作成した。逆に、メス C57BL/6J-Ly5.1 マウスから分離した  $5 \times 10^6$  個の骨髄細胞を 10 Gy 放射線照射したオス CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> マウスまたは CX3CR1<sup>GRP/+</sup>マウスに移植した骨髄キメラマウスも作成した。

#### (b) AOM/DSS 傷害モデルの作成

骨髄移植 2 ヶ月後に、AOM (10 mg/kg body weight) を腹腔内投与し、7 日目から 1% DSS を 1 週間飲料水で投与後 2 週間は通常の水を投与する処置を 3 サイクル繰り返す。

AOM 投与から 20 週の時点でマウスから大腸を摘出した。

#### (c) 大腸組織における各種血液細胞の解析

摘出した大腸組織を collagenase と DNase I で処理して得られた細胞の数を算定後、フローサイトメトリー法で各種細胞分画の比率とそれぞれの CX3CR1 陽性率を解析した。

#### (d) 大腸組織の病理組織学的および免疫組織学的解析

摘出した大腸は長さ、腫瘍の数とサイズを測定。スイスロール状に巻いて 4% パラホルムアルデヒドに浸漬し固定後に凍結切片を作成。一部は 10% ホルマリンにて固定後パラフィン切片を作成。凍結切片は、抗 CD45 抗体、抗 F4/80 抗体とこれらに対する蛍光色素を結合した二次抗体で染色し、confocal laser microscope を用いて各種 GFP 陽性 (CX3CR1 陽性) 単球系細胞の数ならびに存在部位を解析する。パラフィン切片は Hematoxylin-eosin (HE) 染色を実施した。

#### (e) 大腸組織からの単球系細胞分離と遺伝子解析

大腸組織及び傷害後の CX3CR1<sup>GRP/+</sup>骨髄キメラマウスの大腸組織から分離した単球系細胞から mRNA を抽出し、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの遺伝子発現を検討した。

#### (f) 血漿中のサイトカインの定量

マウス血液から分離した血漿中のサイトカインは LEGENDplex Mouse Inflammation Panel (BioLegend) を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) CX3CR1 陽性血液細胞が大腸炎関連大腸腫瘍発生に關与する

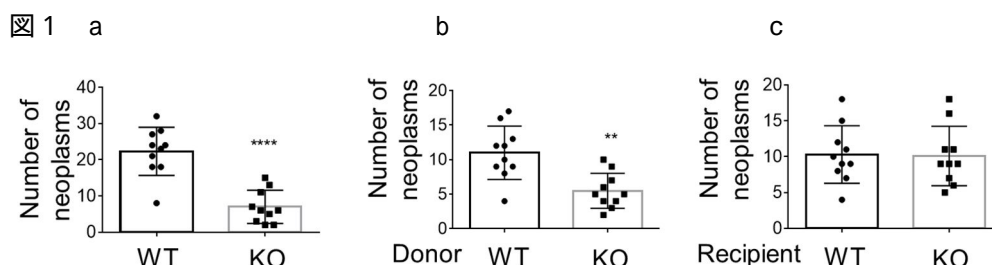
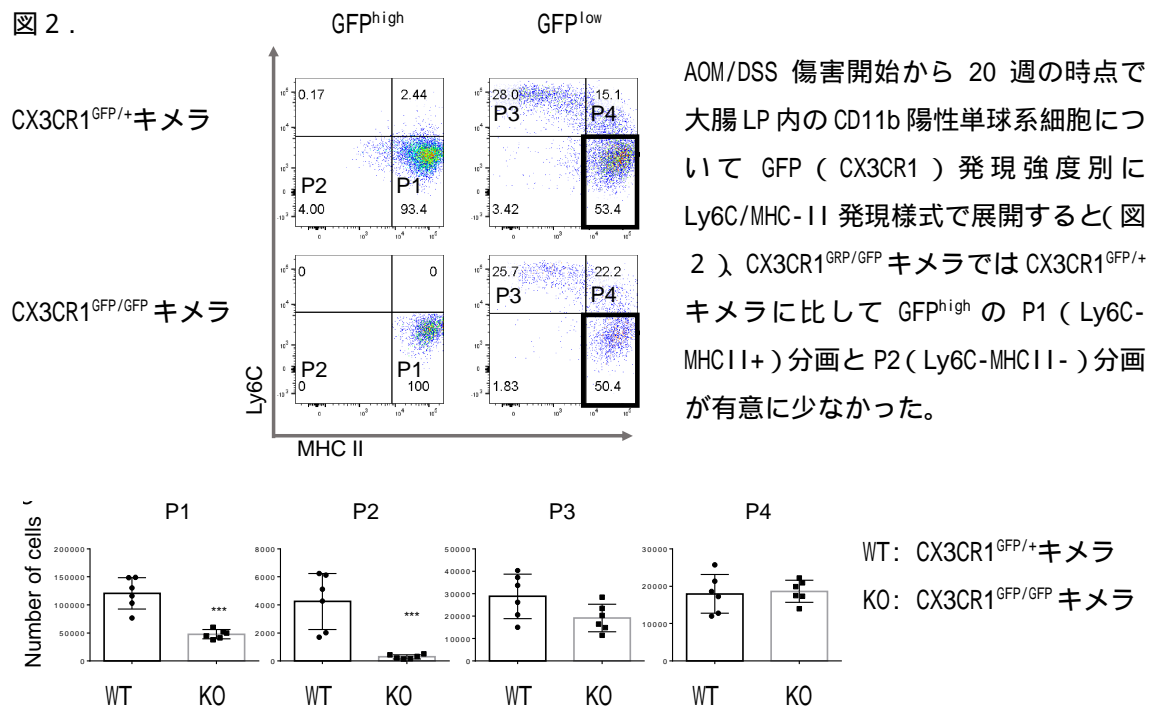


図 1 a は非移植の CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> (KO) マウスと CX3CR1<sup>GRP/+</sup> (WT) マウスに AOM/DSS 傷害を与えて、AOM

投与から 20 週目の大腸腫瘍の数を示す。CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> マウスでは CX3CR1<sup>GFP/+</sup> マウスに比して有意に腫瘍数が少なかった。そこで、2 種類の骨髄キメラマウス（ドナーに CX3CR1<sup>GRP/GF</sup> マウスと CX3CR1<sup>GFP/+</sup> マウスからの骨髄細胞を用いたものとレシピエントに CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> マウスと CX3CR1<sup>GFP/+</sup> マウスを用いたもの）を作成して、血液細胞と非血液細胞のどちらの CX3CR1 陽性細胞が腫瘍形成に参与するのかを検討したところ、図 1 b, c のようにドナー細胞が CX3CR1<sup>GRP/GF</sup> (KO) の場合にのみ大腸腫瘍数が減少することが判明し、CX3CR1 陽性血液細胞が大腸炎関連大腸腫瘍発生に参与することが明らかとなった。

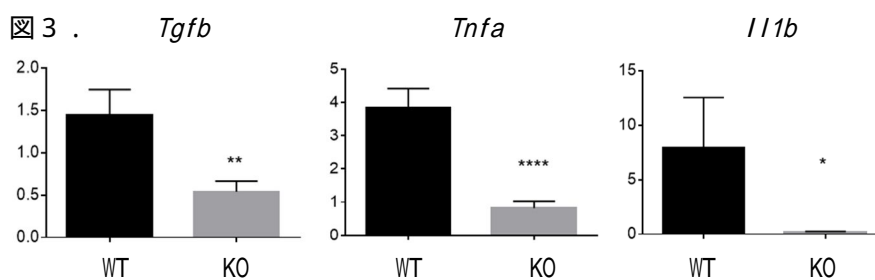
## (2) 大腸 lamina propria (LP) 内の単球系細胞分画の差異

図 2 .



## (3) 大腸組織におけるサイトカイン発現は CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> キメラで減少する

図 3 .



CX3CR1<sup>GRP/GFP</sup> キメラでは CX3CR1<sup>GFP/+</sup> キメラに比して有意に大腸組織中の *Tgfb*, *Tnfa*, *Il1b* 遺伝子発現が低下し、同じく、血漿中の TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 も有意に少なかった。

以上の結果から、CX3CR1<sup>high</sup>CD11b+Ly6C-マクロファージが繰り返す大腸炎下において、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1) と抗炎症性サイトカイン (TGF- $\beta$ ) を産生して、大腸腫瘍形成に参与していることが明らかとなった。この細胞群の制御による大腸炎関連大腸癌の発症予防に期待が持てる結果であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hachiya Kensuke, Masuya Masahiro, Kuroda Naoki, Yoneda Misao, Tsuboi Junya, Nagaharu Keiki, Nishimura Komei, Shiotani Takuya, Ohishi Kohshi, Tawara Isao, Katayama Naoyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Irbesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, inhibits colitis-associated tumorigenesis by blocking the MCP-1/CCR2 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99412-8	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 Ono Ryoichi, Masuya Masahiro, Inoue Naokazu, Shinmei Makoto, Ishii Satomi, Maegawa Yuri, Maharjan Bishnu Devi, Katayama Naoyuki, Nosaka Tetsuya	4. 巻 16
2. 論文標題 Tet1 is not required for myeloid leukemogenesis by MLL-ENL in novel mouse models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0248425	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 Wada Hideo, Ichikawa Yuhuko, Ezaki Minoru, Shiraki Katsuya, Moritani Isao, Yamashita Yoshiki, Matsumoto Takeshi, Masuya Masahiro, Tawara Isao, Shimpo Hideto, Shimaoka Motomu	4. 巻 10
2. 論文標題 Clot Waveform Analysis Demonstrates Low Blood Coagulation Ability in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5987 ~ 5987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10245987	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 Kato Taichi, Mitani Yoshihide, Masuya Masahiro, Maruyama Junko, Sawada Hirofumi, Ohashi Hiroyuki, Ikeyama Yukiko, Otsuki Shoichiro, Yodoya Noriko, Shinohara Tsutomu, Miyata Eri, Zhang Erquan, Katayama Naoyuki, Shimpo Hideto, Maruyama Kazuo, Komada Yoshihiro, Hirayama Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 A non selective endothelin receptor antagonist bosentan modulates kinetics of bone marrow derived cells in ameliorating pulmonary hypertension in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pulmonary Circulation	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2045894020919355	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 Kuroda Naoki, Masuya Masahiro, Tawara Isao, Tsuboi Junya, Yoneda Misao, Nishikawa Kenichiro, Kageyama Yuki, Hachiya Kensuke, Ohishi Kohshi, Miwa Hiroshi, Yamada Reiko, Hamada Yasuhiko, Tanaka Kyosuke, Kato Takuma, Takei Yoshiyuki, Katayama Naoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Infiltrating CCR2+ monocytes and their progenies, fibrocytes, contribute to colon fibrosis by inhibiting collagen degradation through the production of TIMP-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45012-6	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 Kageyama Yuki, Miwa Hiroshi, Tawara Isao, Ohishi Kohshi, Masuya Masahiro, Katayama Naoyuki	4. 巻 134
2. 論文標題 A population of CD20+CD27+CD43+CD38lo/int B1 cells in PNH are missing GPI-anchored proteins and harbor PIGA mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 89 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001343	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0件

〔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
---------	---------