

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16771

研究課題名(和文)大腸癌肝転移の生体内イメージング

研究課題名(英文)In vivo imaging of liver metastasis of colorectal cancer

研究代表者

水野 礼 (Rei, Mizuno)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30829487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は二光子顕微鏡を用いて、マウス大腸癌肝転移モデルマウスの観察を行い、癌細胞と好中球の相互作用の可能性を発見した。好中球が癌に促進的に働くメカニズムの一つであるNETに着目し、大腸癌患者の手術標本と術前血清の解析から、NET高発現群でRFSが有意に短縮されることを発見した。in vitro実験系で、NETが癌細胞に与える影響を調べ、NETで放出される好中球エラスターゼ(NE)が大腸癌細胞株の遊走能を有意に亢進させることを発見し、この過程でNEが癌細胞のERK活性を上昇させることも発見した。大腸癌肝転移モデルマウスでもNETを誘導した好中球が肝転移形成を促進することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、大腸癌の肝転移において、癌の微小環境である好中球が注目を集めている。本研究では癌細胞と好中球の相互作用をマウスの生体内で観察した。この結果を基に、癌のサポート役としての好中球に着目し、Neutrophil Extracellular Traps(NET)を介して、癌細胞の増殖能ではなく、遊走能を活性化していることを発見した。また、その過程においてERKが重要な役割を果たしていることも発見した。これらの結果は、大腸癌肝転移の新たなメカニズムの解明、新規治療標的、マーカー探索に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We visualized the process of liver metastasis of colorectal cancer in the mouse using two-photon microscopy and discovered the interaction between cancer cells and neutrophils in the tissue. We focused on NETs as one of the mechanisms by which neutrophils act in a cancer-promoting manner and found that the RFS was significantly shortened in the high NET expression group based on the IHC of surgical specimens and the ELISA of preoperative serum from colorectal cancer patients. We found that neutrophil elastase (NE) released by NET significantly enhanced the migratory ability of colorectal cancer cell lines, and in this process, we also found that NE increased ERK activity in cancer cells. We also found that NET-induced neutrophils promote liver metastasis in a mouse model of colorectal cancer liver metastasis.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 肝転移 生体内イメージング 好中球 二光子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において、大腸癌の罹患数・死亡者数ともに増加傾向にある。近年、手術や抗癌剤治療の進歩により、その治療成績は改善傾向にあるが、遠隔転移を認める Stage 患者の5年生存率は18.8%と低い。そのため、大腸癌克服には、大腸癌の遠隔転移を克服することが最重要であると言える。しかし、遠隔転移に関しては、そのメカニズムの詳細が不明であり、明確な治療ターゲットも同定されていないのが現状である。近年、癌の生存・成長には、癌細胞そのものだけでなく、癌を取り巻く様々な腫瘍微小環境が重要な役割を果たしていることが知られている。こうした腫瘍微小環境の中でも、以前は腫瘍に対して抑制的に働くと考えられていた好中球が、腫瘍関連好中球(Tumor associated neutrophil : TAN)として、腫瘍に促進的に作用していることが明らかになってきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、このような腫瘍関連好中球と癌細胞の相互作用が、大腸癌の肝転移形成に及ぼす影響に注目し、二光子顕微鏡を用いた生体内イメージングを通して、「生理的」環境下である生体内で、癌細胞と好中球の相互作用が、いつ、どこで、どのように癌の成長に貢献するのかということ明らかにすること、その相互作用がどのような分子メカニズムで成り立っているのかについても解明し、大腸癌肝転移の新規治療ターゲットを模索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、大腸癌肝転移形成過程を、より生理的な環境下で観察するために、マウスの大腸癌肝転移モデルと二光子顕微鏡による生体内イメージングを行う。  
大腸癌患者の切除標本を使用して、組織中の好中球が患者臨床データとどのように関連するかについて免疫染色で評価を行う。  
生体内観察で得られた知見を基に、In vitro 実験系において、ヒト大腸がん細胞株と好中球がどのように相互作用を及ぼすのかについて分子メカニズムの解明を行う。  
In vitro 実験系で得られた結果の再現性を、in vivo 実験系(肝転移モデルマウス、皮下腫瘍モデルマウス)で確認する。

## 4. 研究成果

我々は、京都大学生体蛍光イメージング室の支援を受けて、二光子顕微鏡を用いたマウス肝臓の生体内イメージング法を確立した。また、マウス大腸癌細胞株(MC38細胞およびCMT93細胞)の脾注肝転移モデルを作成し、肝臓の毛細血管内に癌細胞がトラップされる像の撮影に成功した。この際、癌細胞の近傍に好中球が近接していることを確認し、好中球と癌細胞が相互作用している可能性が示唆された。近年、一部の好中球が腫瘍促進的に作用することが報告されており、ここでも好中球が癌に促進的に作用している可能性が考えられた。我々は好中球が癌に促進的に働くメカニズムの一つである Neutrophil extracellular traps(NET)との関連について注目を行うこととした。

まず、大腸癌とNETの関係を調べるために、大腸癌患者の切除標本におけるNETのマーカーであるCit-H3の発現を調べた。Stage - の大腸癌患者133例の手術標本の免疫染色から、Cit-H3高発現群で、Overall Survival(OS)には差がなかったものの、Recurrence Free Survival(RFS)が有意に短縮されることが判明した( $p=0.015$ )。多変量解析では、リンパ節転移と、NET高発現がRFSの予後予測因子と示唆された。また、Stage - 大腸癌患者67名の術前血清を用いたELISAによる解析でも、NET高発現群では、OSに有意差は認めないものの、RFSが短縮されることが判明した( $p=0.046$ )。多変量解析で年齢、静脈侵襲、CA19-9、NET高発現がRFSの予後予測因子と示唆という結果が得られた。次にNETが癌細胞に与える影響について、in vitroでの実験を進めそのメカニズムの解明を行うこととした。

In vitro 実験系では、ヒト前骨髄性白血病細胞株HL60を導入した。HL60細胞株は、レチノイン酸(ATRA)を添加することで、顆粒球様細胞(dHL60)に分化することが知られており、このdHL60細胞株を用いて、実験を行うこととした。先行研究から好中球にphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を添加すると、NETが誘導されることが知られている。ここでは、dHL60細胞株にPMAを添加したのちに培養液を回収し、これをNET-conditioned medium(NET-CM)として以下の

実験で使用した。

NET-CM を添加して, *in vitro* で大腸癌細胞株 (HCT116, Caco-2, DLD-1, HT29) の増殖能と遊走能を調べた。NET-CM はいずれの大腸癌細胞株の増殖能に対しても影響を与えなかった。一方、Wound Healing Assay は、全ての細胞株において、NET-CM が遊走能を有意に亢進させることが判明した。NET 形成時に好中球から各種サイトカインなどが放出されることが知られているが、我々はこれらの因子が、遊走能の亢進に寄与している可能性があると考えた。そして、NET によって放出される因子の一つである好中球エラスターゼを添加した癌細胞で、遊走能が亢進することが判明した。好中球エラスターゼの阻害剤 (Silvestat) によって、NET-CM による遊走能の亢進は抑制されることが判明し、NET による遊走能促進には好中球エラスターゼが重要な役割を果たしていることが判明した。

続いて、さらなる分子メカニズムを解明するために、細胞増殖や細胞遊走において重要な役割を果たしている ERK の分子活性に着目することとした。ヒト大腸癌細胞株 HCT-116 細胞株に ERK の FRET バイオセンサーを導入し、蛍光顕微鏡を用いて NET-CM が癌細胞の ERK 活性にどのように影響を及ぼすかについての検討を行った。NET-CM、好中球エラスターゼを添加した HCT116 細胞株はコントロールに比して、ERK の活性が有意に上昇した。また、Silvestat を投与すると、これらの ERK 上昇効果を抑制することが判明し、NET-CM、好中球エラスターゼによる遊走能の亢進には ERK が重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、これらの結果が、*in vivo* でも再現可能かどうかについても検討を行った。ヌードマウスを用いた大腸癌細胞株の脾注肝転移モデルにおいても、PMA で誘導された NET を癌細胞と共に注入した群では、肝転移の形成が促進された。一方、Silvestat をさらに追加すると、投与群で肝転移形成が有意に抑制された。一方、癌細胞の皮下腫瘍モデルで同様の実験を行っても、NET 注入による増殖能に対する影響は見られず、*in vitro* と同様の結果が得られた。

本研究は、2020 年に我が国で感染が拡大をした新型コロナウイルス (COVID-19) の影響で、研究施設・実験動物施設の立ち入り制限などにより、当初の計画からやや遅れを認めているが、現在、これらの研究結果をまとめ、論文執筆を行っている段階である。

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 Mizuno R, Kawada K, Sakai Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 20-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20246254.	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
---------	---------