

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07097

研究課題名(和文) 大腸癌肝転移における腫瘍微小環境での好中球の機能・動態解明

研究課題名(英文) Neutrophil functions in the tumor microenvironment of colorectal cancer

研究代表者

板谷 喜朗 (Itatain, Yoshiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80814029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は大腸癌腫瘍微小環境における、ケモカインを介した腫瘍-間質作用に関して報告してきた。とくに、ケモカインCCL15-CCR1を介した骨髄由来細胞による腫瘍促進能や、CXCL1/8-CXCR2を介した好中球による腫瘍促進能を報告してきた。これらを包括的に調べるため、CCR1ノックアウトマウスやCXCR2ノックアウトマウス、CCR1中和抗体を使用し大腸癌の肝転移能を解析した。さらに好中球のneutrophil extracellular trap (NET)の作用に着目し、NETの肝転移促進能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は本邦の癌死亡の上位を占める癌である。原発大腸にとどまる状態であれば手術による根治的治療が可能となるが、ひとたび転移を来すと根治的治療が困難となることも多い。腫瘍微小環境における骨髄由来細胞の役割を解明し、好中球や単球/マクロファージの感染症に対する一次免疫応答機能を保持しつつ腫瘍促進能のみを阻害できる可能性を見出したことは学術的な意義が大きい。これらが将来的に臨床応用されれば、癌死亡の上位をしめる大腸癌で、直接的な死因となりうる転移制御に対するあらたな治療方法となりうることの社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils are important host cells in terms of primary immune response to infection, but are also known to promote tumor invasion/metastasis in cancer patients. We hypothesized that controlling only the tumor-promoting ability of these bone marrow-derived cells while maintaining their infection-protective function would lead to the establishment of a treatment method with fewer side effects. We have reported chemokine-mediated tumor-stromal effects in the tumor microenvironment of colorectal cancer. In particular, the chemokine CCL15-CCR1 by bone marrow-derived cells and CXCL1/8-CXCR2 by neutrophils have been reported. To comprehensively investigate these factors, we analyzed the liver metastatic potential of colorectal cancer using CCR1 knockout mice, CXCR2 knockout mice, and CCR1-neutralizing antibodies. Furthermore, we focused on the action of neutrophil extracellular trap (NET) and analyzed the ability of NET to promote liver metastasis.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 腫瘍微小環境 好中球

1. 研究開始当初の背景

多くの癌は原発巣に留まっていれば手術による根治切除が可能であるが、ひとたび転移を来すと切除不可能となることが多く、致命的となる。本邦での癌死の上位を占める大腸癌も同様に、制御不能な遠隔転移により致命的となる。大腸癌は肝転移が最も頻度の高い遠隔転移であるが、大腸癌肝転移の機序は不明なことが多く、そのメカニズム解明は急務である。近年、大腸癌の遺伝子発現の特徴を基にした分類、consensus molecular subtype (CMS)が提唱され、4つのサブタイプのうち、CMS1 (Microsatellite instability-high, MSI型)とCMS4 (間質型)といった、腫瘍微小環境の強い反応を伴う大腸癌が、CMS2(従来型)やCMS3(代謝型)に比べて予後が悪いことが示された。CMS1は免疫チェックポイント阻害剤 (immunotherapy, ICI)の登場により、T細胞による腫瘍免疫を正常化することで長期生存も見込めるようになったが、CMS4はICIが無効で、進行再発治療の有効な手段がない。CMS4はICIが無効であることから、T細胞以外の免疫細胞や間質細胞が腫瘍の進展に大きく関与していることが示唆されるため、申請者は腫瘍微小環境における骨髄由来細胞(好中球や単球/マクロファージ)の機能解明を進めることで、難治性のCMS4大腸癌の新規治療解明につながると考えた。申請者らは大腸癌腫瘍微小環境におけるケモカインシグナルを介した腫瘍-間質相互作用について多数報告してきた。とくにCCL15-CCR1やCXCL1/8-CXCR2を介した骨髄由来細胞(とくにtumor-associated neutrophil, TANやmyeloid-derived suppressor cell, MDSC)に関して報告してきており、本研究では大腸癌腫瘍微小環境における好中球系の細胞の役割を中心に解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌腫瘍微小環境における、骨髄由来細胞(好中球や単球/マクロファージ)の腫瘍促進能に関して、機能的・形態的に解明を試みることにある。大腸癌においては強い間質反応を伴う間質型大腸癌CMS4が予後不良であることが知られているが、CMS4大腸癌を予後不良たらしめる因子やその治療方法に関しては未だ未解明である。

本研究ではケモカインシグナルCCL15-CCR1とCXCL1/8-CXCR2に着目し、これらのノックアウトマウスを作成し、ケモカインシグナル抑制における腫瘍微小環境中の骨髄由来細胞での作用の同定を試みた。また、腫瘍微小環境中の好中球NETに注目し、NETの腫瘍促進能を解明することから、その阻害による腫瘍抑制効果を検討した。

3. 研究の方法

大腸癌マウスモデルを用いて、大腸癌腫瘍微小環境における好中球の機能解明を試みた。まずMC38マウス大腸癌細胞株を用いて、同種移植モデルを作成した(皮下移植モデルと肝転移モデル)。これを、野生型マウス、CCR1ノックアウトマウス、CXCR2ノックアウトマウス、CCR1/CXCR2ダブルノックアウトマウスにおける移植モデルを用いることで、ケモカインシグナルCCR1とCXCR2における腫瘍抑制効果を評価した。また、腫瘍微小環境中の好中球のとくにNETの腫瘍促進能に着目し、NETを抑制することで腫瘍増殖抑制効果がみられるかどうかをヌードマウスを用いた異種移植モデルを作成し、NET形成に重要な役割を担う好中球エラスターゼ(neutrophil elastase, NE)に着目し、その阻害剤

sivelestat を投与し、腫瘍抑制効果を検証した。

4. 研究成果

MC38 マウス大腸癌細胞株ではケモカインリガンド CCL9(CCR1 のリガンド)と CXCL8(CXCR2 のリガンド)が正常上皮細胞と比較し、かなり強く高発現しており、マウスでは CCL9-CCR1 axis、CXCL1-CXCR2 axis がメインでケモカインシグナルが走っていると考えられた。MC38 を用いた同種移植モデル (皮下移植モデルと肝転移モデル) では、MC38 大腸癌細胞株の腫瘍微小環境には CXCR2 陽性細胞が集簇していることを確認した。腫瘍微小環境に集簇する CXCR2 陽性細胞は CCR1 陽性であり、CCR1 陽性細胞と CXCR2 陽性細胞は同一のものであることを見出した。つまり、CCL9-CCR1 と CXCL1-CXCR2 はともに腫瘍微小環境において癌細胞-骨髄由来細胞の相互作用を来していると考えられた。つぎに CCR1 ノックアウトマウス、CXCR2 ノックアウトマウスを準備し、それぞれの骨髄細胞における CCR1、CXCR2 発現を測定すると、CCR1 ノックアウトマウスでは CXCR2 が、CXCR2 ノックアウトマウスでは CCR1 が野生型に比べて発現上昇しており、それぞれ代償的に作用している可能性が示唆された。まず CXCR2 ノックアウトマウスを用いて、MC38 大腸癌細胞株の同種移植モデルを作成した (皮下移植モデルと肝転移モデル)。CXCR2 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて MC38 同種移植の腫瘍増大が顕著に抑制された。つぎに CXCR2 ノックアウトマウス、CCR1 ノックアウトマウスと、CXCR2/CCR1 ダブルノックアウトマウスを用いて同様の実験を行い、CXCR2/CCR1 ダブルノックアウトマウスではさらに腫瘍増殖抑制効果がみられた。また、CXCR2 ノックアウトマウスに抗 CCR1 中和抗体を使用した場合も同様に、腫瘍増殖抑制効果が増強された。腫瘍微小環境中での好中球の機能を解明するため、ヒト大腸癌患者サンプルの免疫染色を行った。大腸癌腫瘍周囲には好中球が多く集積している患者から、それほど集積の多くない患者までさまざまであった。我々はとくに NET に着目し解析することとし、NET のマーカーであるシトルリン化ヒストン(Cit-H3)も免疫染色を行った。Cit-H3 の high、low 二群に分けて Stage I から III の大腸がん患者の予後を検討すると、Cit-H3 high が独立した予後不良因子となった。NET が腫瘍微小環境中で癌細胞に及ぼす影響を調べるため、ex vivo で解析を行った。phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) は好中球から NET を誘導する試薬として知られている。まず好中球を PMA 処理し、その上清(NET-CM)で癌細胞を刺激した。すると、癌細胞の増殖能は不変であったが、遊走能が増加した。NET 形成に必須となっている NE の阻害剤 sivelestat を加えるとこの遊走能増加効果は抑制された。大腸癌細胞株 HCT116 を用いて、NET-CM または NE における癌細胞遊走能評価のため、ERK 活性を FRET biosensor を用いて測定したところ、HCT116 の ERK 活性は NET-CM や NE 投与で著明に上昇し、この活性上昇は sivelestat で抑制された。最後に HCT116 のヌードマウスへの異種移植モデル (皮下移植モデルと肝転移モデル) において、sivelestat 投与による腫瘍抑制効果を検証したところ、皮下移植モデル (原発巣での腫瘍増殖能力を想定している) では sivelestat は腫瘍増殖抑制効果は見られなかったが、肝転移モデル (原発から転移を形成する腫瘍細胞の遊走能も関係してくる) では sivelestat 投与により有意に肝転移が抑制された。以上より、好中球は NET を介して大腸癌肝転移形成に深く関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Okamoto Michio, Mizuno Rei, Kawada Kenji, Itatani Yoshiro, Kiyasu Yoshiyuki, Hanada Keita, Hirata Wataru, Nishikawa Yasuyo, Masui Hideyuki, Sugimoto Naoko, Tamura Takuya, Inamoto Susumu, Sakai Yoshiharu, Obama Kazutaka	4. 巻 24
2. 論文標題 Neutrophil Extracellular Traps Promote Metastases of Colorectal Cancers through Activation of ERK Signaling by Releasing Neutrophil Elastase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1118～1118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24021118	査読の有無 無
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 Hirata Wataru, Itatani Yoshiro, Masui Hideyuki, Kawada Kenji, Mizuno Rei, Yamamoto Takamasa, Okamoto Takuya, Ogawa Ryotaro, Inamoto Susumu, Maekawa Hisatsugu, Okamura Ryosuke, Kiyasu Yoshiyuki, Hanada Keita, Okamoto Michio, Nishikawa Yasuyo, Sugimoto Naoko, Tamura Takuya, Hatano Etsuro, Sakai Yoshiharu, Obama Kazutaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Downregulation of osteoprotegerin in colorectal cancer cells promotes liver metastasis via activating tumor-associated macrophage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-49312-w	査読の有無 無
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 Masui Hideyuki, Kawada Kenji, Itatani Yoshiro, Hirai Hideyo, Nakanishi Yuki, Kiyasu Yoshiyuki, Hanada Keita, Okamoto Michio, Hirata Wataru, Nishikawa Yasuyo, Sugimoto Naoko, Tamura Takuya, Sakai Yoshiharu, Obama Kazutaka	4. 巻 x
2. 論文標題 Synergistic antitumor activity by dual blockade of CCR1 and CXCR2 expressed on myeloid cells within the tumor microenvironment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-024-02710-x	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 板谷喜朗
2. 発表標題 実臨床を模した大腸癌マウスモデルの作出－自然発生大腸癌の薬剤耐性モデルや肝転移モデルの作成と癌治療のネクストステージ
3. 学会等名 第121回日本外科学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------