

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590322

研究課題名(和文) マウス大腸癌肝転移モデルにおけるヒスタミンの転移抑制効果とその応用

研究課題名(英文) Suppressive role of histamine in hepatic colorectal cancer metastasis

研究代表者

倉増 敦朗 (KURAMASU, Atsuo)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90302091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌肝転移モデルマウスにおいて、生理活性物質ヒスタミンの役割を調べた。ヒスタミンを作ることができないマウスでは、正常のマウスに比べて肝転移後の生存期間が短く、ヒスタミンは大腸癌肝転移に対して抑制的に働いていることがわかった。そのメカニズムとして、制御性T細胞という抗腫瘍免疫反応を抑制する細胞が関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Role of histamine in hepatic colorectal cancer metastasis was investigated using mice deficient of endogenous histamine. In mouse hepatic colorectal cancer metastasis model, mice lacking histamine-synthesizing enzyme showed significantly shorter survival, suggesting that histamine had suppressive role in hepatic metastasis. In spleen and liver from histamine-deficient mice with hepatic metastasis, regulatory T cells were significantly increased, showing a possible mechanism of Treg-mediated suppression of anti-tumor immune response.

研究分野：薬理学

キーワード：ヒスタミン 大腸癌 肝転移 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は早期に発見して治療すればほぼ治癒が可能であるが、進行度が高くなると有効な治療法が少なく生存率も悪い。2013年のデータによれば、我が国で47654人ものが大腸癌により死亡している。大腸癌による死亡数は増加傾向にあり今後も増え続けると予想されている。大腸癌の予後を決めるのは、他の癌種と同様に遠隔臓器への転移の有無である。大腸癌は血行性に肝臓へ転移することが最も多いので、肝転移を制御することは大腸癌の予後改善に大きく寄与するものと考えられる。

ヒスタミンは様々な機能を有する生理活性アミンであり、生体内ではL-ヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine Decarboxylase, HDC) により合成される。ヒスタミンはGタンパク質共役受容体である4種類の受容体 (H1R, H2R, H3R, H4R) を介して作用する。

癌免疫におけるヒスタミンの役割についてはこれまでに多くの報告がある。それらの多くは、ヒスタミンが癌の増殖に対して促進的に働くというものである。例えばヒスタミン H2 受容体拮抗薬は一部の癌に対して抗腫瘍効果を示す (Takahashi et al. Biochem Biophys Res Commun. 2002)。しかし一方で、近年骨髄由来抑制細胞という免疫抑制性の細胞集団の成熟をヒスタミンが促進し、免疫抑制を解除する (即ち腫瘍免疫を増強する) との報告もある (Yang et al. Nat Med. 2011)。このように、局面によってヒスタミンによる腫瘍免疫応答が異なる理由として、免疫細胞ネットワークの中で、ヒスタミンを産生する細胞とヒスタミンが作用する相手の細胞がともに複数存在することが考えられる。しかし、大腸癌の肝転移におけるヒスタミンの役割は全く分かっていない。

2. 研究の目的

ヒトの大腸癌肝転移を模したマウスの大腸癌肝転移モデルを用いて、ヒスタミンの役割を調べる。さらに関与する細胞やヒスタミン受容体など、そのメカニズムを明らかにし、大腸癌肝転移の予防および治療の方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌転移モデル

肝転移モデルでは、まずマウスを麻酔下に開腹し、脾臓をクリッピングした後に半切する。次に、一方よりマウス大腸癌由来 CT26 細胞 (1×10^5 個) を注入する。場合により HDC 発現 CT26 細胞を注入した。半切した脾臓のもう一方は後に免疫細胞を解析するため温存する。肺転移モデルでは、同細胞を尾静脈より注入する。野生型として Balb/c マウスを、また、ヒスタミン合成酵素である HDC の欠損マウスを用いた。マウスは自由飲水、自由摂食条件下で飼育した。生存曲線をログランク法で比較した。

(2) ハイドロダイナミックインジェクション
マウス肝臓に遺伝子を発現させる方法として、ハイドロダイナミックインジェクションを用いた。マウス体重の10%に相当する容量の生理食塩水に溶解したプラスミドを尾静脈より5秒以内に注入した。HDC 発現プラスミド HDC54k-pcDNA3 およびコントロールプラスミド pcDNA3.1 を1匹あたり10マイクログラム用いた。肝転移処置の前日に一回投与した。

(3) ヒスタミン測定

Balb/c マウスに肝転移処置を施した後、7、14、21日後に、マウスを麻酔下に右心房より肝臓を灌流した後、安楽死させ、肝臓を摘出した。3%過塩素酸溶液中でホモジナイズし、遠心分離した上清中のヒスタミン量を HPLC 法で測定した。

(4) フローサイトメトリー

脾臓をすりつぶした後、溶血処理をしたものを脾細胞とした。肝臓はコラゲナーゼおよび DNase で処理した後、45%パーコル溶液に懸濁し、60%パーコル溶液に重層した。遠心分離後、中間層の細胞を解析に用いた。定法に従って表面抗原および細胞内抗原を染色し、Tリンパ球 (CD4 陽性、CD8 陽性、Treg) NK 細胞、NKT 細胞、樹状細胞、マクロファージ、骨髄由来抑制細胞をフローサイトメーター (FACS Calibur) で解析した。

4. 研究成果

(1) マウス大腸癌肝転移モデルおよび肺転移モデルにおける内因性ヒスタミンの役割

HDC 欠損マウスを用いてマウス大腸癌肝転移モデルを作成し、生存率に対する内因性ヒスタミンの影響を調べた。生存期間中央値を比較すると、野生型マウス (Balb/c) の40日に対し、HDC 欠損マウスは24日であった (図1)。またログランク検定では、これら二群間に有意な差 (P 値 0.019) が認められた。次に、HDC 欠損マウスを用いてマウス大腸癌肺転移モデルを作成し、生存率に対する内因性ヒスタミンの影響を調べた。野生型マウス (Balb/c) 及び HDC 欠損マウスの生存期間中央値は、それぞれ44日及び40日であった。またログランク検定では、これら二群間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、内因性のヒスタミンは大腸癌の転移に対し抑制的に働き、その作用は肝臓に特異的であることがわかった。

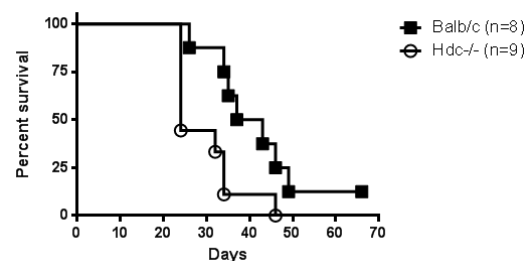


図1 内因性ヒスタミンの有無による大腸癌肝転移モデルマウス生存曲線の比較

(2) メカニズム解析

マウス大腸癌肝転移モデルにおける肝臓ヒスタミン含有量の経時的变化

内因性ヒスタミンの有無により生存期間に差が出るという結果をふまえ、肝転移処置後に肝臓のヒスタミン含有量が経時的にどのように変化するかを調べた。Balb/c マウスを用いて肝転移処置を施したのち、7、14、21 日後に肝臓を摘出しヒスタミン含有量を測定した。対照群として偽手術を施したマウスを用いた。7 日後及び 14 日後では、肝ヒスタミン含有量はそれぞれ 0.4、0.35 pmol/mg と対照群に比べ差はなかったが、21 日後では 1.8 pmol/mg であり、対照群の 0.39 pmol/mg よりも有意に増加した。

マウス大腸癌肝転移モデルにおける各種免疫細胞の経時的变化

脾臓および肝臓における免疫細胞の経時的な数的変化を野生型マウスと HDC 欠損マウスで比較した。脾臓では、制御性 T 細胞が HDC 欠損マウスで肝転移処置後 3、7、14 日後いずれの時点でも増加していた(図 2)。肝臓では、処置後 7 および 14 日において制御性 T 細胞が、HDC 欠損マウスで増加していた(図 3)。また、樹状細胞が処置後 14 日で、HDC 欠損マウスで減少していた。以上の結果から、ヒスタミンによる肝転移抑制機序には、ヒスタミンによる制御性 T 細胞の増殖抑制が関与していることが示唆された。肝転移処置後早期においては肝全体のヒスタミン含有量に有意な変化は認めないが、腫瘍微小環境においては何らかの細胞から産生されたヒスタミンにより免疫細胞数に変化が生じたと考えられる。マスト細胞からのヒスタミンが

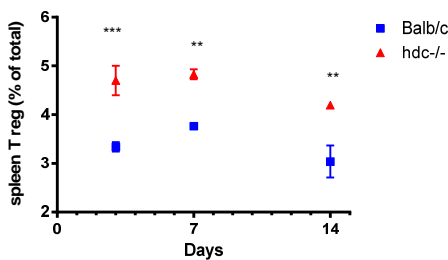


図 2 大腸癌肝転移処置後の脾臓制御性 T 細胞数の経時的变化

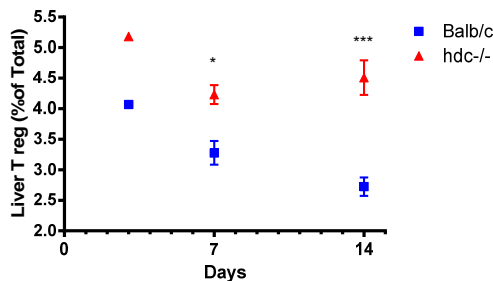


図 3 大腸癌肝転移処置後の肝臓制御性 T 細胞数の経時的变化

ヒスタミン H₁ 受容体を介して制御性 T 細胞の増殖を抑制するという報告がある (Forward et al. J. Immunol. 2009)。内因性ヒスタミンの欠如によりこの抑制が解除された結果、制御性 T 細胞が増殖し、結果的に腫瘍に対する免疫が抑制され、生存期間の短縮につながったと予想される。

(3) マウス大腸癌肝転移モデルにおける肝臓局所のヒスタミンの役割

マウス大腸癌肝転移モデルにおけるヒスタミンの転移抑制効果について、それが肝臓局所のヒスタミンによるものかを調べた。HDC 欠損マウスを用いて、CT-26 細胞または HDC 発現 CT-26 細胞を、脾臓から肝臓に接種し肝転移を作成後、生存曲線を比較した。60 日後の生存率は CT-26 細胞接種群で 33%であったのに対し、HDC 発現 CT-26 細胞接種群では 80%であった。またロケランク検定ではこれら二群間に有意な差 (P 値 0.016) が認められた。CT-26 細胞と HDC 発現 CT-26 細胞は *in vitro* での増殖能に差はないことから、HDC 発現 CT-26 細胞が産生したヒスタミンが転移に対し抑制的に働いたと考えられる。つまり肝臓局所におけるヒスタミンが肝転移に抑制的に働くということが示唆される。

次に肝臓局所のヒスタミンを人為的に増やすことで肝転移を抑制することができるかどうか調べた。このために HDC 遺伝子発現プラスミドをヒドロダイナミックインジェクションで投与した。ヒドロダイナミックインジェクションでは投与したプラスミドは一過性に肝臓で取り込まれることが知られている。HDC 遺伝子を含まない対照プラスミドを投与した群では生存期間中央値が 38 日であるのに対し、HDC 遺伝子発現プラスミドを投与した群では 47.5 日であった。有意差は認められなかったものの、HDC を発現させた群の方が生存期間が長くなる傾向が認められた。一回の投与のみでもある程度の効果が認められたことから、肝臓のヒスタミンを増加させることで肝転移を予防できる可能性がある。

<引用文献>

Takahashi K, Tanaka S, Furuta K, Ichikawa A. Histamine H₂ receptor-mediated modulation of local cytokine expression in a mouse experimental tumor model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297:1205-10.

Yang XD, Ai W, Asfaha S, Bhagat G, Friedman RA, Jin G, Park H, Shykind B, Diacovo TG, Falus A, Wang TC. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b+Ly6G+ immature myeloid cells. *Nat Med.* 2011;17:87-95.

Forward NA, Furlong SJ, Yang Y, Lin TJ, Hoskin DW. Mast cells down-regulate CD4+CD25+ T regulatory cell suppressor function via histamine H1 receptor interaction. J Immunol. 2009;183:3014-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shindo Y, Yoshimura K, Kuramasu A, Watanabe Y, Ito H, Kondo T, Oga A, Ito H, Yoshino S, Hazama S, Tamada K, Yagita H, Oka M. Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. Anticancer Res. 2015 Jan;35(1):129-36.

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/129.long>

Maeda N, Yoshimura K, Yamamoto S, Kuramasu A, Inoue M, Suzuki N, Watanabe Y, Maeda Y, Kamei R, Tsunedomi R, Shindo Y, Inui M, Tamada K, Yoshino S, Hazama S, Oka M. Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. Ann Surg Oncol. 2014 Dec;21 Suppl 4:S546-54.

doi: 10.1245/s10434-014-3564-2.

Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, Tsunedomi R, Shindo Y, Matsukuma S, Maeda N, Kanekiyo S, Suzuki N, Kuramasu A, Sonoda K, Tamada K, Kobayashi S, Saya H, Hazama S, Oka M. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. Int J Oncol. 2014 Nov;45(5):1857-66.

doi:10.3892/ijo.2014.2603.

〔学会発表〕(計 3 件)

倉増敦朗、若林深恵、本田健、樋口友莉恵、乾誠、谷内一彦 低分子量G蛋白質 Rac2 はヒスタミン H4 受容体を介するマウスマスト細胞のケモタキシスを媒介する 第 87 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 19 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

倉増敦朗、吉村清、井上萌子、玉田耕治、田中智之、前山一隆、乾誠 マウス大腸癌肝転移モデルにおけるヒスタミンの転移抑制効果 第 67 回日本薬理学会西南部会 2014 年 11 月 23 日 産業医科大学(福岡県北九州市)

倉増敦朗、若林深恵、本田健、小口紗綾、樋口友莉恵、乾誠、谷内一彦 ヒスタミン H4 受容体を介したマスト細胞のケモタキシスにおける Rac - ERK 経路の役割 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日

仙台国際センター(宮城県仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉増 敦朗(KURAMASU, Atsuo)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90302091

(2) 研究分担者

吉村 清(YOSHIMURA, Kiyoshi)
国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長
研究者番号: 30346564

玉田 耕治(TAMADA, Koji)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00615841