

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293095

研究課題名(和文) Ras-Raf-ERK/MAPK経路抑制による炎症・がん制御の分子機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of inflammation and inflammation-related cancer by regulating Ras-Raf-ERK/MAPK

研究代表者

松川 昭博 (MATSUKAWA, AKIHIRO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90264283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、Ras-Raf-ERK/MAPKとその内因性抑制因子Spred-2に焦点をあて各種動物モデルを用いて、ERK経路抑制による炎症とがんの制御機構を明らかにした。検討結果から、Spred-2は種々のモデルで炎症制御に中心的な役割を担うことが明らかとなり、抗炎症の新規ターゲットになると考えられた。また、ヒトがん組織に発現するSpred-2は、細胞のがん化とがん進展に密接に関係する事が示唆された。さらに、炎症反応を制御するSpred-2は、がん細胞及び間質細胞の共存する微小炎症環境で、がんの増殖・進展に関わる可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have analyzed the role of Ras-Raf-ERK/MAPK and its endogenous inhibitor, Spred-2 in various animal models, using Spred-2 knock-out (KO) mice. We have demonstrated that Spred-2 plays a central role in the regulation of inflammation in various types of inflammation. Our results suggest that Spred-2 can be a new target for controlling inflammation. We also demonstrated that Spred-2 expressed in clinical cancer tissue may be involved carcinogenesis and cancer progression. Furthermore, our results indicate that Spred-2 may be essential regulator of cancer metastasis by modulating epithelial mesenchymal transition (EMT).

研究分野：実験病理学

キーワード：炎症 シグナル伝達・抑制 炎症とがん

1. 研究開始当初の背景

炎症は、病原刺激を取り除く生体防御反応であるが、過剰な反応は健全組織を傷害し、生命の危険をもたらす。炎症は「諸刃の剣」であり、絶妙なバランスで調節される必要がある。申請者らは、敗血症など感染症モデルを用いて以下を明らかにしてきた。Th1/2 サイトカインやケモカインによって自然免疫の賦活と抑制が誘導される (J. Immunol. 163:6148, 1999. 164:2738, 5362, 2000. Infect. Immun. 68:6108, 2000) CCR8/4, TLR9, DLL1/4 といった細胞表面レセプターは炎症反応発動・抑制のゲイトキーパーである (FASEB J. 20:302, 2006. Eur. J. Immunol. 38:2290, 2008. J. Immunol. 178:3777, 2007. J. Clin. Invest. 119:33, 2009. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 180:1227, 2009. Infect. Immun. 77:108, 2009. PLoS One. 5:e12172, 2010. PLoS Pathog. 7:e1002341, 2011) 炎症反応は、シグナル伝達因子 JAK-STAT とそのフィードバック系 SOCS により制御される (J. Exp. Med. 193:679, 2001. J. Immunol. 171:6198, 2003. 175:3354, 2005. 177:8650, 2006. 178:3777, 2007. Clin. Immunol. 133:382, 2009)。

がんの20%は慢性炎症が原因とされる。がんは治らない傷であり、がんの組織を構成する細胞群は炎症修復期に見られる細胞群と類似している (N. Engl. J. Med. 25:315, 1986)。炎症反応・炎症メディエーターは、がんの発症、発育、進展に深く関わる (Gastroenterology 138:2101, 2010)。炎症性サイトカインで活性化される転写因子 NF- κ B は発がんプロモーターであり (Nature 431:461, 2004)、シグナル伝達因子 STAT3 の持続活性化は腫瘍促進性に働く (Curr. Pharm. Des. 18:3831, 2012)。このように、炎症反応・細胞内情報伝達とがんの関連が明らかになってきた。

細胞内シグナル伝達経路の中で、細胞のがん化と最も密接に関連しているのは、Ras-Raf-ERK/MAPK 経路である (Biochem. Biophys. Acta. 1773:1263, 2007)。申請者は、Ras-Raf-ERK 経路の劇症肝炎における役割を明らかにする中で、その生体内抑制因

子である Spred-2 (Raf の抑制に働く) の重要性を明らかにした (Clin. Immunol. 144:272, 2012)。Spred-2 は各種臓器に常時発現し (BBRC. 302:767, 2003)、生体恒常性維持に働くと考えられる。ERK 経路の抑制はがん制御のターゲットと考えられている (Expert Opin. Ther. Targets 16:103, 2012)。以上より、Spred-2 は炎症とがんをつなぐ抑制系の missing link ではないか、との発想に至った。細胞の増殖・分化・細胞死を誘導する ERK 経路の制御は、がん抑制のターゲットの1つである (Curr Opin Investig Drugs. 9: 614, 2008)。本研究は、ERK 経路に着目し、炎症とがんをつなぐ抑制系の missing link を明らかにする独創的な取組である。

2. 研究の目的

本研究では、Ras-Raf-ERK/MAPK 経路抑制による炎症とがんの制御機構を明らかにし、炎症とがんをつなぐ抑制系の missing link を明らかにする。これにより、シグナル伝達抑制による炎症・がん制御の分子機構を確立する。以下にしたがって、ERK 経路抑制による炎症とがんの制御機構を明らかにし、炎症とがんをつなぐ抑制系の missing link を明らかにし、疾患制御パラダイムを確立する。

- 1) 炎症モデル動物による ERK 活性化と Spred-2 による自然免疫制御機構の解明
- 2) ヒトがん組織における ERK 活性化・Spred-2 の発現とその意義
- 3) 炎症発がん、がん転移モデルにおける ERK 活性化と Spred-2 の役割

3. 研究の方法

本研究では、以下にしたがって ERK 経路抑制による「炎症」と「がん」の制御機構に着目し、炎症とがんをつなぐ抑制系の missing link を明らかにして ERK 経路抑制による疾患制御パラダイムを確立する。

- 1) 炎症モデル動物での ERK 経路による免疫制御機構

- 2) ヒトがん組織での ERK 活性化・Spred-2 の発現とその意義
- 3) 発がん、がん転移モデルでの ERK 活性化と Spred-2 の役割

【炎症モデルの解析】

異なる炎症モデルを用いて、ERK 経路の病態形成に及ぼす役割を明らかにする。

1. 炎症局所の採取検体を用いて、ERK 活性化と Spred-2 の発現を経時的に明らかにする。
2. サイトカイン産生と病態の関係を観察する。
3. ERK inhibitor (U0126 等) 投与時の病態変化を確認し、ERK 経路の意義を明らかにする。
4. ERK inhibitor 投与後のサイトカイン産生の変化を観察する。
5. 病態形成に働くサイトカインの主たる産生細胞を同定する。
6. Spred-2 欠損マウスに炎症モデルを導入し、ERK 過剰時の病態変化を比較検討する。
7. 骨髄 chimera マウス (野生型骨髄 Spred-2KO マウスへ、Spred-2KO 骨髄 野生型マウスへ) を用いて病変の違いが炎症細胞によるのか臓器細胞によるのか、を検証する。
8. Spred-2-flox マウスを作製し、組織特異的 Spred-2 欠損マウスで病態形成に関わる細胞 (炎症細胞 / 臓器実質細胞 / 非実質細胞) を同定する。

【ヒトがん組織の解析】

1. ヒトがん組織における、ERK 活性化と Spred-2 発現を調べる
2. 上記ヒトがん組織を用いて、がんの進展度、分化度、浸潤様式と ERK 活性化・Spred-2 発現を比較検討する。

【発がん、がん転移モデル】

1. DSS (dextran sulfate sodium) 誘発結腸がんモデルでの ERK の活性化と病変の変化を観察する。次に、Spred-2KO マウスでの炎症発がんを

野生型と比較検討する。

2. がん細胞株を野生型マウスおよび Spred-2KO マウス、組織特異的 Spred-2KO マウスに投与し、がんの生着と増殖、転移の違いを比較検討する。
3. がん細胞株の Spred-2 発現を修飾し (siRNA で消去、遺伝子導入で高発現) マウスに接種して、がんの発育・転移を比較検討する。

4. 研究成果

【炎症モデルの解析】

炎症モデルを用いた検討により、ERK-MAPK 経路による免疫制御機構を、その内因性抑制因子 Spred-2 に焦点を絞って解析した。

[敗血症モデル]

感染性敗血症モデルにおけるマウス生存率は、Spred-2 欠損マウスは野生型マウスに比して有意に高かった。この時、Spred-2 欠損マウスでは炎症細胞浸潤の増加、サイトカインの産生上昇が確認できた。また、Spred-2 欠損マクロファージの細菌貪食能は野生型と比較して有意に亢進していた。そのメカニズムとして、マクロファージ上の補体レセプターの発現は亢進していることを見いだした。以上より、Spred-2 は自然免疫に負の影響を及ぼす事が判明した。

[ConA 誘導劇症肝炎モデル]

ConA 誘導劇症肝炎モデルでの肝傷害は Spred-2 欠損マウスで増悪し、この時、肝細胞のアポトーシスおよびネクローシスは有意に増強していた。Spred-2 欠損マウスでは、血中 IFN γ レベルの上昇と肝臓中の CD8T 細胞の増加が見られ、Perforin や Granzyme B の産生は上昇していた。リンパ球欠損マウスでは肝障害は認めず、IFN γ 産生は誘導されなかった。クッパー細胞を野生型および Spred-2 欠損マウスより単離し、ConA および IFN γ で刺激すると、Spred-2 欠損クッパー細胞での CXCL9/10 の有意な産生上昇を認めた。以上より、Spred-2 欠損マウスでは、肝臓中の T 細胞 / NKT 細胞により誘導される IFN γ が上昇し、これにより CXCL9/10 の産生誘導、それによる CD8T 細胞の増加により肝

障害は増悪したと考えられた。

[ARDS モデル]

マウス気道内にLPSを投与して誘導するARDSモデルを用いて解析した。野生型に比べSpred-2欠損マウスでは急性肺炎は増悪し、局所でのサイトカイン、ケモカインは上昇していた。この時、ERKの過活性化は肺胞上皮細胞と炎症マクロファージに見られ、Spred-2欠損マウスで見られた炎症増悪はU0126で抑制された。次に、MLE-12細胞（肺胞上皮細胞）とRAW264.7細胞（マクロファージ）にSpred-2 si-RNAを導入してLPSで刺激したところ、サイトカイン・ケモカイン産生は増加し、逆にSpred-2発現プラスミドを導入したところ、その産生量は低下した。以上より、Spred-2は肺胞上皮および肺胞マクロファージにおけるサイトカイン・ケモカイン産生を抑制し、炎症制御に働くことが示された。

[DDS 腸炎モデル]

マウスにDDSを経口投与して腸炎を誘導した。Spred-2KOマウスでは腸炎発症は有意に低下した。このとき、炎症重篤度に差はないもののSpred-2KOマウスでは創傷治癒が早く、腺上皮の再生が促進されていることが判明した。骨髓キメラマウスを作成して解析した結果、創傷治癒促進は腺上皮に依存した現象であることが確認できた。MLE-12細胞のスクラッチテストでも、Spred-2 siRNA導入により上皮の増殖は促進され、Spred-2発現プラスミドの導入で上皮の増殖は抑制された。以上より、腺上皮の修復にSpred-2が重要な役割を担うことを見出した。

[H1N1 肺炎モデル]

インフルエンザA (pd2009H1N1)で死亡した剖検肺では、ERK-MAPKの内因性抑制因子であるSpred-2の発現が検出された。そこで、インフルエンザA (A/PR/8)をマウスに投与したモデルを用いて、ERK-MAPKとSpred-2の役割を解析した。インフルエンザAをSpred-2欠損マウスに感染させると、野生型に比べウイルス量の増加、炎症反応の増強、高サイトカイン産生がみられ、マウスの致死率は増加した。骨髓キメラマウス等の解析から、肺胞上皮細胞でのERK-MAPKの過剰発現がこの原

因と考えられた。マイクロアレイの結果等から、肺胞上皮でのphosphatidylinositol 3-kinase signalingの増加がウイルス量の増加に関連していることが判明した。以上より、Spred-2は、インフルエンザ感染の治療ターゲットになることを示した。

以上の結果は、シグナル伝達抑制による免疫機構の解明は、難治性炎症疾患、炎症免疫疾患の新たな治療ターゲットに繋がる可能性があることを示唆する。今後、本研究課題で作製した、Spred-2過剰発現マウスや組織特異的Spred-2欠損マウスを用いて、さらに詳細なメカニズムを解析していく。

【ヒトがん組織の解析】

ヒトがん組織でのSpred-2の発現を免疫組織学的に解析した。肺がん、乳がん、膀胱がん、食道がん、胃がん、大腸がんについて検討したところ、膀胱がんについて新しい治験を得た。すなわち、正常組織ではSpred-2は強く細胞質に発現しているものの、異形成および上皮内がんではその発現は減弱し、進行がんになると、細胞膜に陽性を示す傾向を見いだした。膜型Spred-2の発現と、腫瘍細胞の活性型ERK発現には逆相関が見られた。ERK発現とMib-1陽性細胞数には相関がみられた。Spred-2により内因性抑制機構の解除ががん化、およびがんの浸潤に関与することが示唆された。

現在、がんの浸潤の程度とSpred-2発現、転移の有無などについて検討している。また、他のがん組織についても、検討開始している。

【発がん、がん転移モデル】

AOM-DSS (dextran sulfate sodium)誘発結腸がんモデルを作成し、がん組織でのERKの活性化を確認した。そこで野生型とSpred-2欠損マウスにAOM-DSS結腸がんモデルを作成し、病変の変化を観察したが、両者間に有意な差は見いだせなかった。現在、Spred-2発現マウスを用いて、腸炎および腸炎誘発がんに変化がないか検証している。

Spred-2欠損マウスの皮下組織に肺癌細胞(LLC)を接種し、野生型との比較検討を行った。その結果、局所の腫瘍細胞の成長速度

に変化はなかった。肺や肝臓への転移についても有意な差は得られなかった。Spred-2 過剰発現マウスへの接種実験を行うとともに、腫瘍細胞特性により可能性があり、他のがん細胞埋植実験を行っていく。

がん細胞株(A549 等)の Spred-2 発現を siRNA で消去したところ、細胞増殖、浸潤能の増悪を認めため、Spred-2 はがん細胞の増殖・進展を抑制的に調節していることが示唆された。さらに、肺癌細胞 A549 を TGF β で刺激すると、上皮細胞の形態は紡錘形に変化し、上皮間結合が減少する (EMT)。この EMT は、Spred-2 siRNA 導入により促進されることを見いだした。Spred-2 ががんの転移に関わる可能性があり、現在さらに解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Ito T, Itakura J, Takahashi S, Sato M, Mino M, Fushimi S, Yamada M, Morishima T, Kunkel SL, Matsukawa A. Sprouty-Related Ena/Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Homology 1-Domain-Containing Protein-2 Critically Regulates Influenza A Virus-Induced Pneumonia. Crit Care Med. 2016 Jan 11. [Epub ahead of print] 査読有
2. Yoshimura T, Imamichi T, Weiss JM, Sato M, Li L, Matsukawa A, Wang JM. Induction of monocyte chemoattractant proteins in macrophages via the production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by breast cancer cells. Front Immunol. 2016 Jan 20;7:2. doi:10.3389/fimmu.2016.00002 eCollection 2016. 査読有
3. Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, Fujii Y, Tsukahara H, Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T. Anti-high

mobility group box-1 monoclonal antibody treatment provides protection against influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice Crit Care. 2015 Jun 11;19:249. doi:10.1186/s13054-015-0983-9. 査読有

4. Yamamoto S, Yamane M, Yoshida O, Waki N, Okazaki M, Matsukawa A, Oto T, Miyoshi S. Egr-1 plays an important role in ischemia-reperfusion injury in lung transplants by regulating polymorphonuclear neutrophil infiltration. Transplantation. 2015 Nov;99(11):2285-93. 査読有
5. Xu Y, Ito T, Fushimi S, Takahashi S, Itakura J, Kimura R, Sato M, Mino M, Yoshimura A, Matsukawa A. Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in mice. PLoS One. 2014 Oct 2;9(9):e108914 査読有
6. 松川昭博, 伊藤利洋 Ras-Raf-ERK 経路からみた A 型インフルエンザ (H1N1) 感染 NEUROINFECTION(神経感染症) Vol 19. No. 1 ,p40-42. 2014 査読無

[学会発表](計 57 件)

1. 楊旭、伊藤利洋、伏見聡一郎、高橋索真、板倉淳哉、佐藤美和、美野愛、松川昭博: Spred-2 deficiency exacerbates LPS-induced acute lung inflammation 第 104 回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2 名古屋国際会議場 (愛知)
2. 河原明奈、板倉淳哉、小田晋輔、伏見聡一郎、伊藤利洋、松川昭博: 創傷治癒は Spred-2 欠損で短縮する 第 104 回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2 名古屋国際会議場 (愛知)
3. 伊藤利洋、板倉淳哉、河原明奈、小田晋輔、伏見聡一郎、松川昭博: インフルエンザ (H1N1) 感染症ならびに二次性細菌性肺炎のエビジェネティクス解析 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島国際会議場 (広島)

4. 板倉淳哉、小田晋輔、河原明奈、佐藤美和、美野愛、伏見聡一郎、伊藤利洋、松川昭博：Spred2 欠損マウスにおける敗血症抵抗性のメカニズム 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島国際会議場（広島）
5. 水田亮、伊藤利洋、板倉淳哉、伏見聡一郎、松川昭博：間質性肺炎モデルにおける Spred-2 の役割 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島国際会議場（広島）
6. 松川昭博：Ras-Raf-ERK 経路からみた A 型インフルエンザ(H1N1)感染 第 18 回日本神経感染症学会総会 2013.10.11-12 シーガイアコンベンションセンター（宮崎）
7. 高橋索真、平岡佐規子、伏見聡一郎、伊藤利洋、板倉淳哉、木村亮治郎、楊旭、篠倉美理、中川裕貴、住居優一、竹井大介、井口俊博、半井明日香、森藤油記、秋田光洋、原田馨太、岡田裕之、松川昭博、山本和秀：Ras/ERK 系と大腸粘膜治癒-Ras/ERK 系の阻害因子 Spred-2 の解析を通じてー 第 50 回日本消化器免疫学会総会 2013.8.1-2. ホテルグランドヒル市ヶ谷（所沢）
8. 揚 旭、伊藤利洋、板倉淳哉、木村亮二郎、佐藤美和、美野愛、松川昭博：Spred2 deficiency exacerbates inflammatory response in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. 第 34 回日本炎症・再生医学会 2013.7.2-3 京都国際会館（京都）
9. 松川昭博、伊藤利洋：A 型インフルエンザウイルス(H1N1)感染と MAPK 経路 第 102 回日本病理学会総会 シンポジウム 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）
10. 板倉淳哉、伊藤利洋、佐藤美和、美野愛、伏見聡一郎、松川昭博：Spred2 欠損マウスは敗血症抵抗性を示す 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）
11. 篠倉美理、木村亮二郎、伊藤利洋、松川

昭博：Spred2 発現ベクターの作製とその応用 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）

〔図書〕(計 1 件)

松川昭博：免疫応答と疾患-病理と基礎生命科学の接点 [2] 病理と臨床 Vol 33, No3. 2015. 311-316 文光堂

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/byouri/pathology-1/HOME.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松川 昭博 (MATSUKAWA, Akihiro)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90264283

(2) 研究分担者

伊藤 利洋 (ITO, Toshihiro)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師 (現在、奈良県立医科大学免疫学・教授)
研究者番号：00595712

(3) 連携研究者

該当なし ()

(4) 研究協力者

高橋 索真 (TAKAHASHI, Sakuma)
伏見 聡一郎 (FUSHIMI, Soichiro)
平 麻子 (TAIRA, Asako)
板倉 淳哉 (ITAKURA, Junya)
渡邊 治之 (WATANABE, Haruyuki)
佐藤 美和 (SATO, Miwa)