

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460951

研究課題名(和文) MCP-1およびテネascin Cによる造血細胞由来癌関連線維芽細胞の動員と大腸癌進展

研究課題名(英文) Relationship between the recruitment of hematopoietic cell-derived cancer-associated fibroblasts by MCP-1 or tenascin C and the development of colon cancer

研究代表者

榎屋 正浩 (MASUYA, MASAHIRO)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30281083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸炎では様々な血液細胞が大腸に浸潤し癌微小環境を形成することが知られているが、注目されるのは癌関連線維芽細胞(CAF)である。我々はこれまでに、単球がMCP-1/CCR2 axisを介して傷害臓器に浸潤して線維芽細胞や筋線維芽細胞様細胞に分化しうることを確認しており、CAFも単球由来ではないかとの仮説を立てた。EGFPマウスの骨髄細胞を移植したマウスにAOM/DSS傷害を与えると、炎症の進行に伴い傷害腸にEGFP陽性の単球と線維細胞・線維芽細胞が増加し、これらの細胞浸潤は腫瘍形成と関連していた。また、Angiotensin II受容体阻害薬投与は大腸線維化ならびに腫瘍形成を抑制した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that several kinds of hematopoietic cells infiltrate the colon and form tumor microenvironment in inflammatory colitis. The cells, which have received the most attention as a key player in the microenvironment, are cancer-associated fibroblasts (CAFs). Because we have previously identified that monocytes enter the injured organs through MCP-1/CCR2 axis and differentiate into fibroblasts or myofibroblasts, we hypothesize that CAFs also are derived from monocytes. In C57BL/6J-Ly5.1 mice transplanted with EGFP+ bone marrow cells, EGFP+ fibrocytes and fibroblasts along with the inflammatory cells increased in the injured colon in association with progression of inflammation after AOM/DSS treatment. The increment of those cells was related to the formation of colon tumors. Angiotensin II receptor blocker, which exhibits antagonistic effects against CCR2, inhibited the progression of both colon fibrosis and tumor formation.

研究分野：血液学

キーワード：monocyte MCP-1 fibrocyte colon cancer

### 1. 研究開始当初の背景

近年の癌研究では(1)癌幹細胞起源の同定や(2)癌発生および進展における微小環境の関与について精力的に検討されている。この癌微小環境で発癌や転移において重要な役割を演じるのが癌幹細胞ニッチを構成する癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)である。CAFの起源として癌発生母地の線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、線維細胞、骨髄間葉系細胞などが挙げられているが、大腸癌組織におけるCAFの起源ならびに癌病巣への侵入機序に関しては明らかではない。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、造血細胞(特に単球)が、線維芽細胞や筋線維芽細胞様細胞(肝星細胞、血管壁細胞、腎系球体メサンギウム細胞)に分化しうることを肝臓・脾臓・腎臓などの様々な臓器で確認しており、癌微小環境内に出現するCAFも造血細胞由来ではないかとの仮説を立てた。また、血液中から炎症部位及び癌病巣への造血細胞の浸潤に関して、我々はケモカインの中でも monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)と細胞外マトリックス tenascin-C (TN-C)の関与に注目し、これらを阻害することで、癌病巣内に出現する造血細胞由来CAFが減少して癌の進展が抑制されるのではないかと推測した。

### 3. 研究の方法

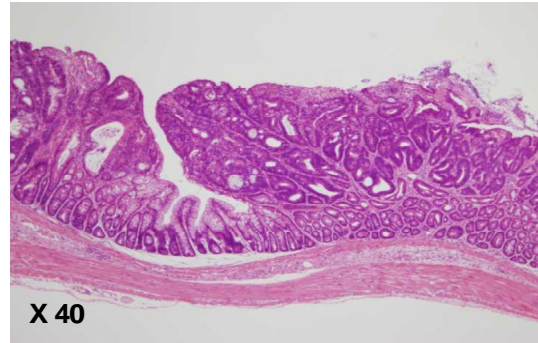
Enhanced green fluorescent protein (EGFP)-transgenic miceの全骨髄細胞を10Gy X線照射 C57BL/6J-Ly5.1 miceの静脈内に移植し、EGFP骨髄キメラマウスを作成する。移植2ヶ月後から azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS)傷害を開始する。AOMを腹腔内投与して1週間後から1%DSSを飲料水で7日間投与し、その後2週間DWを投与する。この1%DSS/DWの投与を3コース繰り返す。炎症開始後継時的に、体重・腸炎の状況(下痢・下血の程度)を観察し、各コース終了時ならびに3コース終了後5, 8, 12週後に大腸を摘出して、大腸の長さ、重量、腫瘍数ならびにサイズを測定する。摘出した大腸組織を4% paraformaldehydeで固定後、5µmの凍結切片を作成し、蛍光抗体で染色して共焦点蛍光顕微鏡で観察する。一部の検体はホルマリン固定後 Hematoxylin-Eosin染色標本を作成する。また、大腸組織から lamina propriaの細胞(LP細胞)を分離し Flow cytometryを用いて各種抗原の発現を解析する。一連の検討を angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB)投与の有無で比較検討する。

### 4. 研究成果

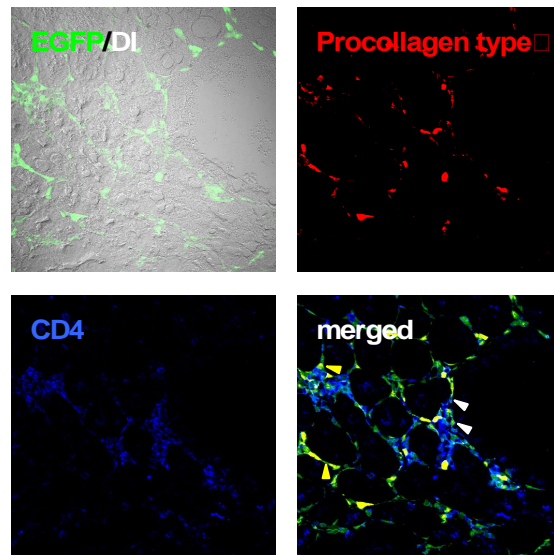
#### (1) AOM/DSS 傷害モデルの設定

EGFP骨髄キメラマウスにAOM/DSS傷害を与えるに際して、従来報告されているような3-5%

DSSを投与したところ、単期間で死亡したため、通常よりも低濃度の1%DSSを投与することにした。それでも、炎症の進展に伴い大腸長が短縮し、3サイクル目の傷害から8週間経過した時点から直腸内に腫瘍が形成され増加することが判明した。



大腸組織の免疫蛍光組織学的検査にて、EGFP陽性細胞が上皮直下のみならず粘膜筋板や粘膜下層・筋層内でも検出された。EGFP陽性細胞の多くはCD45陽性の炎症細胞であったが、一部にCD45陽性 procollagen-I陽性の線維細胞やCD45陰性 procollagen-I陽性の線維芽細胞が検出され、炎症終了からの時間経過に伴いEGFP陽性(つまり骨髄細胞由来の)線維芽細胞の比率が増加することが確認された。

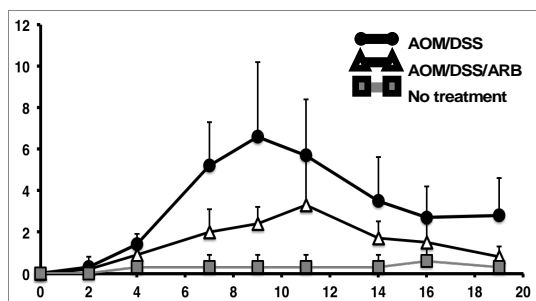


(白矢頭はEGFP陽性CD45陽性procollagen I陽性線維細胞、黄矢頭はEGFP陽性CD45陰性procollagen I陽性線維芽細胞を示す。)

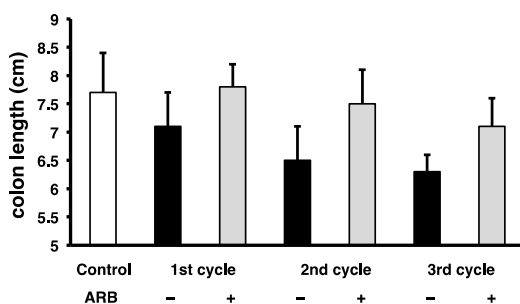
3 cycle目のDSS投与終了から12週経過した時点の大腸では、腫瘍部位と非腫瘍部位を比較すると、腫瘍部位で明らかにEGFP陽性CD45陰性collagen-I陽性細胞が増加しており、腫瘍形成と骨髄細胞由来線維芽細胞との関連が示唆された。

(2) ARB の大腸線維化ならびに腫瘍形成への影響

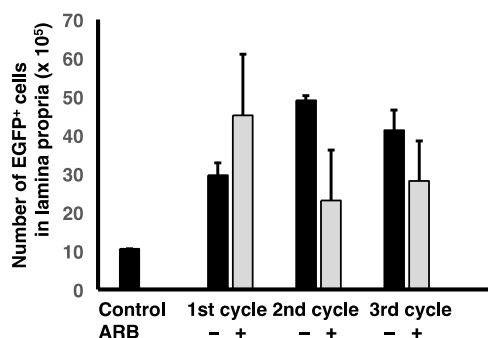
AOM/DSS 傷害開始と同時に、ARB を含む餌を与えたところ、大腸の炎症(体重減少・下痢・下血の状況から disease activity index (DAI)を判定)は明らかに軽減され、大腸長の短縮も抑制された。また、3 cycle の DSS 投与終了後 12 週時点での腫瘍形成も ARB 投与群で抑制されていた。



(1st cycle of DSS 傷害後の DAI 推移)



(3) ARB の大腸への炎症細胞浸潤抑制効果  
大腸から分離した LP 細胞を各種抗体で染色し Flow cytometry にて解析した。LP 細胞数は DSS 傷害の進行とともに増加し、EGFP 陽性 CD45 陽性 collagen-I 陽性の線維細胞ならびに EGFP 陽性 CD45 陰性 collagen-I 陽性の線維芽細胞も増加傾向を呈した。ARB 投与群ではこれら炎症細胞や線維細胞・線維芽細胞の増加が抑制されていた。



以上から、ARB は AOM/DSS 傷害に伴う炎症細胞や線維細胞の大腸内への浸潤を抑制して線維化や腫瘍形成を抑制する可能性が示唆された。ただし、腫瘍形成抑制においては、腫瘍数は減少するものの腫瘍径の縮小にはあまり影響しなかった。

## 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 3 件)

- Ino K, Masuya M, Tawara I, Miyata E, Oda K, Nakamori Y, Suzuki K, Ohishi K, Katayama N (2014) Monocytes Infiltrate the Pancreas via the MCP-1/CCR2 Pathway and Differentiate into Stellate Cells. *PLoS One* 9(1): e84889. 査読有
- Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T (2014) Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation. *PLoS One* 9(9): e108494. 査読有
- Masuya M, Shiraki K, Sugimoto K, Yamamoto N, Yoneda M, Kanayama K, Nishikawa K, Ino K, Tawara I, Ohnishi K, Sakurai H, Usui M, Shiraishi T, Isaji S, Takei Y, Katayama N (2014) Splenectomy increases the number of circulating hematopoietic stem/progenitor cells in patients with hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. *Hepatol Res* 44(14): E376-E385. 査読有

[学会発表](計 2 件)

- Ino K, Masuya M, Sugimoto Y, Ohishi K, Katayama N. Monocytes infiltrate the pancreas via the MCP-1/CCR2 pathway and differentiate into pancreatic stellate cells. 第 72 回日本癌学会総会. 2013.10.3-5. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- Ino K, Masuya M, Ohishi K, Sugimoto Y, Katayama N. Monocytes Infiltrate The Pancreas Via MCP-1/CCR2 Signaling and Differentiate Into Pancreatic Stellate Cells During Pancreatic Injury. 55<sup>th</sup> ASH annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10. New Orleans, LA, USA.

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎屋正浩 (MASUYA MASAHIRO)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30281083