

平成 29 年 4 月 7 日現在

機関番号：82685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460965

研究課題名(和文) 大腸癌及び肝臓癌に対するスフィンゴ脂質調節を介した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Acid sphingomyelinase-derived liver macrophage inhibits growth of metastatic colon cancer in the liver.

研究代表者

大澤 陽介 (Yosuke, Osawa)

東京都立駒込病院(臨床研究室)・肝臓内科・医長

研究者番号：60447787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質シグナルは種々の細胞機能に関与している。そこで、大腸がんの肝転移モデルをマウスで作成し、スフィンゴ脂質を調節する酸性スフィンゴミエリナーゼの役割を解析した。酸性スフィンゴミエリナーゼは腫瘍のマクロファージを増加させることにより抗腫瘍効果を示すことを見出した。この効果は、悪性黒色腫の肝転移モデルでも認められた。また、肝臓内のマクロファージは肝線維化や原発性肝細胞癌に対しても、カテニンシグナルを介して重要であることを見出した。スフィンゴ脂質はマクロファージの機能を調節しており、種々の病態の治療標的になりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingolipids regulate carcinogenesis and proliferation, survival, and apoptosis of cancer cells. In this study, the involvement of ASM in liver metastasis of colon cancer was examined. ASM in the liver inhibits tumor growth through cytotoxic macrophage. Thus, targeting ASM may represent a new therapeutic strategy for treating liver metastasis of colon cancer.

研究分野：肝臓病学

キーワード：転移性肝腫瘍 肝線維化 スフィンゴ脂質 カテニンシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍において他臓器転移は予後を左右する因子である。進行した悪性腫瘍に対しては化学療法や放射線療法など癌細胞を標的とした治療がなされているが、近年、転移先の宿主細胞による微小環境が増殖過程に影響を及ぼすことが明らかにされ、治療の標的としての可能性が示唆されている。腫瘍関連マクロファージは腫瘍増殖において、促進的に働くとの報告がなされ、種々の癌腫においてその存在が予後不良因子になるとの報告がなされている。しかしながら、大腸癌においては反対に抑制的に働くとの報告もなされている。これは、腫瘍促進的である M2 マクロファージと腫瘍抑制的である M1 マクロファージのバランスによるものと考えられているが、どの因子が如何なる機序で腫瘍内にマクロファージを誘導し、さらに M1・M2 の状態を決定しているのかについては、不明である。このように腫瘍関連マクロファージは腫瘍の進展を調節しうるため、国内外でこれを標的とした治療法の開発を目指した多くの研究がなされている。これまでの研究で、スフィンゴ脂質が腫瘍関連マクロファージに影響を及ぼす結果が得ているが、スフィンゴ脂質の関与を検討した他の研究は知り得る限りほとんどない。

酸性スフィンゴミエリナーゼはスフィンゴ脂質の代謝を調節する酵素であり、癌細胞の細胞機能に関わっていると考えられ、これまでに多くの研究がなされている。とくにセラミドは、癌細胞を含めた種々細胞で細胞死を誘導するため多くの研究がなされ癌治療への応用が検討されている。また、その分解産物であるスフィンゴシン 1 リン酸は、受容体に結合することにより増殖シグナルを誘導することが明らかとなっている。このように、癌細胞でのスフィンゴ脂質の役割については多くの研究がなされているが、一方、宿主細胞側の癌に対する防御機構におけるスフィンゴ脂質の役割についての研究はほとんどない。

転移性癌細胞の進展に際しては、癌細胞、免疫細胞、肝実質細胞、間質細胞が相互に影響しあって成立する。そのため、治療法の確立に際しては、それらの相互作用にどのように影響を及ぼすかを考慮する必要があるが、スフィンゴ脂質の及ぼす影響をこれらの相互作用の側面より解析した研究はない。

## 2. 研究の目的

肝臓の微小環境の構成に線維芽細胞及び免疫細胞（特にマクロファージ）が重要な役割を果たしている。これまでの解析により、スフィンゴ脂質が肝臓において微小環境に影響し、大腸癌の肝転移巣での細胞増殖に関与していること、および肝線維化に免疫が関与していることを見出してきた。マウスに高増殖

性大腸癌細胞株を門脈内に投与すると肝臓に転移性腫瘍を形成したが、酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損マウスに同様の処置を施したところ腫瘍の増殖が促進され、この際腫瘍内ではマクロファージの浸潤数に有意な差が認められた。このことから、宿主細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼはマクロファージ浸潤を促進することにより、大腸癌由来転移性肝臓癌に対し抑制的に作用していることが明らかになった。この研究結果を踏まえ、本研究は、上述の作用が他の悪性腫瘍や他の転移先臓器で普遍的な現象であるかを明らかにすること、さらに、悪性腫瘍細胞の増殖における宿主細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼの役割と癌細胞内のスフィンゴ脂質の役割の両者を明らかにし、増殖を抑制する宿主側の因子と癌細胞側の因子をそれぞれ調節することにより他臓器転移を抑制する新しい抗癌治療を確立することを目的とした。さらに、肝臓癌における微小環境とくにマクロファージ・線維芽細胞とのかかわりについて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 他の悪性腫瘍細胞において、上記と同様の結果が得られるかを検討した。

(2) これまでの解析により酸性スフィンゴミエリナーゼ過剰発現では縮小効果が予想され、さらに臨床応用が期待できる。そこで、アデノウイルスベクターを用いた過剰発現法を構築した。

(3) 原発性肝発癌においては肝線維化と炎症が重要であり、転移性肝腫瘍との差異について、特に線維化のメカニズムに着目して検討した。

## 4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫細胞においても大腸癌細胞株と同様の結果が得られたことから、酸性スフィンゴミエリナーゼによる抗腫瘍効果は普遍的であると考えられた。

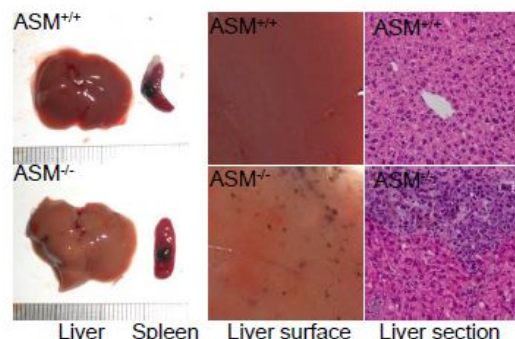


図 1. 悪性黒色腫細胞 (B16C2M) は酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損マウスの肝臓内では増殖が促進される

(2) 酸性スフィンゴミエリナーゼおよびスフィンゴシンキナーゼをアデノウイルスベクターにより過剰発現すると、腫瘍の縮小効果を認めた。

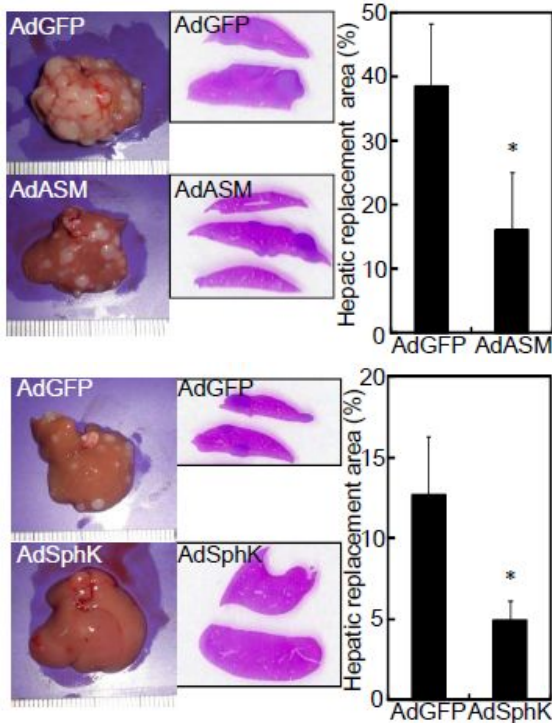


図2 酸性スフィンゴミエリナーゼおよびスフィンゴシンキナーゼの強制発現は、いずれも抗腫瘍効果が認められた

(3) これまでの検討より転移性腫瘍の場合、腫瘍内に浸潤するマクロファージや腫瘍周囲の線維芽細胞の活性化は腫瘍に対して抑制的に作用することが明らかとなった。しかしながら、原発性肝細胞癌の場合、マクロファージや線維芽細胞の活性化は、むしろ腫瘍促進的に作用することが知られている。肝発癌の重要な因子として、Wnt/ カテニンシグナルが重要であることが知られている。そこで、まず、カテニンシグナルの肝線維化に対する作用を検討したところ、四塩化炭素誘導性肝線維化はCBP/ カテニン阻害剤により抑制された。

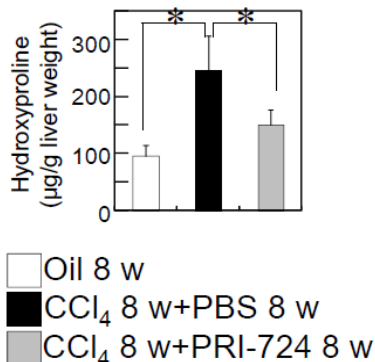


図3 CBP/ カテニン阻害剤は、四塩化炭素誘導性肝線維化を阻害する

また、CBP/ カテニン阻害剤は初代培養肝星細胞の活性化を抑制した。

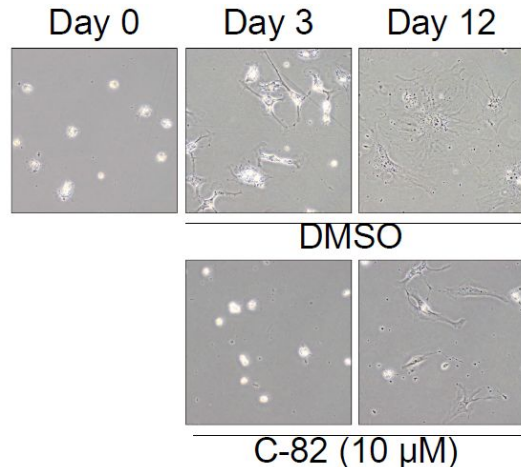


図4 CBP/ カテニン阻害剤は初代培養肝星細胞の活性化を抑制する。

さらに、CBP/ カテニン阻害剤は肝内免疫細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ発現を上昇させた。

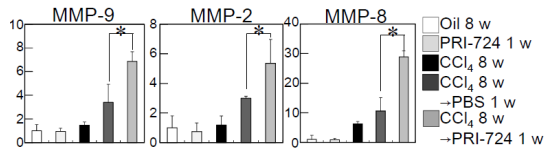


図4 CBP/ カテニン阻害剤は肝内白血球のMMP発現を増加させる。

肝線維化は肝細胞癌の誘導因子であり、CBP/ カテニン阻害剤の肝細胞癌に対する影響を検討した。CBP/ カテニン阻害剤はDENおよび四塩化炭素誘導性肝細胞癌の腫瘍内マクロファージの機能を調節することを示唆する結果が得られた。

考察：転移性肝腫瘍は酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損マウスで増悪し、同マウスの腫瘍部では、野生型と比較しマクロファージ浸潤が少なかった。さらに、腫瘍周囲の線維芽細胞が少なかった。また、野生型マウスの肝マクロファージをアレンドロネートリポソームを用いて消去したマウスでは、腫瘍は酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損マウスと同様に増悪したが、骨髄由来細胞のみが酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損となったキメラマウスでは腫瘍の増悪は認めず、肝細胞に酸性スフィンゴミエリナーゼを過剰発現させたマウスでは腫瘍増殖は抑制され、腫瘍部のマクロファージ浸潤は多かった。このことから実質細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼが腫瘍内マクロファージの増加を介した腫瘍増殖抑制に関与することが示唆された。マクロファージ数増加のメカニズムとしてスフィンゴシン1リン酸との関連を解析すると、酸性スフィンゴ

ミエリナーゼの過剰発現は肝臓の スフィンゴシン1リン酸量を増加させ、分離した腹腔マクロマージにスフィンゴシン1リン酸を添加すると、細胞の遊走能が増加したことから肝細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼは、スフィンゴシン1リン酸産生を介して細胞障害性マクロファージを誘導することにより大腸癌由来転移性肝腫瘍の増殖を抑制する作用があり、転移性肝腫瘍の治療のターゲット分子になりうることを示唆された。

一方、肝線維化モデルを用いた検討では、マクロファージは線維芽細胞活性化によって誘導される線維を溶解することが示唆され、線維形成においてマクロファージは複雑な役割を担っていることが示唆された。今後は、肝細胞癌の発癌モデルを用いてさらに解析をすすめ、スフィンゴ脂質によるマクロファージ機能の調節を介した新しい抗がん治療・抗線維化治療の開発を目指す。

#### 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4件)

1. Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Saito K, Seishima M. Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Reduces Mortality from Peritonitis and Sepsis in Mice by Regulating Functions of CD11b+ Peritoneal Cells. *Infect Immun.* 82, 4487-4495, 2014.
2. Osawa Y, Oboki K, Imamura J, Kojika E, Hayashi Y, Hishima T, Saibara T, Shibasaki F, Kohara M, Kimura K. Inhibition of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)-response Element-binding Protein (CREB)-binding Protein (CBP)/ $\beta$ -Catenin Reduces Liver Fibrosis in Mice. *EBioMedicine*, 2, 1751-1758, 2015.
3. Kowazaki Y, Osawa Y, Imamura J, Ohashi K, Sakamaki H, Kimura K. Immunological analysis of a patient with hepatitis B virus (HBV) reactivation after bone marrow transplantation. *Intern Med.* 54, 1213-1217, 2015.
4. Tokunaga Y, Osawa Y, Ohtsuki T, Hayashi Y, Yamaji K, Yamane D, Hara M, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Hishima T, Kojima S, Kimura K, Kohara M. Selective inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Sci Rep.* 7, 325. 2017

〔学会発表〕(計5件)

1. 大澤陽介 森脇久隆: シンポジウム2「消化管癌の分子病態学に関する進歩」大腸

癌細胞由来転移性肝腫瘍の増殖における酸性スフィンゴミエリナーゼの役割. 第100回日本消化器病学会総会, 東京, 2014.

2. 大澤陽介 森脇久隆: 胆管結紮誘導性慢性肝障害モデルにおけるKupffer細胞とTNF- $\alpha$ の役割. 第50回日本肝臓学会総会 東京 2014
3. 大澤陽介 今村潤 木村公則: ワークショップ9「肝線維化研究の進歩」マウス肝線維化におけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナルの関与. 第51回日本肝臓学会総会, 熊本, 2015
4. 大澤陽介 今村潤 木村公則: ワークショップ2「臨床応用を見据えた肝再生医学・線維化研究の新展開」マウス肝線維化におけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナルの関与. 第102回日本消化器病学会総会, 東京, 2016
5. 大澤陽介 今村潤 木村公則: ワークショップ4「肝線維化の分子機構」マウス肝線維化におけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナルの関与. 第52回日本肝臓学会総会, 東京, 2016

〔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

大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)

東京都立駒込病院・肝臓内科・医長  
研究者番号：60447787

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )