

分子生体応答研究分野

<研究スタッフ>

教授：向田直史

助教：馬場智久 外国人客員教員：陸培榮（2009年7月～12月）

学術振興会外国人特別研究員：Boryana Popivanova（2009年7月まで）

協力研究員：李影奕

大学院生：Feodora Kostadinova、王瑩瑩、Shamekh Mohamed Mohamed、飯田宗穂（医・旧第1内科）、藤井博（医・旧第2内科）、Gadelhaqbadr Mohamed Elsherif（医・修士）

研究支援推進員：南邦子

<研究の概要>

- ① 炎症性サイトカイン・ケモカインの発がん・がんの進展過程での役割の解析に基づく、治療法の開発。
- ② 前がん～がん病変で発現が亢進しているセリン/スレオニン・キナーゼ Pim-3の発がん・がんの進展過程での役割の解析に基づく、治療法の開発。

<今年度の主な成果と進行中の研究課題>

1) Azoxymethane をマウスの腹腔内に投与5日後から、デキストラン硫酸塩 (DSS) を飲料水に加えて5日間飲用させることを3回間歇的に反復させる、大腸がんモデルにおいて、腫瘍壊死因子ならびにマクロファージに作用するケモカインである CCL2 が発症過程のみならず進展過程に密接に関与していることを報告した。本年度は、他のケモカインの関与についても検討を加えた。その結果、CCL2 とは異なるが、同じくマクロファージに働くことが報告されている CCL3 の発現も大腸がん発がん過程において大腸組織で亢進していることを見出した (Popivanova・Kostadinova・Shamekh)。

2) DSS を飲料水に加えて5日間飲用させて生じる急性腸炎モデルにおいて、大腸局所で、ケモカイン CX3CL1 の発現が亢進しているとともに、CX3CL1 の特異的レセプターである CX3CR1 陽性マクロファージの浸潤も増強していた。CX3CR1 欠損マウスでは、DSS 投与後の炎症性細胞浸潤・組織破壊が、野生型マウスに比べて減弱していた。DSS による急性腸炎は、NO 阻害剤によって減弱することが知られているが、CX3CR1 欠損マウスは野生型マウスに比べると、DSS 投与後の iNOS 陽性マクロファージの浸潤が減弱していて、これが炎症反応・組織破壊の減弱につながったと考えられた (Kostadinova)。

3) マウス腎がん細胞株 Renca の尾静脈内投与によって起きる肺転移モデルの解析から、Renca 接種直後からケモカイン CCL2 の肺内での発現が亢進していて、CCR2 陽性の血球系細胞の肺内への集積も認められることを確認した (Gadelhaqbadr・馬場)。

4) ケモカイン・レセプターである CCR2 欠損マウスにおいて、胸腺ならびに末梢血において、 $\text{Spi}\alpha$ 陽性の樹状細胞亜群が減少していることを見出した。さらにこの亜群は血中由来の抗原の胸腺での取り込みとそれに引き続く Negative selection と T 抑制性 T 細胞の誘導にも関与している可能性があることを明らかにした (馬場・

Gadelhaqbadr)。

5) IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)遺伝子欠損マウスは、BALB/c 遺伝背景の下では、関節内へのマクロファージ・好中球の浸潤を伴う多発性の関節炎を発症することが知られている。この関節炎自然発症モデル・マウスでの、CCL2 の役割を検討するために、CCL2 の特異的レセプターである CCR2 遺伝子と IL-1ra 遺伝子とを重複欠損させたマウスを作出した。IL-1ra 単独欠損マウスに比較して、この重複欠損マウスでは、関節内へのマクロファージ浸潤は変化が無いのに対して、好中球浸潤が顕著に増強しており、関節炎も増悪した。重複欠損マウスでは、関節内ならびに関節に近接した骨髄内での破骨細胞の数が、IL-1ra 単独欠損マウスに比較して増加していて、骨破壊も亢進していた。以上の結果は、CCL2-CCR2 系が破骨細胞の動態の制御にも密接に関与していることを示唆していると考えられた (藤井・馬場)。

6) 薬学部の石橋弘行教授との共同研究で、Pim-3 活性を阻害する低分子化合物のスクリーニングを本年度も行い、試験管内で Pim-3 キナーゼ活性とヒト膵臓がん細胞株の増殖を抑制する、新たな低分子化合物を発見した (李・王)。

7) アルブミン・プロモーターによって Pim-3 を肝臓内にのみ選択的に恒常発現するトランスジェニックマウスを作出した。このマウスの肝細胞は、野生型マウスの肝細胞に比較して、細胞周期の進行が亢進していた。このマウスは、生後1年までは肝臓がんを自然発症しないが、ディエチルニトロサミンを生後3週目で投与すると、野生型マウスに比べて、肝臓がん細胞株の発症頻度ならびに発生する腫瘍の和・大きさが顕著に増大したことから、Pim-3 は肝臓がん発症において、initiator ではなく、promoter として働くことが示唆された (王・馬場)。

<今後の計画>

1) AOM/DSS によって生じる大腸がん発症ならびに進展過程における、CCL2-CCR2 以外の種々のマクロファージに作用することが報告されているケモカイン、特に CCL3 ならびに CX3CL1 の役割を検討する。炎症反応を基盤として発生すると考えられているウレタン投与による肺がん発がんモデルを確立し、幾つかのケモカイン関連遺伝子・炎症性サイトカイン関連遺伝子欠損マウスにおいて、発がんが減弱しているという予備的な結果を得たので、この点についても検討を加える。

2) 肺転移モデルでの、肺胞マクロファージなどの種々の血球系細胞の動態を検討するとともに、これらの血球系細胞の役割を解明する。さらに、これらの血球系細胞の動態を制御しているケモカインなどの走化因子の役割も明らかにする。

3) 担がん時における抑制性 T 細胞の動態を検討し、抑制性 T 細胞を標的とした新たながん免疫療法の開発を目指す。

4) 骨転移モデルを樹立して、骨転移モデルでの破骨細胞の集積・活性化に、関節炎と同様に CCL2-CCR2 系が関与しているかどうかを、検証する。

5) これまでに得られた Pim-3 活性を阻害する低分子化合物をリード化合物として、Pim-3 活性さらには膵臓がん細胞株などの増殖に対する作用を指標にして、化合物の修飾を石橋教授のグループと共同で行う予定である。

研究業績

(所属していた研究者を下線で示した)

発表論文：

分野主体の研究による論文

1. Li Y-Y, Wu Y, Tsuneyama K, Baba T, and Mukaida N. Essential contribution of Ets-1 to constitutive Pim-3 expression in human pancreatic cancer cells. *Cancer Sci* 100 (3): 396-404, 2009.
2. Baba T, Nakamoto Y, and Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirp α^+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol* 183 (5): 3053-3063, 2009.
3. Popivanova BK, Kostadinova FI, Furuichi K, Shamekh MM, Kondo T, Wada T, Egashira K, and Mukaida N. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis associated carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 69 (19) 7884-7892, 2009.
4. Li Y-Y, Wang Y-Y, Taniguchi T, Kawakami T, Baba T, Ishibashi H, and Mukaida N. Identification of stemamide synthetic intermediates as a novel potent anti-cancer drug with an apoptosis-inducing ability. *Int J Cancer* (in press).
5. Wu Y, Wang Y-Y, Nakamoto Y, Li Y-Y, Baba T, Kaneko S, Fujii C, and Mukaida N. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. *Oncogene* (in press).

他の研究室との共同研究による論文

6. Ishibe T, Kimura A, Ishida Y, Takayasu T, Hayashi T, Tsuneyama K, Matsushima K, Sakata I, Mukaida N, and Kondo T. Reduced acetaminophen-induced liver injury in mice by genetic disruption of IL-1 receptor antagonist. *Lab Invest* 68 (1): 68-79, 2009.
7. Lu P, Li L, Lin G, van Rooijen N, Mukaida N, and Zhang X. Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization. *Cornea* 28 (5): 562-569, 2009.
8. Lu P, Li L, Liu G, Zhang X, and Mukaida N. Absence of IL-1 receptor antagonist enhanced corneal neovascularization along with aberrant angiogenic factor expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 (10): 4761-4768, 2009.
9. Oka M, Sakaguchi M, Okada T, Ozaki M, Yoshioka T, Inoue H, Mukaida N, Kikkawa U, and Nishigori C. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) upregulates interleukin-8 expression at the level of transcription in human melanoma cells. *Exp Dermatol* (in press).
10. Kimura A, Ishida Y, Wada T, Hisaoka T, Morikawa Y, Sugaya T, Mukaida N, and Kondo T. The absence of IL-6 enhanced arsenite-induced renal injury by promoting autophagy of tubular epithelial cells with aberrant ERK activation. *Am J Pathol* (in press).
11. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Enhancement of tumor-specific T cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* (in press).

12. Takamatsu R, Teruya H, Takeshima E, Ishikawa C, Matsumoto K, Mukaida N, Li J-D, Heuner K, Higa F, Fujita J, and Mori N. Molecular characterization of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in T cells. *BMC Microbiology* (in press).

学会発表（筆頭発表者が研究室所属に限る）

1. Wu Y, Li Y-Y, Baba T, and Mukaida N. CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts, and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. Tri-Society Annual Conference 2009 of SLB, ICS, and ISICR. October 2009, Lisbon, Portugal.
2. Popivanova BK, Kostadinova FI, and Mukaida N. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa (Invited Speaker).
3. Fujii H, Baba T, Hamano R, Kawano M, Yamagishi M, and Mukaida N. The role of chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1, in arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa.
4. Kostadinova FI, Shamekh MM, and Mukaida N. Pathogenic roles of the CX3CL1-CX3CR1 interactions in macrophage recruitment and function in dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa.
5. Baba T and Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirp α^+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa (Selected as the first poster prize).
6. Fujii H, Baba T, Hamano R, Kawano M, Yamagishi M, and Mukaida N. The role of chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1, in arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. 9th World Congress on Inflammation, July 2009, Tokyo.
7. Popivanova BK, Kostadinova FI, and Mukaida N. Crucial involvement of the CCR2/CCL2 interactions in azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. 9th World Congress on Inflammation, July 2009, Tokyo (Young Investigator Award).
8. 向田直史。Pim-3の膵臓がん細胞での発現亢進機構とPim-3阻害剤による膵臓がん細胞株増殖の抑制。第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、2009年6月、徳島。
9. 向田直史、呉俣。マウス肺転移モデルにおける、ケモカインCCL3とそのレセプターCCR5の役割。第18回日本がん転移学会学術集会・総会、2009年7月、旭川。
10. 王瑩瑩、向田直史。ヒト膵臓がん細胞株の試験管内増殖抑制作用を示す新規低分子化合物の同定。第68回日本癌学会学術集会、2009年10月、横浜。
11. 向田直史。ケモカインCCL2の作用抑制による炎症関連大腸がんの抑制。第68回日本癌学会学術集会、2009年10月、横浜。

12. 藤井博、馬場智久、濱野良子、川野充弘、向田直史。Ablation of CCR2 exaggerates arthritis and enhances bone destruction in IL-1ra^{-/-} mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月、大阪。
13. 馬場智久、向田直史。Thymic Sirpα⁺ conventional dendritic cell is a major generator of central tolerance against blood-borne antigens. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月、大阪。
14. Kostadinova FI, Popivanova BK, and Mukaida N. Role of fractalkine in recruitment and function of macrophages in dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月、大阪。

その他

特願 2009-162000 平成 21 年 7 月 8 日出願。

発明者：向田直史、石橋弘行、谷口剛史。

発明の名称：置換フェナントレン化合物を有効成分とするがんを予防および治療するための医薬組成物に関する。