

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390112  
 研究課題名（和文）  
 炎症を基盤とするがん化過程における腫瘍壊死因子・ケモカインの役割の解析  
 研究課題名（英文）  
 Elucidation of the roles of tumor necrosis factor and chemokines in inflammation-associated carcinogenesis  
 研究代表者  
 向田 直史（MUKAIDA NAOFUMI）  
 金沢大学・がん研究所・教授  
 研究者番号：30182067

## 研究成果の概要：

腫瘍壊死因子・ケモカインの、がんの発症から進展過程における役割を、マウス・モデルにて解析した。その結果、慢性腸炎に伴う大腸がんの発症と進展過程において大腸局所で産生される腫瘍壊死因子が、肺転移モデルにおいては肺局所で産生されるケモカインである CCL3 が、それぞれ重要な役割を果たしていることが明らかとした。これらの結果は、腫瘍壊死因子・ケモカインががんの発症・進展過程において重要な役割を果たしていることを示唆している。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

## 研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、炎症、転移、遺伝子欠損マウス、腫瘍壊死因子、ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

近代病理学の始祖である Virchow は、がん組織に多数の白血球を認めることから、がんと炎症の密接な関係を提唱した。病理学的に見ても、がん細胞以外に、炎症時も集積することが知られている白血球・線維芽細胞・血管内皮細胞などの細胞が、固形がんの組織に集積し、場合によってはがん組織の 50% を占めることがある。しかし、このようながん細胞と正常細胞との相互作用の解析には、困難な点が多々あることも手伝い、その後のがん研究では、がん細胞そのものの変化を形態学

的にあるいは生化学・分子生物学的に解析する研究が、長く主流を占めてきた。

疫学的な研究から、炎症性腸疾患や珪肺・石綿肺などによる慢性炎症が、それぞれ大腸がんや肺がんの発生頻度を著明に増加させることが明らかとなり、炎症とがんとの密接な関係が再び示唆されるようになった。さらに、炎症性サイトカイン・ケモカイン・接着分子の発見にともない、炎症反応自体の分子レベルでの解析も進んだ。このような背景もと、がん組織に集積する白血球・線維芽細胞・血管内皮細胞が、がん細胞との相互作用

によって、炎症性サイトカイン・ケモカイン種々の生理活性物質を産生され、がんの発症・進展に密接に関与している可能性が示唆されるに至り、この点に着目して研究が世界的にも盛んに行われつつある。

しかし、炎症性サイトカイン・ケモカインのがんの発症・進展過程における役割を明らかにするためには、個体レベルでの解析が必要であるが、本研究を開始した時点においては、世界的に見ても、必ずしも十分ではなかった。

## 2. 研究の目的

研究開始当初までに集積された研究成果に基づいて、がん化からがんの進展過程を炎症反応と位置づけて解析することを目的として、本研究計画を立案した。特に、炎症時に炎症局所で大量に産生され、炎症反応の成立に深く関与していると考えられている腫瘍壊死因子・ケモカインに着目して、これらの遺伝子を欠損したマウスを用いて、個体レベルで、これらの因子の、慢性炎症から、がんの発症から進展過程における種々の役割を、解析することを主な研究目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、がん化過程ならびに慢性炎症過程における、腫瘍壊死因子ならびにケモカインの役割について、 から に記載した動物モデルを用いて検討を加えた。

野生型マウスならびに、ケモカインである CCL3 と CCL3 のレセプターである CCR5 を欠損したマウスの気道内に、プレオマイシンを投与した。野生型マウスでは、プレオマイシン投与 21 日目において肺線維症が生じる。この過程における肺内の変化を分子病理学的に、野生型マウスと CCL3 あるいは CCR5 欠損マウスとの間で比較検討した。

アゾキシメタン (AOM) をマウスの腹腔内に投与した 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て生じさせる、大腸がん発症モデルについて、野生型マウスならびに腫瘍壊死因子レセプター (TNF-R)p55 欠損マウスを用いて、分子病理学的に検討を加えた。実験によっては、野生型マウスと TNF-Rp55 欠損マウスとの間で骨髄キメラマウスを作成して、同様に AOM と DSS を重複投与させ、大腸がん発生を検討した。さらに、AOM と DSS 重複投与によって大腸がんが発生した後で、TNF 阻害剤を投与した際の大腸がんへの影響も分子病理学的に検討した。

野生型マウスと、ケモカインの一つである

CX3CL1 に対するレセプターである CX3CR1 を欠損したマウスに、アルカリ溶液を点眼後、14 日目に生じる角膜内血管新生過程を、野生型マウスと CX3CR1 欠損マウスとの間で、分子病理学的に比較検討した。さらに、腹腔マクロファージの CX3CL に対する応答性も検討した。

ヘルペスウイルス・チミジン・キナーゼ (tk) 遺伝子導入した肝臓がん細胞株 BNL をマウスに接種後に、ガンシクロビルを投与することによって、マウス個体内での腫瘍を根絶する、いわゆる自殺遺伝子治療法を施行した。その後、BNL 株を再び接種したときの、腫瘍に対する応答を、野生型マウスならびに、CCL3 と CCL3 に対するレセプターである CCR1・CCR5 欠損マウスを用いて、特に樹状細胞の機能に着目して、比較検討した。

マウス腎臓がん細胞株 Renca 細胞株を、野生型マウスならびに、CCL3、CCR5 欠損マウスの尾静脈に接種し、肺転移形成を誘導し、野生型マウスと CCL3 あるいは CCR5 欠損マウスとの間での差異を分子病理学的に検討した。実験によっては、野生型マウスと CCR5 欠損マウスとの間において、骨髄キメラマウスを作成して、同様に Renca 細胞を尾静脈から接種して、同様の検討を行った。さらに、CCL3 に対する、腹腔マクロファージならびに線維芽細胞の遊走能ならびにマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) ならびに肝細胞増殖因子 (HGF) 発現に対する影響についても合わせて検討した。

## 4. 研究成果

上記の から の研究から、以下の結果を得た。

プレオマイシン投与によって、肺への顆粒球・マクロファージの浸潤が起き、その後線維細胞の集積を伴う肺線維症が生じる。しかもマクロファージならびに線維細胞が、線維化に密接に関与していると考えられる transforming growth factor- $\beta$  の主な産生細胞であった。この全過程において、ケモカイン CCL3 の mRNA・タンパクの発現が肺内で亢進していた。CCL3 あるいは、CCL3 のレセプターである CCR5 遺伝子欠損マウスでは、プレオマイシン投与後に認められたマクロファージならびに線維細胞の集積が低下し、肺線維症も軽減したことから、CCL3-CCR5 系がマクロファージならびに線維細胞の動員を調節することによって、肺線維症の発症に密接に関与していることが明らかとなった。(発表論文 8)

AOM と DSS の重複投与によって、野生型マウスでは、サイクロオキシゲナーゼ (COX) -2 の発現亢進とともに、全例で カテニンの核内への集積を伴う腺がんが多発した。TNF-Rp55 欠損マウスでは、全経過を通して COX-2 発現亢進が減弱し、腫瘍の発生数が著明に低下した。骨髄キメラマウスの解析から、COX-2 を発現している骨髄由来細胞である顆粒球・マクロファージが、TNF の作用によって、腸管内に浸潤することによって大腸がんの発症・進展が起きることが判明した。さらに、すでに大腸がんが発症している段階で、TNF に対する阻害剤を野生型マウスに投与すると、発生した腫瘍の数と大きさが減少し、カテニンの遺伝子変異の頻度も減少した。これらの結果は、TNF を標的とした大腸がん治療の可能性を強く示唆する結果であると考えられる。(発表論文 6)

なお、本論文の研究内容は、New England Journal of Medicine 2008 年 6 月 19 日号の Clinical Implications of Basic Research 欄 (ibid. 358: 2733-2734, 2008) に解説されている。

アルカリ点眼後に生じる角膜血管新生に先行して、マクロファージに対する作用するケモカイン、CX3CL1 が角膜内で産生され、CX3CL1 に対するレセプターである CX3CR1 発現マクロファージが角膜内に集積する。CX3CR1 遺伝子欠損マウスにアルカリ溶液を点眼すると、マクロファージの集積が減弱するとともに、血管抑制因子である thrombospondin (TSP) の発現が減弱し、血管新生が亢進した。CX3CL1 は、CX3CR1 依存的に、マクロファージによる TSP 発現を亢進することから、CX3CR1 発現マクロファージは血管新生抑制因子を選択的に産生する能力があることが明らかとなった。(発表論文 5)

自殺遺伝子治療における、腫瘍免疫の成立過程におけるケモカインの役割を解析した。その結果、自殺遺伝子治療を行った時に、腫瘍局所においてケモカイン CCL3 の発現が亢進し、CCL3 に対するレセプターである CCR1 または CCR5 を発現している未熟樹状細胞が腫瘍局所に浸潤し、その結果野生型マウスでは、腫瘍に対する特異的免疫が成立した。CCL3、CCR1、CCR5 遺伝子を欠損したマウスでは、自殺遺伝子療法の腫瘍局所への未熟樹状細胞の浸潤が軽減する結果、腫瘍に対する特異的免疫が生じなかったことから、自殺遺伝子治療後の腫瘍に対する特異的免疫の成立には、CCL3-CCR1/CCR5 系が重要な役割を果た

していることが明らかとなった。(発表論文 3)

マウス腎臓がん細胞株 Renca 細胞をマウスの尾静脈に接種した時に生じる肺転移巣の形成時において、CCL3・CCL4 が肺局所で産生され、これらのケモカインに対するレセプターである CCR5 を発現しているマクロファージ・好中球さらには線維芽細胞が、転移巣の形成とともに集積することを認めた。さらに、CCL3 は CCR5 依存的にマクロファージの集積を引き起こすのみならず、MMP-9 の産生を誘導した。さらに、CCL3 は CCR5 依存的に線維芽細胞を集積させるとともに、線維芽細胞からの HGF 産生も誘導した。CCL3 欠損マウスあるいは CCR5 欠損マウスに、Renca 細胞を同様に尾静脈に接種した時には、マクロファージ・線維芽細胞の肺への集積が軽減されるとともに、MMP-9 ならびに HGF 発現が低下する結果、肺での転移巣形成が、野生型に比べて減弱することを明らかにした。(発表論文 2)

## 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 12 件)(全て査読あり)

1. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Mukaida N, and Kaneko S. Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. *Cancer Sci.* 99 (10): 2075-2082, 2008.
2. Wu Y, Li Y-Y, Matsushima K, Baba T, and Mukaida N. CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts, and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. *J Immunol* 181 (9): 6384-6393, 2008.
3. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Kakinoki K, Li Y-Y, Wu Y, Matsushima K, Kaneko S, and Mukaida N. Tumor cell apoptosis induces

- tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. *J Leukocyte Biol* 84 (4): 1001-1010, 2008.
4. Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, and Kondo T. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol* 181 (6): 4208-4218, 2008.
  5. Lu P, Li L, Kuno K, Wu Y, Baba T, Li Y-Y, Zhang X, and Mukaida N. Protective roles of the fractalkine/CX3CL1-CX3CR1 interactions in alkali-induced corneal neovascularization through enhanced anti-angiogenic factor expression. *J Immunol* 180 (6): 4283-4291, 2008.
  6. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, and Mukaida N. Blocking TNF- $\alpha$  in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118 (2): 560-570, 2008.
  7. Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N, and Matsushima K. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 111 (12): 5457-5466, 2008.
  8. Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, and Mukaida N. Essential involvement of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am J Pathol* 170: 843-854, 2007.
  9. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Iwakura Y, Mukaida N, and Kondo T. IFN- $\gamma$  protects cerulein-induced acute pancreatitis by repressing NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol* 178: 7385-7394, 2007.
  10. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N, and Kaneko S. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol*. 178 (1): 574-583, 2007.
  11. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, and Kaneko S. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett.* 251: 36-42, 2007.
  12. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma; clinical safety. *Clin Exp Immunol* 147 (2): 296-305, 2007.

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Kostadinova F, Popivanova BK., and Mukaida N. Pathogenic roles of the CX3CL1-CX3CR1 interactions in dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 20 年 12 月 3 日、京都。
2. Popivanova BK., Kostadinova F, and Mukaida N. Role of a chemokine receptor, CCR2, in azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis in mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集

- 会、平成 20 年 12 月 3 日、京都。
3. Fujii H, Baba T, Hamano R, Kawano M, and Mukaida N. The roles of chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1, in arthritis in IL-1-deficient mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 20 年 12 月 3 日、京都。
4. Baba T, Wu Y, and Mukaida N. Thymic  $\text{Spir}\alpha^+$  dendritic cells induce central tolerance against bloodstream antigens. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 20 年 12 月 1 日、京都。
5. 向田直史. 抗サイトカイン療法の可能性。「未来医療ワークショップ：難治性癌への新しい取り組み」第 45 回日本婦人科腫瘍学会、平成 20 年 11 月 22 日、金沢。(招待講演)
6. Lu P and Mukaida N. Possible opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in neovascularization. (International Session 6: Chemokine, Cytokine and Cancer) 第 67 回日本癌学会総会、平成 20 年 10 月 29 日、名古屋。
7. 向田直史. Role of a chemokine receptor, CCR2, in azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. (英語ワークショップ演題) 第 67 回日本癌学会総会、平成 20 年 10 月 29 日、名古屋。
8. Mukaida N, Kostadinova FI, and Popivanova BK. Prevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis by CCR2 blockade. 7<sup>th</sup> Joint Conference of the International Cytokine Society and the International Society of Interferon and Cytokine Research. October 15, 2008, Montreal, Canada.
9. Baba T, and Mukaida N. Distinctive feature and role of the thymic  $\text{Spir}\alpha^+$  dendritic cells in the central tolerance. 10<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells. October 3, 2008, Kobe, Japan.
10. 向田直史. 腫瘍壊死因子 (TNF) 阻害剤の、炎症関連大腸がんに対する治療効果。第 12 回がん分子標的治療研究会総会。平成 20 年 6 月 26 日、東京。
11. Lu P, Li L, Kuno K, Wu Y, Li Y-Y, Murphy PM, Zhang X, and Mukaida N. Fractalkine receptor/CX3CR1-deficiency enhanced alkali-induced corneal neovascularization with reduced infiltration of anti-angiogenic factor expressing-macrophages. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 19 年 11 月 22 日、東京。
12. Wu Y, Lu P, Li Y-Y, and Mukaida N. Essential contribution of the CCL3-CCR5 axis in lung metastasis process. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 19 年 11 月 22 日、東京。
13. Mukaida N and Popivanova BK. Reversal of chronic colitis-associated colon carcinoma progression by tumor necrosis factor blockade. (Oral presentation) 15<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Cytokine Society. October 28, 2007, San Francisco, USA.
14. 飯田宗穂、中本安成、柿木嘉平太、金子周一、向田直史. 自殺遺伝子治療による腫瘍免疫成立における CC ケモカイン受容体 1 および 5 の役割の検討。第 66 回日本癌学会総会、平成 19 年 10 月 5 日、横浜。
15. 向田直史, Popivanova BK. Alleviation of chronic colitis-associated colon

carcinoma progression by tumor necrosis factor blockade. (英語ワークショップ演題) 第66回日本癌学会総会、平成19年10月4日、横浜。

16. 飯田宗穂、中本安成、柿木嘉平太、金子周一、向田直史。Induction of specific tumor immunity by suicide gene therapy in CC chemokine receptor (CCR)1- or CCR5-dependent manner. 第11回基盤的癌免疫研究会総会、平成19年7月11日、東京。

17. 向田直史、呉俣。マウスの肺転移過程におけるケモカイン CCL3 とそのレセプターの役割の解析。(ワークショップ演題) 第16回日本がん転移学会総会、2007年7月9日、富山。

18. 向田直史。内胚葉由来臓器がんにおけるセリン/スレオニンキナーゼ Pim-3 の発現と役割。(ワークショップ演題) 第11回がん分子標的治療研究会総会、2007年7月5日、大阪。

19. Popivanova BK and Mukaida N. Alleviation of chronic colitis-associated colon carcinoma progression by tumor necrosis factor blockade. (Poster Award) 16<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2007, June 14, 2007, Shizuoka, Japan.

[ その他 ] ホームページ

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/bun-siseitai/JapContent.html>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

向田 直史 (MUKAIDA NAOFUMI)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号：30182067

(2) 研究分担者  
無  
(3) 連携研究者  
無